

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der
Medizinischen Hochschule Hannover
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. habil. A. Kapp

**Einfluss von IL-12
auf die durch Calcineurinantagonisten
induzierte IFN γ -Produktion
aktivierter humaner Lymphozyten**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin in der
Medizinischen Hochschule Hannover

Vorgelegt von
Claudia Killig
aus Delmenhorst

Hannover, 2006

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover

am 27.03.2007

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. Bitter-Suermann

Betreuer: Prof. Dr. Wittmann

Referent: Prof. Dr. Reinhold Schwinzer

Korreferent: Prof. Dr. Volkhard Kaefer

Tag der mündlichen Prüfung: 27.03.2007

Promotionsausschussmitglieder:

Prof. Dr. Helmut Drexler

Prof. Dr. Anke Scharz

Prof. Dr. Bettina Wedi

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	V
TABELLENVERZEICHNIS.....	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VIII

1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Calcineurinantagonisten: Ciclosporin A und Tacrolimus (FK506).....	1
1.1.1 Wirkungsmechanismus der Calcineurinantagonisten.....	1
1.1.2 Widersprüchliche Ergebnisse zum Einfluss CsA auf die IFN- γ -Konzentration von T-Lymphozyten.....	4
1.2 NFAT (nuclear factor of activated T-cells)	7
1.2.1 NFAT-Isoformen.....	7
1.2.2 NFAT-Aktivierung.....	8
1.2.2.1 Calcium-Influx infolge Stimulation und Interaktion von Calcineurin mit NFAT.....	8
1.2.2.2 Nukleärer Import und DNA-Bindung.....	9
1.2.2.3 Interaktion mit Partnerproteinen.....	9
1.2.2.4 Nukleärer Export.....	10
1.2.2.5 NFAT reguliert eine große Anzahl Gene, die in aktivierten Immunzellen exprimiert werden.....	11
1.2.3 AP-1-Transkriptionsfaktoren.....	12
1.2.3.1 Kostimulation: B7/CD28-Interaktion.....	12
1.2.3.2 Entstehung von AP-1-Transkriptionsfaktoren.	12
1.2.4 Gene, die durch den NFAT: AP-1-Komplex reguliert werden.....	14
1.3 Interferon γ (IFN- γ).....	14
1.4 Zytokine.....	15
1.4.1 Interleukin 12.....	15
1.4.2 Interleukin 18.....	17
1.4.3 Interleukin 23.....	18
1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	18

2 METHODEN, MATERIAL, GERÄTE, HILFSMITTEL.....20

2.1 Methoden.....	20
2.1.1 Separation peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) mittels Ficoll-Trennung.....	20
2.1.2 Anreicherung der Lymphozytenfraktion durch ein Plastikadhärenzverfahren.....	20
2.1.3 Berechnung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer.....	21
2.1.4 Isolation von CD4 ⁺ -T-Zellen durch Negativselektion.....	21
2.1.5 Durchflußzytometrische Messung und Auswertung.....	22
2.1.5.1 Phänotypisierung von Zellen aus peripherem Blut.....	23
2.1.5.2 Markierung von PBMC mit CFSE.....	23
2.1.5.3 Durchflußzytometrische Analyse intrazellulärer Zytokine und Membranmoleküle.....	23
2.1.6 Selbstbau-ELISA zum Nachweis von IFN- γ	24
2.1.7 Kern- & Zytoplasmaextraktionen.....	25
2.1.8 Proteinbestimmung nach Biuret.....	25
2.1.9 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).....	26
2.1.10 Reverse Transkription und PCR.....	27
2.1.10.1 RNA-Probengewinnung.....	28
2.1.10.2 Isolation der mRNA.....	28
2.1.10.3 Reverse Transkription.....	29
2.1.10.4 Effizienz korrigierte, Kalibrator angepasste, relative Quantifizierung mittels Real Time PCR.....	29
2.1.11 Statistische Analyse.....	32
2.2 Material.....	32
2.2.1 Chemikalien/Reagenzien.....	32
2.2.2 Zellisolation und Kultur.....	33
2.2.3 Stimulation.....	33
2.2.4 Puffer.....	34
2.2.5 Durchflußzytometrie.....	34
2.2.6 ELISA.....	35
2.2.7 Kern- & Zytoplasmaextraktion.....	35
2.2.8 Proteinbestimmung nach Biuret.....	35
2.2.9 EMSA.....	35
2.2.10 Reverse Transkription und PCR.....	36
2.3 Geräte und sonstige Hilfsmittel.....	36
2.4 Computerprogramme.....	37

3 ERGEBNISSE.....38

3.1 Induktion der IFN- γ -Produktion von Lymphozyten durch Ciclosporin A.....	38
3.1.1 Anstieg der IFN- γ -Produktion durch CsA bei TCR- und Kostimulation in Gegenwart von Interleukin 12.....	38

3.1.2	Unterschiede in der Induktion der IFN- γ -Produktion von Lymphozyten durch CsA zwischen Normalpersonen und Atopikern.....	42
3.2	Einfluss von Inkubationszeit und Konzentration der Antikörper und Zytokine.....	43
3.2.1	Abhängigkeit der IFN- γ -Produktion von der Inkubationszeit.....	43
3.2.2	Einfluss der Konzentrationen von Interleukin 12 und anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern.....	44
3.3	Einfluss weiterer Zytokine auf die Induktion der IFN- γ -Produktion durch Ciclosporin A.....	46
3.3.1	Keine Induktion der IFN- γ -Produktion durch die Zytokine IL-2, IL-4, IL-18 und IL-23.....	46
3.4	Alternativen zur TCR- und Kostimulation und ihre Auswirkungen auf die IFN- γ -Produktion.....	48
3.4.1	Keine Induktion der IFN- γ -Produktion durch Kombination von IL-12 und IL-18.....	48
3.5	Keine Aufhebung des „CsA-Effektes“ durch Th2-Zytokine.....	49
3.5.1	Gegentitration mit IL-4.....	50
3.5.2	Gegentitration mit IL-10.....	51
3.6	Einfluss des Calcineurinantagonisten Tacrolimus (FK506) auf die IFN- γ -Produktion von Lymphozyten.....	52
3.7	„CsA-Effekt“ ebenfalls nachweisbar durch Durchflusszytometrie und PCR.....	53
3.7.1	Ciclosporin A induziert die IFN- γ -Produktion in mittels Allergenen aktivierten proliferierten Lymphozyten.....	53
3.7.2	CsA induziert in Kombination mit IL-12 einen verzögerten IFN- γ -mRNA-Anstieg.....	55
3.8	Keine Hochregulation der Th1-assoziierten Transkriptionsfaktoren T-bet und ERM durch CsA in Kombination mit TCR- und CD28-Triggerung und IL-12.....	56
3.9	Erhöhte, späte c-fos-Bindungsaktivität und –mRNA-Expression durch CsA.....	58
3.10	Verzögerte AP-1-Aktivierung in mit CsA stimulierten T-Zellen in Gegenwart eines TCR-Signales und IL-12.....	60
3.11	Keine Hochregulation der Zelloberflächenmolekül-Expression durch CsA in Kombination mit IL-12.....	61
4	DISKUSSION.....	62
4.1	Induktion der IFN- γ -Produktion von Lymphozyten durch Ciclosporin A.....	62
4.1.1	Anstieg der IFN- γ -Produktion durch CsA bei TCR- und Kostimulation in Gegenwart von Interleukin 12.....	62

4.1.1.1	Unterschiede in der Induktion der IFN- γ -Produktion von Lymphozyten durch CsA zwischen Normalpersonen und Atopikern.....	65
4.1.2	CsA induziert in Kombination mit IL-12 einen verzögerten IFN- γ -mRNA-Anstieg.....	66
4.1.3	„CsA-Effekt“ ebenfalls durchflusszytometrisch nachweisbar- CsA induziert die IFN- γ -Produktion in mittels Allergenen aktivierten proliferierten Lymphozyten.....	66
4.2	Einfluss von Inkubationszeit und Konzentration der Antikörper und Zytokine.....	67
4.2.1	Abhängigkeit der IFN- γ -Produktion von der Inkubationszeit.....	67
4.2.2	Einfluss der Konzentrationen von Interleukin 12 und anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern.....	68
4.3	Einfluss weiterer Zytokine auf die Induktion der IFN- γ -Produktion durch Ciclosporin A.....	69
4.3.1	Keine Induktion der IFN- γ -Produktion durch die Zytokine IL-2, IL-4, IL-18 und IL-23.....	69
4.4	Alternativen zur TCR- und Kostimulation und ihre Auswirkungen auf die IFN- γ -Produktion.....	71
4.4.1	Keine Induktion der IFN- γ -Produktion durch Kombination von IL-12 und IL-18.....	71
4.5	Keine Aufhebung des „CsA-Effektes“ durch Th2-Zytokine.....	72
4.6	Einfluss des Calcineurinantagonisten Tacrolimus (FK506) auf die IFN- γ -Produktion von Lymphozyten.....	73
4.7	T-bet und AP-1: zwei relevante Transkriptionsfaktoren am IFN- γ -Gen.....	74
4.7.1	Verminderte T-bet-mRNA-Expression und -DNA-Bindungsaktivität unter CsA- ebenfalls verminderte ERM-mRNA-Expression.....	75
4.7.2	Später CsA-vermittelter Anstieg der c-fos-Bindungsaktivität und -mRNA-Expression.....	76
4.8	Schlussfolgerungen und klinischer Ausblick.....	78
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	81
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	83
7	DANKSAGUNG.....	95
8	LEBENS LAUF.....	96
9	ERKLÄRUNG NACH §2 ABS. 2 NRN. 5 UND 6.....	98

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der T-Zell-Aktivierung und des Wirkungsmechanismus der Calcineurinantagonisten.	2
Abbildung 1.2: Am Start der MAP-Kinasen-Kaskaden ist sowohl eine Signalgebung des Antigenrezeptors als auch eine kostimulierende Signalgebung beteiligt.....	13
Abbildung 3.1: Effekt von CsA auf die IFN- γ -Produktion von PBMC nach 48stündiger Stimulation über TCR/CD28 und mit IL-12.....	39
Abbildung 3.2: Prozentualer Vergleich der IFN- γ -Produktion nach 48stündiger Stimulation, normalisiert auf Kontrollkultur ohne Aktivierung mit IL-12.....	40
Abbildung 3.3: IFN- γ -Produktion von CD4 ⁺ -T-Zellen nach Inkubation mit CsA.	41
Abbildung 3.4: Vergleich der CsA-vermittelten IFN- γ -Induktion zwischen Atopikern und Normalpersonen.	42
Abbildung 3.5: Abhängigkeit der IFN- γ -Produktion von der Inkubationszeit	43
Abbildung 3.6: Abhängigkeit der IFN- γ -Produktion von der IL-12-Konzentration	44
Abbildung 3.7: Abhängigkeit der IFN- γ -Produktion von der anti-CD3-Ak-Konzentration....	45
Abbildung 3.8: Abhängigkeit der IFN- γ -Produktion von der anti-CD28-Ak-Konzentration..	46
Abbildung 3.9: Einfluss der Interleukine 4, 2 und 18 auf die IFN- γ -Produktion von PBMC bei Inkubation mit CsA.....	47
Abbildung 3.10: Einfluss von IL-23 auf die IFN- γ -Produktion von PBMC bei Inkubation mit CsA.....	48
Abbildung 3.11: Effekt von IL-12 plus IL-18 auf die IFN- γ -Produktion bei Inkubation mit CsA	49
Abbildung 3.12: Keine Aufhebung der CsA-vermittelten IFN- γ -Induktion durch IL-4.....	50
Abbildung 3.13: Keine Aufhebung der CsA-vermittelten IFN- γ -Induktion durch IL-10.....	51
Abbildung 3.14: Induktion der IFN- γ -Produktion durch Tacrolimus (FK506)	52
Abbildung 3.15a: Ciclosporin A induziert die IFN- γ -Produktion proliferierter Lymphozyten, die zuvor mit Allergenen aktiviert wurden.	54
Abbildung 3.15b: CsA-induziertes IFN- γ in antigen- und IL-12-stimulierten Lymphozyten wird v.a. von proliferierten Zellen produziert.	55

Abbildung 3.16: CsA induziert IL-12-abhängig einen verzögerten IFN- γ -mRNA-Anstieg...	56
Abbildung 3.17: T-bet-mRNA-Expression ist unter CsA vermindert	57
Abbildung 3.18: T-bet-DNA-Bindungsaktivität ist durch CsA vermindert.	58
Abbildung 3.19: CsA führt zu einer erhöhten c-fos-mRNA-Expression.	59
Abbildung 3.20: CsA führt nach 24h zu einer erhöhten c-fos-DNA-Bindungsaktivität.....	59
Abbildung 3.21: Anstieg der AP-1-DNA-Bindungsaktivität unter dem Einfluss von CsA.....	60
Abbildung 3.22: Keine Hochregulation der Zelloberflächenmolekül-Expression durch CsA in Kombination mit IL-12	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: CsA und Tacrolimus hemmen die von Lymphozyten sowie einige der von Granulozyten hervorgerufenen Effekte.	3
Tabelle 2.1: Pipettierschema für die Bindereaktion bei EMSA-Experimenten	27
Tabelle 2.2: Pipettierschema für den PCR-Mastermix	29
Tabelle 2.3: Pipettierschema für die PCR	30
Tabelle 2.4: Primersequenzen	30

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AP-1	activator protein-1, Aktivatorprotein-1
APC	antigen presenting cell, antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCS	bovine calf serum, bovines Kälberserum
C3	c-Rel-Bindungsstelle
Ca ²⁺	Calciumionen
CBP	CREB-binding protein, CREB-bindendes Protein
CD	cluster of differentiation, Einteilung der Oberflächenmoleküle
CFSE	5-(and-6)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
CK1 α	Casein-Kinase-1 α
cNFAT	zytoplasmatische Komponente von NFAT
CNS	conserved non-coding sequence, konservierte, nicht kodierende Sequenz
ConA	Concanavalin A
CRAC	durch Calcium-Ausschüttung aktivierter Calcium-Kanal
CRM	Exportrezeptor für NFAT
CsA	Ciclosporin A
CTLA	cytotoxic T lymphocyte-associated molecule, zytotoxische T-Lymphozyten-assoziiertes Molekül
DC	dendritic cell, Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonucleinacid, Desoxyribonukleinsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
Erk	extracellular-regulated kinase, extrazellulär-regulierte Kinase
FACS	fluorescence activated cell sorter, Durchflusszytometer
FCS	fetal calf serum, fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FK506	Tacrolimus
FL1	Fluoreszenz 1 (Grünfluoreszenz im FACS)
FL2	Fluoreszenz 2 (orangerote Fluoreszenz im FACS)
FSC	forward light scatter, Vorwärtsstreulicht
GATA	Transkriptionsfaktoren der GATA-Familie
Geo mean	geometric mean, geometrisches Mittel
GSK3	Glycogen-Synthase-Kinase-3
GvHD	graft-versus-host-disease, Spender-gegen-Empfänger-Erkrankung
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1 (CD54), interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IFN	Interferon
IGIF	IFN- γ -inducing factor, IL-18
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-Triphosphat
Jnk	JunN-terminal kinase
LPS	Lipopolysaccherid
MAP-Kinase	mitogen-activated protein kinase, Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MekK	MAP-Kinase-Kinase-Kinase
MHC	major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
MLR	mixed lymphocyte reaction, allogener Lymphozytentransformationstest
NER	Nuclear Extraction Reagent, nukleäre Extraktionsreagenz

NES	Nukleäres-Export-Signal
NF	nuclear factor, nukleärer Faktor
NFAT	nuclear factor of activated T cells, nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NFKB	nuclear factor kappa B, nukleärer Faktor kappa B
mAk	monoklonaler Antikörper
PBMC	peripher blood mononuclear cell, Monoklonale Zellen des peripheren Blutes
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phytoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-Myristat-Azetat
RAST	Radio-Allergo-Sorbent-Test
Rel	Komponente von NFX
rh	rekombinant human
RNA	Ribonucleinacid, Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription
SEM	Standart error of the mean, Standartfehler
SRR	Serin-reiche-Region
SSC	side scatter, Seitwärtsstreulicht
STAT	signal transducer and activator of transcription, Signalumwandler und Transkriptionsaktivator
T-bet	T-Box-Transkriptionsfaktor
TCR	T cell receptor, T-Zell-Rezeptor
TGF	transforming growth factor, transformierender Wachstumsfaktor
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF	tumor necrosis factor, Tumornekrosefaktor

1 Einleitung

1.1 *Calcineurinantagonisten: Ciclosporin A und Tacrolimus (FK506)*

Die Pilzmetabolite Ciclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK506) gehören zu den potentesten Immunsuppressiva der heutigen Zeit. Nach der Entdeckung des CsA im Jahr 1976¹ und seiner klinischen Zulassung 1983, revolutionierte CsA das Gebiet der Organtransplantation. Kurze Zeit darauf berichteten Kino et al.² (1987) von der Entdeckung Tacrolimus', das 1989 in die klinische Erprobung eingeführt wurde. Trotz der fehlenden strukturellen Verwandtschaft, ähneln sich die Wirkungsmechanismen der beiden Immunsuppressiva sehr: Beide hemmen in geringen Konzentrationen die calciumabhängige Serin/Threoninphosphatase Calcineurin und ihr Substrat, den Transkriptionsfaktor NFAT³.

Chemisch handelt es sich bei CsA um ein neutrales, zyklisches Polypeptid, bestehend aus elf Aminosäuren, mit stark hydrophobem Charakter. Es wird von dem Pilz *Tolypocladium inflatum* produziert, der erstmals 1970 in Norwegen entdeckt wurde. Aufgrund seiner immunsuppressiven Wirkung findet CsA Einsatz in der Transplantationsmedizin, bei der Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen der Gelenke, des Gastrointestinaltraktes, aber auch des Hautorgans, wie beispielsweise bei der atopischen Dermatitis und der Psoriasis. Für Transplantatempfänger gelten Talblutspiegel zwischen 100 und 200ng/ml als therapeutisch wirksam⁴. Neben der systemischen Gabe ist aber auch eine topische Anwendung möglich. Für die dermatologische Anwendung wird eine routinemäßige Bestimmung der Talblutspiegel nicht empfohlen, da Untersuchungen bei Psoriasispatienten ergaben, dass keine Korrelation zwischen der klinischen Wirksamkeit und den gemessenen Talblutspiegeln besteht. Auch zeigten sich therapeutische Effekte bei unter der Nachweisgrenze liegenden Talblutspiegeln⁴.

Tacrolimus ist ein Makrolid-Lakton-Antibiotikum, das erstmals aus dem Bodenzpilz *Streptomyces tsukubaensis* isoliert wurde. Als immunsuppressive Substanz ist es 50-100 mal stärker wirksam als CsA⁵.

Ein weiterer Calcineurinantagonist ist beispielsweise das strukturverwandte Pimecrolimus (ASM981), dessen topische Anwendung unter dem Präparatnamen „Elidel-Creme“ mittlerweile weit verbreitet ist.

1.1.1 Wirkungsmechanismus der Calcineurinantagonisten

Der Wirkungsmechanismus der Calcineurinantagonisten ist gut dokumentiert^{6,7}. Obwohl CsA und Tacrolimus beide die Phosphatase Calcineurin hemmen, besitzen sie völlig unterschiedliche Strukturen und wirken respektive über verschiedene intrazelluläre Proteine, die Cyclophiline bzw. die FK506-bindenden Proteine (FKBP's)³.

CsA wird vermutlich über einen Rezeptor an der Zelloberfläche gebunden und anschließend in das Zytosol transportiert. Dort bindet es an Cyclophilin A aus der Gruppe der Immunophiline⁸. Das wichtigste Bindungsprotein für Tacrolimus ist FKBP12, welches strukturell nicht mit den Cyclophilinen verwandt ist. Diese Substanz-Immunophilin-Komplexe (CsA-Cyclophilin A und Tacrolimus-FKBP12) lagern sich an die Calciumphosphatase Calcineurin an und hemmen auf diese Weise deren enzymatische Aktivität⁹. Aktiviertes Calcineurin setzt normalerweise eine begrenzte Anzahl von Substraten um. U.a. ist es für die Dephosphorylierung des zytosolischen Teils NFAT's („*nuclear factor of activated T-cells*“) verantwortlich, welche zur Demaskierung des nukleären Importsignales und schließlich zur Translokation von NFAT in den Kern führt. Dort verbindet sich der zytosolische mit dem nukleären Teil zum aktiven NFAT-Molekül. CsA hemmt somit die Aktivierung des NFAT-Signalweges. Folglich verbleibt NFAT im Zytoplasma und kann die Gene, die für die T-Zell-Aktivierung erforderlich sind, nicht mehr aktivieren^{10,11,12}.

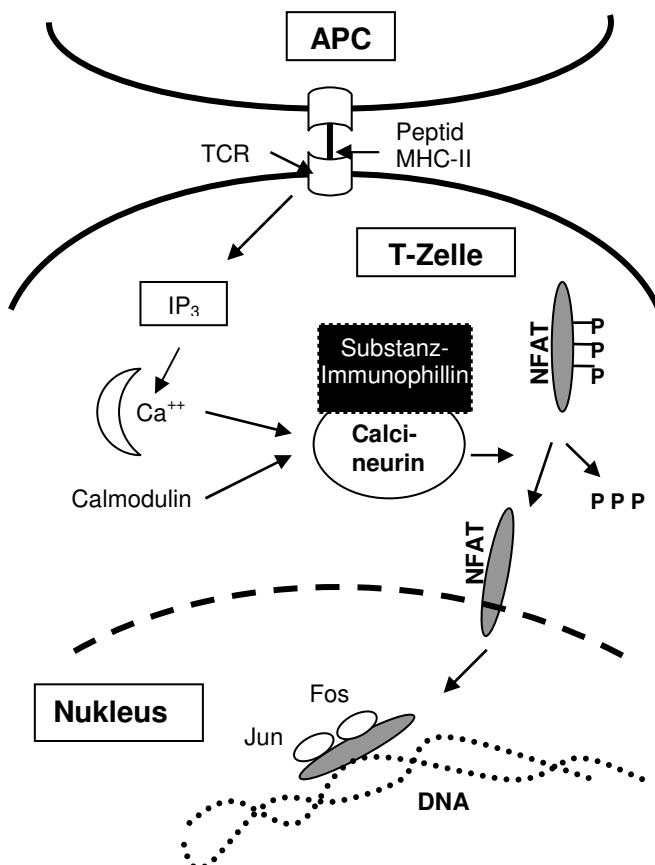


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der T-Zell-Aktivierung und des Wirkungsmechanismus der Calcineurinantagonisten.

CsA wirkt als Calcineurinantagonist, indem es im Zytosol an Cyclophilin bindet. Dieser CsA-Cyclophilin-Komplex lagert sich an Calcineurin an, wodurch NFAT, der „nuclear factor of activated T-cells“, nicht mehr dephosphoryliert werden kann. Die Demaskierung des nukleären Importsignales und die Translokation NFAT's in den Zellkern bleibt daher aus. Folglich kommt es zu einer starken Verminderung bzw. Ausbleiben der entsprechenden Gentranskription. Da T-Zellen Calcineurin nur in geringfügigen Mengen exprimieren, sind sie für eine Hemmung dieses Weges anfälliger als viele andere Zelltypen.

NFAT findet sich nicht nur, wie der Name vermuten lässt, in T-Zellen, sondern auch in B-Zellen, NK-Zellen, Mastzellen und Monozyten sowie in Zellen, die nicht zum hämatopoetischen System gehören¹³. Weil T-Zellen Calcineurin allerdings nur in geringfügigen Mengen exprimieren, sind sie für eine Hemmung dieses Weges anfälliger als viele andere Zelltypen. CsA blockiert daher effizient die T-Zell-Aktivierung, so dass sich die Nebenwirkungen auf andere Zellen und Gewebe in Grenzen halten.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass CsA und Tacrolimus ebenfalls den Jnk- und p38-Stoffwechselweg hemmen. Diese inhibitorische Wirkung wird über die Substanz-Immunophilin-Komplexe unabhängig von Calcineurin vermittelt^{14,15}. Schon aus früheren Berichten geht hervor, dass CsA und Tacrolimus die antigenspezifische Signalgebung einer T-Zell-Linie, unabhängig von Calcium/Calcineurin zu hemmen vermögen^{16,17}. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die immunsuppressive Wirkung der Calcineurinantagonisten neben der Inhibierung des Calcineurin/NFAT-Signalweges, zumindest teilweise, auch durch eine Hemmung des JnK- und p38-Signalweges vermittelt wird¹⁵.

Calcineurin ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym, das an vielen calciumabhängigen Prozessen beteiligt ist und neben NFAT viele andere Substrate besitzt¹⁷. Einige dieser Enzyme und Transkriptionsfaktoren sind wahrscheinlich an der Genexpression in aktivierten Immunzellen beteiligt. So dephosphoryliert und inaktiviert Calcineurin beispielsweise direkt den Transkriptionsfaktor Elk-1^{19,20}. Calcineurin reguliert weiterhin die NFκB-Aktivität in T-Zellen, wo es an der Aktivierung der IκB-Kinase (IKK), IκB-Degradierung und dem nukleären Auftreten von NFκB p50, c-Rel und RelA beteiligt ist^{21,22}. Es moduliert indirekt die Aktivität des Transkriptionsfaktors CREB²³ und kooperiert mit PKC-θ, um Jnk zu aktivieren²⁴. Zusammen mit Jnk-Kinasen stabilisiert Calcineurin synergetisch IL-2- und IL-3-mRNA in T-Zellen bzw. Mastzellen^{25,26}. Aramburu et al. stellten allerdings auch fest, dass CsA und/oder FK506 die Aktivität von Transkriptionsfaktoren unabhängig von Calcineurin beeinflussen¹⁸. Beispielsweise bindet das Cyclophilin Cyp-40 c-Myb und inhibiert dessen DNA-Bindung. Dieser Vorgang kann durch CsA blockiert werden²⁷.

Immunologische Wirkung von CsA und Tacrolimus	
Zelltyp	Wirkung
T-Lymphozyt	verminderte Expression von IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, TNF-α ; verminderte Zellteilung nach der Abnahme der IL-2-Produktion; verminderte Ca ²⁺ -abhängige Exozytose von Granula-assoziierten Serinesterasen; Hemmung der durch Antigene ausgelösten Apoptose
B-Lymphozyt	Hemmung der Zellteilung als Folge der verminderten Zytokinproduktion durch die Th-Lymphozyten; Hemmung der Zellteilung nach dem Besetzen von Immunoglobulinen an der Zelloberfläche durch Liganden; Induktion der Apoptose nach Aktivierung der B-Lymphozyten
Granulozyt	verminderte Ca ²⁺ -abhängige Exozytose von Granula-assoziierten Serinesterasen

Tabelle 1.1: CsA und Tacrolimus hemmen die von Lymphozyten sowie einige der von Granulozyten hervorgerufenen Effekte¹³.

1.1.2 Widersprüchliche Ergebnisse zum Einfluss CsA auf die IFN- γ -Konzentration von T-Lymphozyten

Shiohara et al. berichteten bereits 1994 über zwei Patienten mit schwerer atopischer Dermatitis, welche systemisch mit CsA (5mg/kg/d) behandelt und deren Serumspiegel von IL-1 α , IFN- γ und TNF- α regelmäßig über einen Zeitraum von sechs Wochen gemessen wurden²⁸. Erste klinische Erfolge stellten sich bereits nach ein bis zwei Wochen ein. Die therapeutischen Effekte schienen dabei invers mit den Serum-IFN- γ -Spiegeln zu korrelieren, denn in beiden Fällen war nach einer Woche ein schneller Anstieg des Serum-IFN- γ festzustellen, während die Spiegel von IL-1 α unverändert blieben und die des TNF- α abfielen.

Vorherige Studien hatten bis dahin deutlich demonstriert, dass in vitro die Zugabe von CsA zu Lymphozyten, die zuvor mit Mitogenen oder Antigenen stimuliert worden waren, zu einer kompletten Inhibition der IFN- γ -Produktion führt²⁹. Auch Shiohara et al. hatten zuvor selbst berichtet, dass oral verabreichtes CsA die Produktion von IFN- γ bei Psoriasispatienten hemmt³⁰.

In Anbetracht der Beobachtung, dass sich während einer Therapie von Patienten mit atopischer Dermatitis mit rhIFN- γ klinische Erfolge einstellten^{31,32}, vermuteten Shiohara et al., dass der Anstieg des Serum-IFN- γ -Spiegels während der Behandlung mit CsA zum Teil zum klinischen Erfolg beigetragen haben könnte. Eine weitere Überlegung war, dass es sich bei dem IFN- γ -Anstieg möglicherweise auch um eine Konsequenz des klinischen Erfolgs handelte.

Rafiq et al. untersuchten 1998 den in vitro-Effekt von CsA auf die IFN- γ -Produktion humaner Lymphozyten³³. Die Aktivierung dieser Zellen erfolgte mit anti-CD3-Ak als erstem Stimulus, während stabil mit CD80 bzw. CD86 transfezierte P815-Zellen das kostimulatorische Signal lieferten. Unter diesen Bedingungen konnte sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene eine deutliche Stimulation der Produktion von IFN- γ durch CsA (400ng/ml) gezeigt werden. Der Einsatz von anti-CD3-Ak oder Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) in Kombination mit Ionomycin als erster Stimulus zusammen mit einer Kostimulation entweder über CD28 oder CD2 mit entsprechenden Liganden (CD54) auf transfezierten Zellen demonstrierte, dass die Resistenz der IFN- γ -Produktion gegenüber einer Inhibition durch CsA sowohl eine starke CD3- (2 μ g/ml) als auch eine CD28-Triggerung (P815/CD80/T-Zell-Ratio = 0.5) erfordert. Die Autoren diskutierten, dass CD3-abhängig getriggerte PKC- und calciumunabhängigen Signalwege zusammen mit dem von CD28 ausgehendem Signalweg für die CsA-Resistenz der IFN- γ -Produktion verantwortlich sind. Die Gruppe konnte auch eine Suppression der IL-10-Produktion und zu einem geringeren Grad auch der von IL-4 durch CD4⁺-T-Zellen bei

Inkubation mit CsA feststellen. Das IL-4-Gen wird, wie bereits erwähnt, fast vollständig durch NFAT kontrolliert³⁴. Die Produktion von IL-10 ist zwar ebenso von einem intrazellulären Calciumanstieg abhängig³⁵, wird aber auch über einen PKC- und calciumunabhängigen Signalweg reguliert³⁶. Weiterhin konnten MLR-Experimente³⁷ und Versuche in vivo³⁸ einen regulatorischen Effekt von IL-10 auf die IFN- γ -Produktion zeigen. Für IL-4 wird eine ähnliche, aber weniger bedeutsame Rolle vermutet. In Übereinstimmung mit Daten, die von Tanaka et al.³⁹ veröffentlicht wurden, führt rh-IL-4 zu einer Reduktion der IFN- γ -Produktion. IL-4 und IL-10 zusammen konnten in der Arbeit von Rafiq et al. die durch CsA induzierte Produktion von IFN- γ inhibieren. Übereinstimmend damit resultierte eine Blockade der Rezeptoren von IL-4 und IL-10 mit anti-IL-4R bzw. anti-IL-10R in einer gesteigerten Produktion des Th1-Zytokins. Rafiq et al. schlussfolgerten daraufhin, dass der Wegfall dieses endogenen suppressiven Signales, insbesondere von IL-10, für den Anstieg der IFN- γ -Produktion in der Gegenwart von CsA verantwortlich ist. Es sei allerdings nicht klar, wie IL-4 und IL-10 suppressiv wirken sollen. Bisher konnte lediglich in Makrophagen demonstriert werden, dass IL-4 die NF κ B-Aktivität hemmt und IL-10 die Stabilität der mRNA vermindert⁴⁰.

Ein steigender Effekt von CsA auf die Zytokin-Produktion von T-Zellen, die über CD28 kostimuliert worden waren, wurde bereits für die Produktion von IL-5⁴¹, IL-13⁴² und TGF- β ⁴³ beschrieben. In keiner dieser Studien wurde von einem steigenden Effekt von CsA auf die IFN- γ -Produktion berichtet. In Experimenten von Schandené et al. wurde sie sogar teilweise durch CsA eingeschränkt⁴¹.

Pacocha et al.⁴⁴ publizierten kurze Zeit darauf eine Studie über den Effekt der Calcineurinantagonisten CsA und FK506 auf die Proliferation und Zytokinausschüttung von antigenstimulierten humanen PBMC und nichttransformierten antigenspezifischen humanen Th0-, Th1- und Th2-Klonen. Sie stellten fest, dass die durch Ragweed und Tetanus induzierte Proliferation von PBMC ebenso wie die der T-Zellklone sowohl durch CsA als auch durch FK506 herunterreguliert wurde. Die Genexpression der proinflammatorischen Zytokine IL-4, IL-5, IL-13 und IFN- γ , analysiert mittels PCR, und ihre durch ELISA ermittelte Sekretion, wurden ebenfalls konzentrationsabhängig durch beide Calcineurinantagonisten inhibiert. Lediglich die IL-5-Produktion von Th0- und Th2-Klonen reagierte weniger sensitiv auf die Immunsuppressiva.

Neben dieser Studie existieren noch zahlreiche andere Untersuchungen, welche die Reduktion der IFN- γ -Produktion durch CsA demonstrieren. Batiuk et al.^{45,46} berichteten über eine CsA-induzierte Inhibition von IFN- γ in OKT3-stimulierten humanen PBMC. Briscoe et al. beobachteten eine CsA-induzierte Hemmung einer mitogenstimulierten Produktion von IFN- γ durch T-Zellen in der Gegenwart kostimulatorischer Signale durch endotheliale Zellen⁴⁷.

Auch Iacono et al. beschrieben eine durch CsA verursachte Verminderung der IFN- γ -Spiegel sowohl im Serum- als auch in bronchioalveolärer Lavage von Lungentransplantatempfängern mit akuter Abstoßungsreaktion⁴⁸. 1996 demonstrierten Pazderka et al., dass die Sensitivität von Zellen gegenüber Calcineurinantagonisten mit der Qualität und Quantität des Aktivierungssignales variieren kann⁴⁹.

In einer Studie von Dumont et al.⁵⁰ wurden die Effekte einer Unterbrechung des Mek/Erk-Signalweges durch PD98059 und des Calcineurinsignalweges, gehemmt durch Einsatz von FK506, auf die Zytokinproduktion humaner T-Lymphozyten verglichen, die mit anti-CD3-Ak (0,4 μ g/ml) plus PMA (0,1, 0,3 und 1ng/ml) bzw. plus anti-CD28-Ak (0,1 und 0,4 μ g/ml) stimuliert worden waren. Beide Pharmaka supprimierten die durch anti-CD3-Ak induzierte T-Zell-Proliferation. Dieser Effekt war durch exogen zugeführtes IL-2 reversibel, was die Autoren schließen ließ, dass PD98059 und FK506 vielmehr die Produktion als das Ansprechen auf wachstumsfördernde Zytokine beeinflussen. Folglich wurde die IL-2-Produktion von T-Zellen, aktiviert mit anti-CD3-Ak plus PMA bzw. anti-CD28-Ak, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene durch beide Pharmaka gehemmt, von PD98059 allerdings nie vollständig, was die Beteiligung weiterer Signalwege vermuten lässt. Die Produktion anderer Zytokine beeinflussten sie dagegen unterschiedlich, abhängig von der Art der Aktivierung. PD98059 inhibierte die Produktion von TNF- α , IL-13, GM-CSF, IFN- γ und in geringerem Maße die von IL-6 und IL-10, steigerte aber die von IL-4, IL-5 und IL-13. Dies galt sowohl für eine Aktivierung mit anti-CD3-Ak/PMA als auch mit anti-CD3/-CD28-Ak. Der Anstieg von IL-4, entscheidend für die Entwicklung von Th2-Lymphozyten, im Gegensatz zur Unterdrückung des klassischen Th1-Zytokins IFN- γ , ließ die Autoren darauf schließen, dass PD98059 die Differenzierung von Th2-Zellen begünstigt. Die Hochregulation von IL-5, IL-13 und bei niedrigen Konzentrationen auch die von IL-10 unterstützte diese Vermutung.

Dagegen unterdrückte FK506 die anti-CD3-Ak/PMA-induzierte Produktion aller untersuchten Zytokine, die von IL-13 allerdings in geringerem Ausmaße. Auch bei einer Stimulation mit anti-CD3/-CD28-Ak reduzierte FK506 die Produktion der Zytokine IL-3, IL-4, IL-10, TNF- α und IL-6, steigerte aber die von GM-CSF, IL-5, IFN- γ und IL-13. Die IFN- γ -Produktion, gemessen im ELISA, wurde auf das fünffache gesteigert. Ein Anstieg der IFN- γ -mRNA-Expression, induziert durch anti-CD3/-CD28-Ak, konnte ebenfalls gezeigt werden. Wie zuvor erwähnt, wurde die Steigerung der IL-5⁴¹ und IL-13⁴²-Produktion durch CsA bei vorhandener Kostimulation mit CD28 bereits beschrieben.

Dumont et al. vermuteten weiterhin, dass der Mek/Erk/Elk-Signalweg für die Induktion der IL-2-Produktion bei der T-Zell-Aktivierung wichtig sei. Dieser Signalweg könne zu einer Regulation der c-fos-Expression beitragen⁵¹, einer Komponente von AP-1 (vergleiche 1.2.3), die NFAT ergänzt, um Komplexe höherer Ordnung zu bilden, die fähig sind, an den IL-2-Promotor zu binden und diesen zu aktivieren⁵².

1.2 *NFAT (nuclear factor of activated T-cells)*

Naive T-Zellen werden durch Bindung eines Antigens an den T-Zell-Rezeptor (TCR), begleitet von kostimulatorischen Signalen wie B7-Molekülen, die über CD28 und CTLA-4 vermittelt werden, aktiviert⁵³. Die Reaktion von Lymphozyten auf extrazelluläre Signale resultiert letztlich in der Expression von Genen, die für eine Lymphozytenproliferation und Ausschüttung von Zytokinen notwendig sind⁵³. Dies geschieht durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die den Start der Transkription steuern, indem sie an Promotor innerhalb der DNA binden.

1.2.1 NFAT-Isoformen

Bisher wurden fünf verschiedene Mitglieder der NFAT-Familie identifiziert. Die klassischen Mitglieder umfassen NFAT1⁵⁴, NFAT2⁵⁵, NFAT3⁶ und NFAT4^{56,57}, denen die Fähigkeit der Calcineurinantagonisierung gemeinsam ist. NFAT5, auch bekannt als TonEBP, konnte 1999 in zwei voneinander unabhängigen Laboren geklont werden^{58,59}. Alle NFAT-Proteine besitzen eine DNA-Bindungs-Domäne, welche eine starke strukturelle Ähnlichkeit mit der DNA-Bindungs-Domäne („*Rel homology region*“) der Rel/NFκB-Transkriptionsfaktoren zeigt^{60,61,62,63} und eine regulatorische Domäne⁵², an welche die Bindung Calcineurins erfolgt. Innerhalb dieser Domäne hat das Sequenzmotiv PxIxIT einen großen Anteil an der Calcineurinbindung, so dass eine Inhibition der Interaktion von PxIxIT und Calcineurin, wie sie in Jurkat-Zellen demonstriert wurde, eine größere Selektivität als CsA und damit auch weniger Nebenwirkungen zeigt^{64,65,66}. Trotz der strukturellen Verwandtschaft mit den anderen Familienmitgliedern, besitzt NFAT5 verschiedene Charakteristika, die es von den klassischen NFAT-Transkriptionsfaktoren unterscheidet. So ist NFAT5 aufgrund der fehlenden regulatorischen Domäne unabhängig von einer Aktivierung durch Calcineurin und unfähig, mit AP-1-Transkriptionsfaktoren kooperative Komplexe einzugehen^{58,59}. NFAT5 vermittelt das Spektrum an Zellantworten auf osmotischen Stress. Obwohl NFAT1 bis 4 aus der cDNA von T-Zellen isoliert werden können, wird hauptsächlich das NFAT1-Protein in frisch isolierten peripheren T-Lymphozyten exprimiert, wenn auch die Bildung von NFAT2 induzierbar ist⁶⁷. NFAT1, 2 und 4 sind hauptsächlich in Zellen des Immunsystems zu finden, wo sie eine Schlüsselrolle bei der Regulierung der zahlreichen induzierbaren Gene während der Immunantwort spielen⁶⁸. So zeigen Mäuse mit einem Mangel sowohl an NFAT1 als auch NFAT4 einen auffällig allergischen Phänotyp, was darauf schließen lässt, dass diese beiden Proteine die Produktion von Zytokinen unterdrücken, welche die Entwicklung von Allergien kontrollieren⁶⁹. Im Gegensatz dazu sind T-Zellen mit einem Mangel an NFAT1 und 2 im wesentlichen unfähig, Zytokine zu produzieren, während die B-Zellen dieser Mäuse hyperproliferieren, was eine Rolle von NFAT bei der Unterdrückung von B-Zell-Antworten

vermuten lässt⁷⁰. Kiani et al. konnten ebenfalls in vivo zeigen, dass NFAT1 ein Hauptregulator der IFN- γ -Produktion ist. T-Zellen mit einem Defizit an NFAT1 zeigen einen Defekt der Expression der IFN- γ -mRNA sowie des -Proteins. Außerdem ist die IFN- γ -Produktion muriner T-Zellklone sensitiv gegenüber dem selektiven Peptid-Inhibitor NFAT's VIVIT. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die IFN- γ -Produktion der T-Zellen durch NFAT1 reguliert wird⁷¹.

1.2.2 NFAT-Aktivierung

Die Funktion NFAT's wird über seine Position in der Zelle gesteuert. NFAT besitzt in seiner Aminosäuresequenz Motive, die ein Lokalisierungssignal für den Zellkern enthalten, aufgrund dessen es in den Kern transportiert werden kann, sowie ein Signal für den Export aus dem Kern zurück ins Zytosol (siehe auch Abb.1.1). In unstimulierten Zellen ist das Kernlokalisierungssignal aufgrund einer Phosphorylierung von Serin/Threoninresten unwirksam.

1.2.2.1 Calcium-Influx infolge Stimulation und Interaktion von Calcineurin mit NFAT

Bei der T-Zell-Aktivierung über den TCR führt Phospholipase C (PLC)- γ zu einer Freisetzung von Inositol-Triphosphat (IP₃) aus der Plasmamembran. IP₃ setzt Calcium aus dem Endoplasmatischen Retikulum frei. Dies führt schließlich zur Öffnung eines membranären Calciumkanals, welcher als der durch Calcium-Ausschüttung aktivierte Calcium-Kanal (CRAC)^{72,73,74} identifiziert wurde. Durch den Anstieg des freien Ca²⁺ wird Calcineurin, eine Serin/Threoninphosphatase, aktiviert und dephosphoryliert den zytosolischen Teil von NFAT (cNFAT)^{10,75,11}, was zur Freilegung des Kernlokalisierungssignales führt. Dieses nukleäre Lokalisierungssignal (NLS) befindet sich wie das PxIxIT-Motiv in der regulatorischen Domäne NFAT's innerhalb einer Serin-reichen-Region (SRR). Im inaktiven Zustand ist die regulatorische Domäne an den Serinresten phosphoryliert, während sie bei Calcineurinaktivierung infolge Stimulation dephosphoryliert ist^{10,75,11}.

Eine optimale NFAT-Aktivierung erfolgt bei langsamem Anstieg des intrazellulären Calciums, während durch große Peaks vielmehr andere Signalwege und Transkriptionsfaktoren wie Jnk und NF κ B aktiviert werden und die nukleäre Translokation von NFAT nicht effektiv induziert wird^{76,77}. 1995 beschrieben Le Deist et al. einen Fall schwerer Immundefizienz, die auf einen defekten Calciuminflux in T- und B-Zellen sowie in Granulozyten, Thrombozyten und Fibroblasten zurückzuführen war. Die T-Zellen des Patienten zeigten eine starke Reduktion der NFAT-Aktivierung und schwere Defekte in der Zytokinproduktion⁷⁸.

1.2.2.2 Nukleärer Import und DNA-Bindung

Dephosphoryliertes cNFAT dringt in den Zellkern ein und verbindet sich dort mit dem nukleären Teil zum aktiven Transkriptionsfaktor. Neben dem Import in den Zellkern reguliert Calcineurin die DNA-Bindungsaffinität von NFAT⁷⁹⁻⁸¹, indem es eine wahrscheinlich inhibitorische Interaktion zwischen der Serin-reichen-Region innerhalb der regulatorischen Domäne und der DNA-Bindungs-Domäne durch die Dephosphorylierung NFAT's auflöst, wie Beals et al. für NFAT2 demonstrieren konnten⁸¹. Zusätzlich erfolgen im Kern vor der DNA-Bindung noch posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierungen und Acetylierungen, sowie nukleäre Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren oder Koaktivatoren wie p300 und CBP („CREB-binding protein“), was eine Erhöhung der Transkriptionsaktivität zur Folge hat^{82,83}.

1.2.2.3 Interaktion mit Partnerproteinen

Im Nukleus bindet NFAT an die regulatorischen Regionen seiner Zielgene. Eine optimale Bindung und Transkriptionsaktivierung erfordern allerdings eine kooperative Bindung mit anderen Transkriptionsfaktoren an die DNA.

Eine gut charakterisierte kooperative Interaktion stellt die zwischen NFAT und AP-1 (Fos/Jun) dar⁶⁰, die nachfolgend noch näher dargestellt werden soll. In der Nähe des IFN- γ -Promotors befindet sich eine Bindungsstelle für AP-1, was die Theorie der kooperativen Interaktion zwischen NFAT und AP-1 unterstützt⁸⁴. Diese Interaktion ereignet sich demnach an benachbarten DNA-Abschnitten, und die Moleküle, die an der Interaktion beteiligt sind, finden sich bei allen NFAT-Molekülen.

„Large-scale cross-species DNA sequence comparison“ ist inzwischen eine wirksame Methode zur Identifizierung von „conserved regulatory modules of genes“. Lee et al.⁸⁴ nutzten eine Kombination aus bioinformatischer und DNase1-Hypersensitivitätsanalyse, um eine neue regulatorische Region innerhalb des IFN- γ -Gens zu identifizieren. Sie lokalisierten eine „highly conserved non-coding sequence“ (CNS), ~5kb 5' vom Startpunkt der Transkription entfernt. Die 5' CNS (>400bp) zeigte sowohl eine basale als auch induzierte DNase1-Hypersensitivität in Th1-, nicht aber in Th2-Zellen, welche kein IFN- γ produzieren. Sequenzanalysen offenbarten das Vorhandensein zahlreicher Bindungsstellen für drei relevante Transkriptionsfaktoren: den Th1-beschränkten T-Box-Transkriptionsfaktor T-bet sowie für NFAT und AP-1, deren Bindung an die CNS sich, in ruhenden wie in stimulierten Zellen, durch Chromatin-Immunoprecipitation-Assays bestätigen ließ. Durch Reporter-Assays konnte zusätzlich die funktionelle Enhancer-Aktivität der CNS nachgewiesen werden.

Bisher erfolgte noch keine Untersuchung, ob zwischen NFAT und T-bet, der wichtig für die Entwicklung einer Th1-Immunantwort und IFN- γ -Produktion ist⁸⁵, eine Kooperation an regulatorischen Regionen des IFN- γ -Gens existiert.

Neben einer kooperativen Bindung von NFAT mit AP-1 an der DNA, kann NFAT auch Rel/NF κ B-ähnliche Dimere an bestimmten NFAT-bindenden DNA-Elementen bilden^{86,87,88}.

Es ist weiterhin bekannt, dass auch NFκB, dessen Aktivierung calciumunabhängig über CD28 verläuft, als Transkriptionsfaktor am IFN-γ-Gen fungiert⁸⁹. Weitere nukleäre Partner sind die GATA-Proteine. Basierend auf Versuchen von Musaro et al. an Myoblasten⁹⁰ wird eine GATA2-NFAT2-Interaktion vermutet, wohingegen Molkenkin et al. eine Interaktion von GATA4 mit NFAT3 in einem „*Yeast-two-hybrid-assay*“ beobachteten⁹¹. Außerdem sind GATA3 und NFAT beide an der Transkription des IL-5-Gens beteiligt^{52,92,93}, auch wenn eine Interaktion in diesem Fall noch nicht bewiesen werden konnte. Ob an der NFAT-GATA-Interaktion auch konservierte Regionen beteiligt sind, die es ermöglichen würden, dass jedes NFAT-Protein mit jedem beliebigen in derselben Zelle exprimierten GATA-Protein interagieren könnte, ist noch ungeklärt. Sica et al. identifizierten eine neue c-Rel-Bindungsstelle (C3), welche innerhalb einer „*IFN-γ intronic-enhancer-region*“ lokalisiert ist und eine Sequenzhomologie sowohl mit NFAT- als auch NFκB-Bindungsstellen aufzeigt⁹⁴. Später gelang es ihnen, eine funktionelle Kooperation zwischen der „*intronic*“ c-Rel-Stelle C3 und neu identifizierten C3-verwandten Stellen (C3-1P und C3-3P) sowie einer neuen NFκB-(IFN-γκB)-Stelle innerhalb der Promotorregion nachzuweisen⁹⁵. Neben der Bindung von NFκB p50/p65 bindet die C3-3P-Stelle auch NFATc-Proteine, ähnlich der IL-4NF(p)-Stelle, an die ebenfalls NFκB und NFAT binden können⁹⁶. Dies unterstreicht die Erkenntnis, dass das NFATc-Phosphoprotein ein entfernter Verwandter der Rel/NFκB-Proteine ist^{62,55}. NFκB- und NFAT-Proteine können also, obwohl sie aus unterschiedlichen, voneinander unabhängigen Signalwegen hervorgehen, ihre Transkriptionsaktivität durch gemeinsame Enhancer-Elemente ausüben und sind beide an der Kontrolle der IFN-γ-Gentranskription beteiligt. Zusätzlich haben Xu et al. STAT-Bindungsstellen ganz in der Nähe des „*intronic*“ C3-Elementes identifiziert⁹⁷, so dass auch eine Kooperation zwischen STAT-Proteinen und NFκB für eine weitere Steigerung der IFN-γ-Gentranskription möglich scheint.

Es wäre eine interessante Ansatzmöglichkeit, durch eine Inhibition der Interaktion von NFAT mit nukleären Proteinen wie AP-1 oder GATA usw. oder nukleären Koaktivatoren wie p300 und CBP die Immunantwort pharmakologisch zu beeinflussen, besonders wenn ein Großteil der NFAT-Funktionen in nicht zum Immunsystem gehörigen Zellen durch andere Partner kontrolliert würde⁹⁸.

1.2.2.4 Nukleärer Export

Damit NFAT im Nukleus verbleiben kann, sind regelmäßige Signale durch Calcium und eine kontinuierliche Calcineurinaktivität erforderlich^{99,11,12}. Eine Unterbrechung führt zur Rephosphorylierung NFAT's, gefolgt von dessen nukleärem Export. Es gibt verschiedene Nukleäre-Export-Signale (NES) innerhalb der regulatorischen Domäne, die allerdings nicht in gleicher Weise in allen NFAT-Proteinen vorhanden sind. Als Exportrezeptor für NFAT konnte CRM-1 identifiziert werden^{100,101}. Es ist unklar, ob NFAT von denselben Kinasen rephosphoryliert wird, welche auch in ruhenden Zellen für den inaktiven Zustand des Transkriptionsfaktors verantwortlich sind, oder durch induzierbare, durch die Stimulation

aktivierte Kinasen inaktiviert wird. Vier NFAT-Kinasen wurden bisher identifiziert: Glycogen-Synthase-Kinase-3 (GSK3), wie Beals et al. 1997 für NFAT2¹⁰² und Graef et al. 1999 für NFAT3¹⁰³ zeigen konnten. Zhu et al. berichteten, dass die Casein-Kinase-1 α (CK1 α) großen Anteil an der Regulation des nukleären Shuttles von NFAT4 hat⁶⁶. Sie diskutierten ebenfalls, dass die MAP-Kinase-Kinase-Kinase Mekk1 die suppressiven Effekte von Serum auf die NFAT-Dephosphorylierung und nukleäre Translokation in Zellkulturen vermittelt⁶⁶. Von Chow et al. wurde berichtet, dass die Jnk2, eine durch Stress aktivierte MAP-Kinase, die nukleäre Akkumulation von NFAT4, aber nicht die der anderen NFAT-Proteine, inhibiert¹⁰⁴. Weiterhin scheinen mehrere Kinasen, wie auch die GSK3, an der Regulation der Ausschleusung aus dem Zellkern über die Phosphorylierung spezifischer Serine innerhalb des repetitiven Serin-Prolin-Motivs beteiligt zu sein¹⁰⁵. Signale, die durch den TCR sowie durch Kostimulation übermittelt werden, tragen dazu bei, die Aktivität der GSK3 herunterzuregulieren; somit verbleibt NFAT im Zellkern.

1.2.2.5 NFAT reguliert eine große Anzahl von Genen, die in aktivierten Immunzellen exprimiert werden

Dies schließt die Gene der Zytokine IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, IL-13, GM-CSF und IFN- γ , des klassischen Zytokins der Th1-Zelle ein, außerdem die der Zelloberflächenrezeptoren CD40L, FasL und IL-2R α (CD25) und den Transkriptionsfaktoren EGR3 in T-Zellen, CD5 und Ig κ in B-Zellen, IL-4, IL-5 und TNF- α in Mastzellen und schließlich TNF- α und GM-CSF in NK-Zellen⁵².

Zahlreiche ex vivo-Studien dokumentieren, dass ein Fehlen von NFAT1 und 2 in Zellen des Immunsystems, zur Unfähigkeit führt, die oben genannten Zytokine zu produzieren⁷⁰. Dies gilt auch für IFN- γ . Chromatin Immunoprecipitation Assays bekräftigen, dass NFAT1 in vivo selektiv an die IFN- γ -Promotorregion bindet. In Th2-Zellen ist diese NFAT-Bindung durch Änderungen in der Chromatinstruktur nicht möglich^{106,107,108}.

Es sind vier Fälle schwerer Immundefizienz bekannt, die jeweils mit einer starken Einschränkung der NFAT-Aktivität korrelierten^{109,78,110}. Die Patienten, die aus drei verschiedenen Familien stammten, fielen in ihrer Kindheit wegen rezidivierender Infektionen und einer Entwicklungsretardierung auf. In allen Fällen war der Phänotyp auf ein Syndrom multipler Zytokindefizienz zurückzuführen: Während die Aktivierung anderer Transkriptionsfaktoren normal verlief, waren die T-Zellen dieser Patienten unfähig, NFAT-Komplexe zu bilden, so dass die Zytokinexpression stark beeinträchtigt war. Die betroffenen Gene (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, TNF- α und IFN- γ) gehörten alle zu den potentiellen NFAT-Zielgenen.

1.2.3 AP-1-Transkriptionsfaktoren

NFAT hat eine relativ geringe Affinität zur DNA, so dass die Kombination mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie AP-1, erforderlich ist, um Promotoren wie die des IL-2-Gens zu aktivieren, die letztlich für die T-Zell-Aktivierung nötig sind. Für die Aktivierung der Proteinkinase C und die Steigerung der Bildung von AP-1-Komplexen im Nukleus ist die Kostimulation durch B7 ausgesprochen wichtig⁵.

1.2.3.1 Kostimulation: B7/CD28-Interaktion

Vor über 30 Jahren wurde die Zwei-Signal-Hypothese für die Aktivierung von T- und B-Lymphozyten aufgestellt. T-Helfer-Vorläuferzellen werden durch die Begegnung mit spezifischen Antigenen aktiviert. Diese Aktivierung erfordert nicht nur die Verbindung des TCR mit Peptiden, die im Kontext von Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden, sondern auch zahlreiche kostimulatorische Signale. Die Bindung von B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) an CD28 auf naiven Th-Zellen liefert das entscheidende Signal für die initiale Zellzyklusprogression, IL-2-Produktion und klonale Expansion. Die B7-Moleküle unterscheiden sich in der Kinetik bezüglich ihrer Bindung an CD28 und CTLA-4, dem Gegenspieler der CD28-vermittelten Kostimulation, ebenso wie in ihrer Expression auf APC. Während B7-2 permanent auf B-Zellen, DC und Makrophagen exprimiert wird und innerhalb weniger Stunden hochreguliert werden kann, findet sich B7-1 nicht auf naiven Zellen und wird auch erst nach 3-4 Tagen induziert. Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass B7-2-Interaktionen für die initiale T-Zell-Kostimulation erforderlich sind, wohingegen B7-1/CD28-Interaktionen eher bei der anhaltenden T-Zell-Aktivierung involviert sind. Zusätzlich gibt es Hinweise, dass B7-1 eher die Th1- und B7-2 die Th2-Antwort reguliert.

1.2.3.2 Entstehung von AP-1-Transkriptionsfaktoren

Die Signalgebung durch die Antigenrezeptoren der B- und T-Zellen führt zur Aktivierung des GEF („*guanine-nucleotide exchange factor*“) SOS, der das kleine G-Protein Ras aktiviert. Ras aktiviert die MAP-Kinasen-Kaskade, wobei Raf, Mek und Erk sich gegenseitig aktivieren. Erk phosphoryliert und aktiviert schließlich den Transkriptionsfaktor Elk, der in den Kern eindringt und dort besonders die Synthese des Transkriptionsfaktors Fos heraufreguliert.

Die Signalgebung durch den Korezeptor der B-Zelle oder den kostimulierenden Rezeptor CD28 der T-Zellen führt dazu, dass ein anderer GEF, Vav, aktiviert wird. Die Aktivierung von Vav löst eine weitere MAP-Kinasen-Kaskade aus, da Vav das kleine G-Protein Rac aktiviert, welches daraufhin nacheinander Mek, Jnk und Jnk aktiviert. Jnk („*JunN-terminal kinase*“) phosphoryliert und aktiviert schließlich Jun.

Die Kombination beider Effekte führt zur Bildung von AP-1-Transkriptionsfaktoren, Heterodimeren aus Fos und Jun¹³.

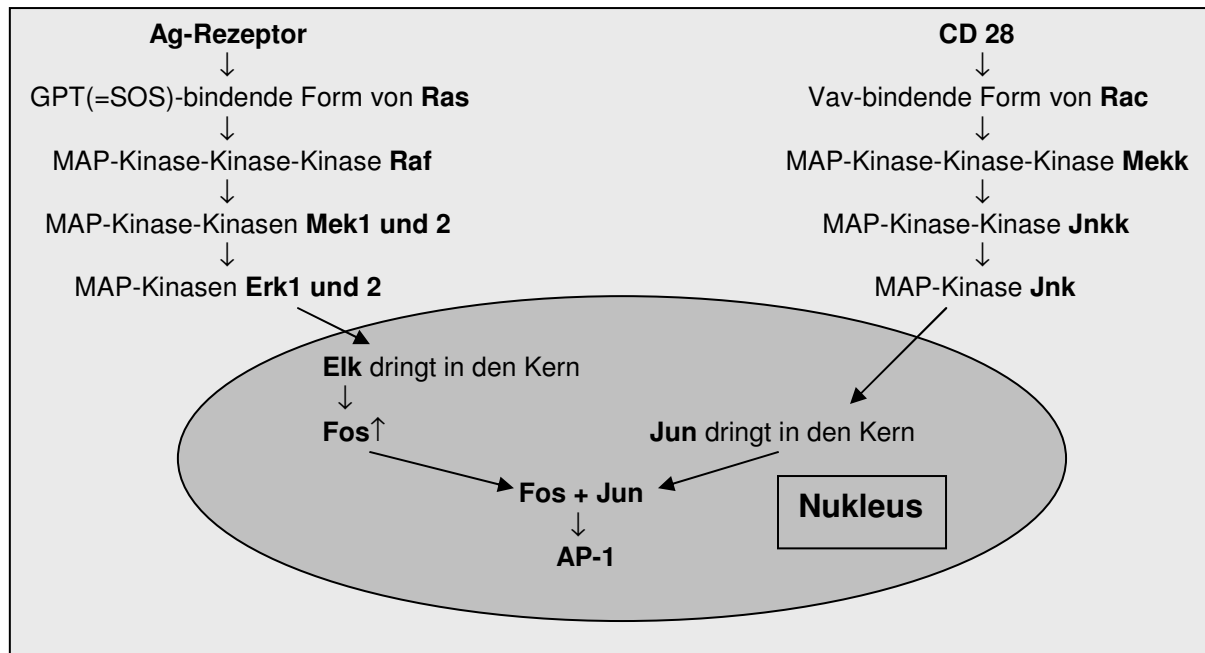


Abbildung 1.2: Am Start der MAP-Kinasen-Kaskaden ist sowohl eine Signalgebung des Antigenrezeptors als auch eine kostimulierende Signalgebung beteiligt.

Auch wenn die Signalwege zur Aktivierung von NFAT und AP-1 verschieden sind, gilt als erwiesen, dass zwischen ihnen „cross-talk“ vorkommen kann. So lassen beispielsweise Ergebnisse von del Arco et al. und Porter et al. erkennen, dass die MAP-Kinase p38 NFAT1 phosphoryliert und damit dessen nukleäre Lokalisation verhindert^{112,113}. Ebenso wurde über eine Phosphorylierung und Deaktivierung von NFAT2 durch p38 und Erk berichtet¹¹³. Desgleichen soll Jnk2 NFAT4 phosphorylieren und damit seine zelluläre Verteilung kontrollieren¹⁰⁴, auch wenn diese Ergebnisse direkt durch andere Arbeitsgruppen widerlegt wurden⁶⁶. Chow et al. fanden heraus, dass Jnk1 spezifische Reste innerhalb des Calcineurin-Ziel-Motivs PxIxIT von NFAT2 phosphoryliert und dadurch die NFAT2-Calcineurin-Interaktion verhindert^{114,115}.

Nichtsdestoweniger zeigen T-Zellen von Jnk1^{-/-}-Mäusen eine gesteigerte nukleäre Lokalisation von NFAT2, aber nicht von NFAT1, was die Theorie unterstützt, dass Jnk direkt oder indirekt die Aktivierung dieses NFAT-Familienmitglieds unterdrückt¹¹⁶. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigen T-Zellen ohne jegliche Jnk-Aktivität eine eher erhöhte als erniedrigte IL-2-Produktion¹¹⁷. Ein weiterer Punkt, in dem sich Jnk und NFAT ähneln, ist deren bereits erwähnte gemeinsame Aktivierung durch einen intrazellulären Calciumanstieg. Wie für NFAT gilt auch für Jnk, dass dessen Aktivierung durch CsA blockiert werden kann^{72,23}.

Garcia-Rodriguez und Rao, ebenso wie Okamura et al. entdeckten eine neue Phosphorylierungsstelle in der Transaktivierungsdomäne von NFAT1, die für die NFAT-

Aktivität von Bedeutung zu sein scheint^{118,119}. Diese Stelle war nur in Zellen phosphoryliert, die mit PMA und Ionomycin, nicht aber mit letzterem allein stimuliert wurden. Die verantwortliche Kinase ist noch nicht bekannt, allerdings gab es eine klare Antwort auf mitogene Stimuli und nicht auf das klassische Calciumsignal, das NFAT aktiviert.

1.2.1 Gene, die durch den NFAT:AP-1-Komplex reguliert werden

Kombinierte Regulation ist ein wirksamer Mechanismus, durch Integration verschiedener voneinander unabhängiger Signalwege, die unterschiedliche Transkriptionsfaktoren aktivieren, spezifische und engkontrollierte Zellantworten zu erzeugen. Für Gene, deren Expression eine kooperative Interaktion von NFAT und AP-1 erfordert, bedeutet dies eine koordinierte Aktivierung des Calcium- und MAP-Kinase/Proteinkinase C-Signalweges.

NFAT reguliert in Kooperation mit AP-1 die Transkription einer großen Anzahl induzierbarer Gene in Zellen des Immunsystems⁵². Zu diesen zählen das IL-2-Gen, die miteinander verbundenen IL-3- und GM-CSF-Gene, die ebenfalls verketteten Gene der Interleukine 4, 5 und 13 in Th2-Zellen und das IFN- γ -Gen. Eine Ausnahme bildet das Gen für das proinflammatorische Zytokin TNF- α , für das in Experimenten mittels einer NFAT-Mutante eine Unabhängigkeit von Fos und Jun gezeigt werden konnte¹⁰¹.

Außerdem reguliert der NFAT:AP-1-Komplex Gene für die Zelloberflächenrezeptoren CD40L, FasL, CD5, Igk und CD25, weiterhin die Gene der Chemokine IL-8 und MIP-1 α und das Cyclooxygenase 2 (Cox2)-Gen.

1.3 *Interferon γ (IFN- γ)*

Interferon γ ist das zentrale charakteristische Zytokin der Th1-Immunantwort, ein Typ II IFN, das vor mehr als 30 Jahren entdeckt wurde¹²¹. Es ist essentiell für eine effektive Immunantwort gegen Pathogene wie insbesondere intrazelluläre Bakterien und Viren, aber auch Tumore. Seit seiner Entdeckung erfolgten extensive Untersuchungen, die u.a. zeigten, dass IFN- γ eine Vielzahl von Immunantworten stark beeinflusst. Zu diesen gehören die Hochregulation der Expression von MHC-Klasse-I- und -II-Molekülen^{122,123}, die Proliferation und Differenzierung von naiven CD4⁺-T-Zellen zu Th1-Zellen^{124,125} sowie die Induktion von Genen, die für immunmodulatorische Proteine wie TNF- α ^{126,127} kodieren. Die primären zellulären Produzenten von IFN- γ sind T- und NK-Zellen. Wie bereits ausführlich in den

vorherigen Kapiteln geschildert, erfolgt in T-Zellen das „*Signaling*“ über den TCR/CD3-Komplex.

Über die Struktur des humanen IFN- γ -Gens wurde erstmals 1982 berichtet^{127,128}. Kurz nach dieser Entdeckung wurden mittels DNase I-Hypersensitivitäts-Studien mehrere mutmaßlich transkriptionale Regulatorregionen innerhalb des Promotors und des ersten Introns des IFN- γ -Gens identifiziert^{129,130}. Der IFN- γ -Promotor umfasst multiple „*cis-acting*“ Regulatorelemente, die die gewebespezifische Expression von IFN- γ fördern können. Einige der nukleären Faktoren, die mit diesen Elementen interagieren sind: AP-1, GATA-3, CREB-ATF, NF- κ B, NFAT und YY-1^{52,131,132,95,133}. Zusätzlich existieren multiple extrazelluläre Faktoren, die mit NK- und T-Zellen interagieren, um die IFN- γ -Expression zu beeinflussen.

Zwei Zytokine, die einen starken Einfluss auf die IFN- γ -Expression haben, sind IL-2 und IL-12. Sie können entweder unabhängig voneinander die IFN- γ -Expression induzieren oder aber synergetisch agieren und damit große Mengen an IFN- γ induzieren¹³⁴. Neben der transkriptionalen Regulation¹³⁵⁻¹⁴³ wurden auch posttranskriptionale Regulationsmechanismen für die IFN- γ -mRNA beschrieben. So wurde eine mRNA-Stabilisierung in phytohämagglutininaktivierten T-Zellen als Reaktion auf IL-12^{142,144} und in NK-Zellen, die mit IL-2 und IL-12 kostimuliert worden waren, beobachtet¹³⁹. Hodge et al. beschrieben vor kurzem einen posttranskriptionalen Mechanismus, der die IFN- γ -mRNA-Expression in stimulierten NK-Zellen durch nukleäre Retention der IFN- γ -mRNA modulierte. Die IL-12-induzierte nukleäre Retention hielt solange an, bis ein zweiter Stimulus, eingeleitet durch IL-2, von der Zelle empfangen wurde, der dann die transkriptionsunabhängige nukleozytoplasmatische Bewegung der IFN- γ -mRNA vermittelte¹⁴⁵.

1.4 Zytokine

1.4.1 Interleukin 12

IL-12 ist ein wichtiges immunmodulatorisches Zytokin, das eine funktionelle Brücke zwischen initial unspezifischer und nachfolgender antigenspezifischer Immunantwort herstellt¹⁴⁶. Die Th1-Entwicklung naiver CD4⁺-T-Zellen erfordert IL-12, welches im wesentlichen von aktivierten Makrophagen¹⁴⁷ und DC^{148,149} produziert wird. Es handelt sich um ein Heterodimer, bestehend aus einer schweren (p40) und einer leichten Kette (p35), das von antigenpräsentierenden Zellen (APC) als Reaktion auf Pathogene produziert wird^{150,151}. IL-12 induziert die IFN- γ -Produktion von T- und NK-Zellen, indem es an seinen spezifischen Rezeptor bindet. Dieser Rezeptor besteht aus zwei Ketten, der β 1- und der hochaffinen β 2-Kette, die beide für eine T-Zellantwort auf IL-12 und Vermittlung der Th1-Differenzierung

erforderlich sind. Die $\beta 2$ -Kette des IL-12-Rezeptors (IL-12R) wird allerdings nur in Th1-Zellen exprimiert, im Gegensatz zur $\beta 1$ -Kette, die sowohl auf Th1- als auch Th2-Zellen vorkommt¹⁵²⁻¹⁵⁴. Aufgrund ihrer geringeren Expression ist die IL-12R $\beta 2$ -Kette für die IL-12-Sensitivität limitierend. Van Rietschoten et al. untersuchten die wenig erforschte transkriptionale Regulation des IL-12R $\beta 2$ -Gens¹⁵⁵. Ihre Daten zeigten einen Promotor, der keine TATA-Box enthält und folglich abhängig von einer alternativen Einleitung der Transkription durch SP-1/SP-3-Transkriptionsfaktoren ist. Gene mit Promotoren ohne TATA-Box, einschließlich vieler „Housekeeping“- und Rezeptorgene, werden generell nur gering exprimiert. Van Rietschoten et al. entdeckten weiterhin ein Silencer-NFAT-Element, welches NFATc2 bindet und an der Unterdrückung der TCR-induzierten IL-12R $\beta 2$ -Expression beteiligt ist. Die negativ regulatorische Wirkung dieses Elementes wurde durch die Beobachtung unterstrichen, dass CsA zu einem Anstieg der IL-12R $\beta 2$ -mRNA-Expression in stimulierten naiven Th-Zellen führte.

An der Regulation der IL-12R $\beta 2$ -Gen-Transkription sind vermutlich verschiedene Th1- und Th2-spezifische Transkriptionsfaktoren beteiligt: IL-12 führt beispielsweise über eine Phosphorylierung von STAT4 zu einer starken Hochregulation der IL-12R $\beta 2$ -Expression¹⁵³. Ein weiterer direkt involvierter Transkriptionsfaktor ist T-bet¹⁵⁴, der durch IL-12 hochreguliert wird und für die Th1-spezifische Expression von IFN- γ verantwortlich ist. Im Gegensatz dazu ist GATA3, ein Th2-spezifischer und IL-4-induzierter Transkriptionsfaktor¹⁵⁶, der über eine Hemmung von STAT4¹⁵⁷ an der Suppression des IL-12R $\beta 2$ -Gens beteiligt ist¹⁵⁸.

Mittels der $\beta 2$ -Kette wird das „IL-12-Signal“ über STAT4 in den Kern weitergeleitet, wo u.a. die Bindung an den IFN- γ -Promotor stattfindet^{159,160,161}. Wie wichtig STAT4 für die IL-12-induzierte Th1-Entwicklung ist, wurde durch die verminderte IFN- γ -Antwort auf IL-12 durch STAT4-defiziente T-Zellen demonstriert^{162,160}. Ouyang et al.¹⁶³ konnten jedoch zeigen, dass antigenaktivierte Th1-Zellen unabhängig von IL-12 und einer STAT4-Aktivierung IFN- γ produzieren können. Daher vermuteten sie, dass in differenzierten Th1-Zellen Faktoren, die durch IL-12 und STAT4 reguliert werden, zusätzlich an der IFN- γ -Produktion beteiligt sind.

Kubin et al. konnten bereits 1994 zeigen, dass IL-12 einen starken synergetischen Effekt mit der B7/CD28-Interaktion bei der Induktion von Proliferation und Zytokinproduktion humaner T-Zellen, insbesondere von IFN- γ , besitzt¹⁶⁴. Sie stellten außerdem fest, dass der proliferative Effekt von anti-CD28-Ak und IL-12 resistent gegenüber moderaten Dosen an CsA ist.

Mittels „*subtractive cloning*“ konnte ERM, ein Ets-Transkriptionsfaktor identifiziert werden. Dessen Gen wird durch IL-12 induziert, ist STAT4-abhängig und wird nur in Th1-Zellen exprimiert. In STAT4-defizienten T-Zellen konnte eine ERM-Expression die IFN- γ -Produktion allerdings nicht wiederherstellen, weshalb Ouyang et al. vermuteten, dass ERM entweder neben der IFN- γ -Produktion andere Aspekte des Th1-Verhaltens reguliert oder aber eine Kooperation mit anderen Th1-spezifischen Transkriptionsfaktoren zur Regulation der

IFN- γ -Expression benötigt. Ets-Faktoren sind häufig auf Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren angewiesen¹⁶⁵, um ihre regulatorische Aktivität auszuüben^{165,166}. In Abwesenheit anderer Faktoren vermehrt ERM daher die Expression eines IFN- γ -Reporters nur um das zweifache. Folglich ist ERM wahrscheinlich nicht der einzige IL-12-induzierte Transkriptionsfaktor, der für die hohe IFN- γ -Produktion in Th1-Zellen verantwortlich ist. So wurde berichtet, dass ERM mit dem AP-1-Familienmitglied c-Jun kooperiert¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Dass STAT4-heterozygote T-Zellen eine verminderte IFN- γ -Produktion zeigten, ließ Ouyang et al. vermuten, dass ERM auch mit STAT4 oder STAT4-induzierten Faktoren bei der Regulation der IFN- γ -Gentranskription kooperieren könnte.

1.4.2 Interleukin 18

IL-18, auch als „*IFN- γ inducing factor*“ (IGIF) bezeichnet, wird ebenfalls von phagozytierenden Zellen produziert¹⁷⁰. IL-18 steigert die IFN- γ -Produktion und Proliferation von T-Zellen sowie die Zytotoxizität der NK-Zellen. Obwohl IL-18 die Entwicklung von Th1-Zellen selbst nicht induziert, ermöglicht es eine effektive Induktion und Aktivierung von Th1-Zellen durch IL-12. Frühere Studien konnten zeigen, dass rhIL-18 die IFN- γ -Produktion von T-Zellen sogar potenter erhöht als IL-12¹⁷¹. IL-12 und IL-18 üben einen synergetischen Effekt auf die IFN- γ -Produktion der T-Lymphozyten aus^{172,173}, was auf eine Induktion des IGIF-Rezeptors (IL-18R) durch IL-12 und der dadurch erhöhten Sensibilität der T-Zellen gegenüber IL-18 zurückzuführen ist¹⁷⁴. Berichte weisen daraufhin, dass zwei Signalwege, bestehend aus einer IL-18-induzierten NF κ B-Aktivierung und einer TCR/CD3-vermittelten NFAT-Aktivierung, für die IFN- γ -Produktion der Th1-Zellen entscheidend sind¹⁷⁵.

Untersuchungen von Barbulescu et al.¹⁴¹ ergaben, dass IL-18 direkt die IFN- γ -Promotoraktivität induziert, wohingegen eine signifikante Aktivierung mit IL-12 zusätzlich eine Kostimulation mit anti-CD3/-CD28-Ak benötigt. Mutationsexperimente zeigten, dass eine IL-12-abhängige IFN- γ -Promotoraktivierung sowohl AP-1 als auch STAT4 erfordert, wohingegen IL-18 zu einer direkten Aktivierung über AP-1 führt.

Yang et al.¹⁷⁶ berichteten, dass im Mausmodell eine TCR-unabhängige IFN- γ -Induktion nur durch das Zusammenwirken von IL-12 und IL-18 zustande kommt (ERM). Diese IFN- γ -Produktion ist im Gegensatz zur TCR-induzierten Produktion durch CsA nicht inhibierbar, weshalb sie das Vorhandensein unterschiedlicher Signalwege über funktionell getrennte, sich aber räumlich überlappende „*cis-acting*“ Elemente, ähnlich der anderer Gene unter der Kontrolle mehrerer Promotoren, vermuteten.

IL-18 allein, d.h. in Abwesenheit von IL-12, scheint in bestimmten Situationen auch bei „Th2“-assoziierten Mechanismen, wie der Induktion von IgE und IL-4, beteiligt zu sein.

1.4.3 Interleukin 23

IL-23 besteht wie IL-12 aus zwei Ketten, einer schweren mit der des IL-12 identischen p40- und einer p19-Kette. Auch bei IL-23 handelt es sich um ein immunregulatorisches Zytokin. IL-23 bindet an den IL-12R β 1 und den IL-23R. Es wurde vermutet, dass einige der für IL-12 beschriebenen Effekte auf IL-23 zurückzuführen sind¹⁷⁷. So steigert IL-23 ebenfalls die Th1-kostimulatorische Funktion der APC und induziert deren IFN- γ -Produktion¹⁷⁸.

1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

CD4⁺-T-Zellen sind für die zellvermittelte adaptive Immunantwort bei chronisch entzündlichen Hauterkrankungen von entscheidender Bedeutung. Nach Aktivierung naiver CD4⁺-Zellen über den TCR durch Bindung an MHC-Klasse-II-Moleküle und Kostimulation über die CD80 bzw. CD86/CD28-Interaktion durch APC wird die Differenzierung zu den beiden Untergruppen von CD4⁺-T-Effektorzellen, den Th1- und Th2-Zellen, entscheidend durch das während der Proliferationsphase der T-Zell-Aktivierung vorherrschende Zytokinmilieu beeinflusst. Krankheitserreger wie intrazelluläre Bakterien und Viren regen DC^{148,149} und Makrophagen¹⁴⁷ zur Produktion von IL-12 an, das die Entwicklung der proliferierenden CD4⁺-T-Zellen zu Th1-Zellen fördert.

Das Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Immunantwort ist in der chronischen Phase der atopischen Dermatitis und der Psoriasis im Hautkompartiment zugunsten einer Th1-gerichteten Antwort verlagert. In dieser Arbeit soll daher der Einfluss von derzeit therapeutisch eingesetzten Calcineurininhibitoren auf die IFN- γ -Produktion von T-Lymphozyten untersucht werden. Dadurch könnten sich mögliche neue Hinweise auf den Wirkungsmechanismus der Calcineurinantagonisten ergeben. Ferner könnte sie Erklärungen liefern für ein Therapieversagen bzw. die Basis sein für neue, gezielte Interventionsstrategien bei der Behandlung dieser Erkrankungen.

Folgende Aspekte sollen in dieser Arbeit untersucht werden:

- 1 Wie beeinflusst CsA die IFN- γ -Produktion von T-Lymphozyten in verschiedenen Aktivierungszuständen? Welche Ergebnisse lassen sich auf Protein- und mRNA-Ebene erheben?
 - 1.1 Bestehen Unterschiede zwischen Normalpersonen und Atopikern?
 - 1.2 Nach welcher Inkubationsdauer sind erste Effekte zu beobachten?
 - 1.3 Welche Schwellenwerte lassen sich für die Konzentrationen der Stimuli anti-CD3- und anti-CD28-Ak sowie IL-12 ermitteln?

- 1.4 Wie beeinflussen die Zytokine IL-2, IL-4, IL-10, IL-18 und IL-23 die Wirkung CsA's auf die Induktion der IFN- γ -Produktion?
- 1.5 Existieren Alternativen zur TCR- und Kostimulation, und wie wirken sich diese auf die IFN- γ -Produktion aus?
- 2 Beeinflusst Tacrolimus (FK506) die IFN- γ -Produktion von Lymphozyten in gleicher Weise wie CsA?
- 3 Wie wirkt sich CsA auf die Expression der Transkriptionsfaktoren T-bet und c-fos aus? Vermitteln sie den Effekt des CsA auf die IFN- γ -Produktion?

2 Methoden, Material, Geräte und Hilfsmittel

2.1 Methoden

2.1.1 Separation peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) mittels Dichtegradientenzentrifugation

Zur Gewinnung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) wurde heparinisiertes Vollblut von atopischen Spendern und Normalpersonen genutzt. Um die Lymphozyten-Monozyten-Fraktion aus der Leukozyten-Fraktion zu isolieren und die verbleibenden Erythrozyten und Granulozyten von selbiger zu separieren, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation des Vollblutes über ein Trennmedium, in diesem Fall LymphoprepTM ($d=1,077$ g/ml), durchgeführt. Hierzu wurde zunächst eine Verdünnung des Vollblutes mit Iscove-Medium im Verhältnis 1:2,3 vorgenommen. Anschließend wurde diese Verdünnung im Verhältnis 3:1 vorsichtig über das Trennmedium LymphoprepTM geschichtet. Nach Zentrifugation (40 Minuten zuzüglich dreiminütiger Ein- und Auslaufzeit, 403xg, 25°C, Bremse 0) bildeten die PBMC und die Thrombozyten aufgrund der Dichteunterschiede einen Interphasering zwischen dem Trennmedium und dem Iscove-Medium, während sich die Erythrozyten und Granulozyten im Sediment befanden. Der Interphasering wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und erneut zentrifugiert (15 Minuten, 403xg, 4°C, Bremse 9). Darauf folgten zwei Waschgänge zur Thrombozytenelimination (15 Minuten, 250xg, 4°C, Bremse 9). Die Überstände wurden jeweils verworfen und die Zellpellets in frischem Iscove-Medium resuspendiert. Anschließend wurden die PBMC in IAB-Vollmedium aufgenommen und die Lymphozytenfraktion durch Adhärenzverfahren weiter aufgereinigt (Protokoll siehe 2.1.3).

2.1.2 Anreicherung der Lymphozytenfraktion durch ein Plastikadhärenzverfahren

Für eine Anreicherung der Lymphozytenfraktion wurden die aus dem Vollblut gewonnenen PBMC einem Adhärenzschritt unterzogen, bei dem die Eigenschaft der Monozyten, schnell und ausgeprägt an Plastikflächen zu adhären, ausgenutzt wurde. Lymphozyten und NK-Zellen adhären im Gegensatz dazu nicht an Plastikflächen. Zur Durchführung dieses Verfahrens wurden die PBMC im Anschluss an die Dichtegradientenzentrifugation (2.1.1) in

10ml IAB-Vollmedium aufgenommen und in eine sterile Gewebekulturschale überführt, die zuvor für 15 Minuten mit weiteren 10ml IAB-Vollmedium bei 37°C vorinkubiert worden war. Die Monozyten adhärten während einer zweistündigen Inkubation bei 37°C in feuchter, mit 5% CO₂ angereicherter Atmosphäre am Boden der Petrischale. Anschließend wurden in drei bis fünf Waschgängen mit 37°C warmen Iscove-Medium die nicht-adhären Zellen von der Petrischale gesammelt und in Falcon-Röhrchen aufgefangen, zentrifugiert und in IAB-Vollmedium aufgenommen und schließlich gezählt.

2.1.3 Berechnung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer

Zur Berechnung der Zellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension im Verhältnis 1:10 mit Türks Reagenz verdünnt, wodurch sich die Lymphozyten blau anfärbten. 10µl dieser Verdünnung wurden in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Vier Großquadrate der Neubauer-Zählkammer wurden nun unter dem Mikroskop ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

Mittelwert der Zellzahl pro Großquadrat x Verdünnungsfaktor x 10^4 = Zellzahl/ml.

Schließlich wurden die nicht-adhären Zellen in 96-Loch-Rundbodenplatten in einer Dichte von $1-3 \times 10^5$ Zellen/200µl ausplattiert.

2.1.4 Isolation von CD4⁺-T-Zellen durch Negativselektion

Die CD4⁺-T-Zellen können auch durch indirekte magnetische Markierung mittels Depletion von Nicht-CD4⁺-Th-Zellen (Negativselektion) gewonnen werden. Dazu werden die PBMC zunächst mit einem „CD4⁺ T Cell Biotin-Antibody-Cocktail“ aus monoklonalen Biotin-konjugierten Antikörpern gegen CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ und Glycophorin A und im darauffolgenden Schritt mit „Anti-Biotin MicroBeads“ behandelt, um CD8⁺, γ/δ -T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, DC, Monozyten, Granulozyten und Erythrozyten indirekt magnetisch zu markieren. Diese Zellen bleiben aufgrund ihrer magnetischen Markierung mit Hilfe der an die Biotin-konjugierten Antikörpern gebundenen „MicroBeads“ im magnetischen Feld des Vario-MACS-Magneten haften, während die unmarkierten hochaufgereinigten CD4⁺-T-Zellen ungehindert durchfließen können.

Die in IAB-Vollmedium aufgenommenen PBMC wurden hierzu vorab in MACS-Puffer gewaschen (5 Minuten, 250xg, 4°C, Bremse 9) und anschließend mittels der Neubauer-Zählkammer ausgezählt (siehe 2.1.4). Nach vollständiger Abnahme des Überstands wurde das Zellpellet in 40µl MACS Puffer pro 1×10^7 Zellen resuspendiert und 10µl des „Biotin-Antibody Cocktail“ für 1×10^7 Zellen hinzugegeben. Danach folgte eine zehnminütige

Inkubation unter ständigem Mischen bei 4-8°C, in deren Anschluss direkt 30µl MACS Puffer und 20µl der „Anti-Biotin MicroBeads“ für 1×10^7 Zellen hinzugefügt und weitere 15 Minuten bei 4-8°C inkubiert wurde. Für die anschließenden Waschgänge wurde das 10-20fache Volumen an Puffer hinzugefügt und zentrifugiert (5 Minuten, 250xg, 4°C, Bremse 9). Danach wurde der Überstand abgenommen und das verbliebene Zellpellet in 500µl MACS Puffer pro 10^8 Zellen resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde nun über eine zuvor mit 3ml Puffer beschichtete Säule in einem magnetischen Feld, erzeugt durch den „MACS Separator“, gegeben und die angereicherten CD4⁺-Zellen aufgefangen. Die Säule wurde anschließend noch dreimal gewaschen und die CD4⁺-Zellen in IAB-Vollmedium aufgenommen.

Die Reinheit der verbliebenen CD4⁺-T-Zellen betrug $\geq 95\%$, was durchflusszytometrisch verifiziert wurde.

2.1.5 Durchflusszytometrische Messung und Auswertung

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden mit einem „FACSCalibur“-Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson, Heidelberg, durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der „CELL Quest“-Software von Becton Dickinson.

Die zu messende Probe wird in ein Polypropylenröhrchen überführt und gelangt durch Überdruck in die Messküvette. Dort wird jeder Partikel der Probe kontinuierlich an einem Argonlaser, der einen Laserstrahl mit der Wellenlänge 488nm emittiert, vorbeigeführt. Dabei zeigt die Streuung des Lichtes aus Richtung des Laserstrahles die Größe des Partikels an (Vorwärtsstreulicht, englisch „*Forward Scatter*“, FSC), während die Streuung des Lichtbündels im rechten Winkel zum Laser dagegen auf die Granularität der Zellen schließen lässt (Seitwärtsstreulicht, englisch „*Side Scatter*“, SSC). Zusätzlich kann in drei Kanälen die Fluoreszenzintensität von Farbstoffen gemessen werden. Gängig sind die mit den folgenden Farbstoffen gekoppelten Antikörper: Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)-konjugierte Ak mit einer Emissionswellenlänge von 525nm (Grünfluoreszenz, Fluoreszenz 1) und Phycoerythrin (PE)-konjugierte Ak (Rotfluoreszenz, Fluoreszenz 2) mit einer Emissionswellenlänge von 585nm. Je Probe werden 10000 Ereignisse gemessen und die Werte, in Bezug auf Größe, Granularität und die in Frage kommenden Fluoreszenzkanäle sortiert, elektronisch gespeichert. Bei der Auswertung können spezielle Filter („*Gate*“) eingesetzt werden, um bestimmte Populationen gezielt zu untersuchen. Im Ergebnisteil sind die Differenzen der mittleren Fluoreszenzintensität (englisch „*Mean Fluorescence Intensity*“, MFI) zwischen der Färbung mit spezifischen Ak und einer Isotypkontrolle mit Maus IgG₁ bzw. dem Leerwert angegeben.

2.1.5.1 Phänotypisierung von Zellen des peripheren Blutes

Um die Zellen aus dem peripheren Blut zu charakterisieren, wurden durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt. So wurden mittels folgender Methode die CD4⁺-T-Zellen auf ihre Reinheit hin überprüft. Zu diesem Zwecke erfolgte eine Färbung mit anti-CD3, -CD4, -CD8, -CD14, -CD20.

Oberflächenfärbung mittels Direkter Immunfluoreszenz

1 bis 3×10^5 CD4⁺-T-Zellen pro Well einer 96-Loch-Rundbodenplatte wurden vor der Färbung in der Zellkulturplatte zentrifugiert (3 Minuten, 198g, 4°C, Bremse 9) und einmal zur Entfernung des IAB-Mediums mit Waschpuffer (IF) gewaschen. Danach wurden die CD4⁺-Zellen in 100µl Blockpuffer für Immunfluoreszenzfärbung (IF) pro Loch resuspendiert und die oben erwähnten direkt markierten Ak hinzupipettiert. So inkubierten die Zellen bei Dunkelheit eine Stunde auf Eis. Nach Ablauf der Zeit wurden sie dreimal in Waschpuffer (IF) gewaschen und schließlich in 100µl PBS aufgenommen. Die Messung und Auswertung erfolgte am FACSCalibur im Programm CELL Quest (siehe 2.1.6).

2.1.5.2 Markierung von PBMC mit CFSE

Man verwendet den Farbstoff 5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE), um die Proliferation von T-Zellen durchflusszytometrisch zu erfassen. Der Ester CFSE diffundiert passiv durch Zellmembranen und wird intrazellulär von zytoplasmatischen Esterasen gespalten. Freies CFSE kann die Zelle nicht mehr verlassen. Bei einer Zellteilung wird die Hälfte des CFSE von der Mutterzelle an die Tochterzelle weitergegeben. Folglich nimmt die durchflusszytometrisch gemessene Fluoreszenz mit steigender Anzahl der Teilungszyklen der T-Zellen ab. Das Absorptionsmaximum von CFSE liegt bei 290nm.

Die Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^7 Zellen/ml in PBS aufgenommen. Das CFSE wurde in einer Endkonzentration von 10^{-6} M hinzugefügt und anschließend möglichst lichtgeschützt 90 Sekunden lang unter leichtem Schwenken inkubiert. Zum Abbrechen der Reaktion wurde das gleiche Volumen IAB-Medium hinzugegeben. Nach einer Wartezeit von einer Minute wurden die Zellen zweimal mit Iscove-Medium gewaschen (zehnminütige Zentrifugation bei 300g und 4°C) und anschließend in IAB-Medium aufgenommen.

2.1.5.3 Durchflusszytometrische Analyse intrazellulärer Zytokine und Membranmoleküle

Fünf Tage nach Antigenstimulation wurden CFSE-gelabelte Lymphozyten mit PMA (10ng/ml) und Ionomycin (400ng/ml) in Gegenwart von Brefeldin A (3µg/ml) für zwei Stunden stimuliert. Für die intrazelluläre Färbung wurde das „Cytotfix/Cytoperm kit“ (BD Biosciences) verwendet. Hierbei wurden APC-konjugierte anti-human-IFN-γ-mAk von Mäusen und IgG1-Isotyp-Kontrolle-mAk in einer endgültigen Konzentration von 2µg/ml verwendet. Anschließend wurde die Fluoreszenz im FL-1-H (CFSE) und die intrazelluläre

IFN- γ -Expression im FL-4-H mit Hilfe des Durchflusszytometers FACSCalibur ermittelt. Als Maß für die T-Zell-Proliferation diente die Abnahme der Fluoreszenz im FL-1-H (CFSE). Bei Analyse der Ergebnisse wurde die CELLQuestProTM-Software verwendet. Die Expression von Oberflächenantigenen wurde durch den Einsatz folgender PE- oder FITC-gelabelter anti-human-mAk ermittelt: CD54 (anti-human-CD54-mAk von Mäusen) und IL-12R β 2 (anti-human-IL-12R β 2-mAK von Ratten).

2.1.6 Selbstbau-ELISA zum Nachweis von IFN- γ

Die Selbstbau-ELISA beruhen auf dem *Sandwich*-Prinzip.

Durch den Vorgang des Vorcoatens binden spezifische mAk, in diesem Fall anti-human IFN- γ -mAk, an die verwendeten Mikrotiterplatten (MTP). Die Standard- sowie die vorverdünnten Proben werden in die Wells pipettiert. Dabei wird das jeweilige Zytokin in der Probe durch den zugehörigen Ak gebunden. Durch einen Waschvorgang werden ungebundene Proteine entfernt. Anschließend wird ein biotin-konjugierter Ak gegen das gebundene IFN- γ hinzugegeben. Überschüssige Ak werden durch erneutes Waschen entfernt. Durch die Zugabe einer Substrat- und Verstärkerlösung entwickeln die enzymgebundenen Ak eine der IFN- γ -Konzentration entsprechende Farbreaktion, die durch die Zugabe einer Stopplösung beendet wird. Der dabei entstehende Farbumschlag von blau nach gelb kann in einem Spektrophotometer quantitativ gemessen werden.

Die Wells einer Maxi-Sorb-ELISA-Platte wurden mit jeweils 100 μ l „Coating Capture-Antibody“ (anti-human IFN- γ) (4 μ g/ml), gelöst in „Coating Buffer“, bestückt und, durch Klebefolie verschlossen, über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag erfolgten nach Entfernung der Lösung durch Umdrehen und Dekantieren der MTP drei Waschvorgänge. Hierzu wurde jedes Well mit >300 μ l Waschpuffer gefüllt und die Waschlösung durch Invertieren und Ausklopfen der Platte auf saugfähigem Zellstoff entfernt. Anschließend wurde jedes Well mit 200 μ l „Assay Diluent“ versehen. Die MTP wurde, wie bei den noch folgenden Inkubationen, mit Klebefolie verschlossen und nach einer mindestens einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wiederum dreimal mit Waschpuffer gereinigt. Daraufhin wurden zunächst in zweifacher Ausführung je 100 μ l der Standardlösungen für die Standardkurve in den Konzentrationen 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62,5pg/ml, 31,3pg/ml, 15,6pg/ml und 7,8pg/ml, gelöst in „Assay Diluent“, in die Wells gegeben. Die übrigen Wells wurden mit der gleichen Menge der gegebenenfalls vorverdünnten Proben versehen. Erneut erfolgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur, an die sich eine gründliche Reinigung anschloss. Im nächsten Schritt wurden 100 μ l/Well „Detection Antibody“ (4 μ l/ml) gelöst in „Assay Diluent“ hinzugefügt. Im Anschluss an die einstündige Inkubation folgten nochmals mehrere Waschgänge bevor die Wells mit je 100 μ l „Avidin-HRP“ (4 μ l/ml „Assay Diluent“),

dem „Detections Enzyme“, für 30 Minuten versehen wurden. Zum letzten Mal erfolgte eine gründliche Reinigung der MTP, bevor 100µl der Substratlösung in jedes Well pipettiert wurden. Nach 15minütiger Inkubation, bei der eine blaue Farbentwicklung zu beobachten war, wurden 50µl einer Stopplösung in jedes Well gegeben, welche einen Farbumschlag von blau nach gelb bewirkte. Die Substratreaktion wurde anschließend mit Hilfe eines Spektrophotometer bei 450nm quantitativ analysiert.

2.1.7 Kern- & Zytoplasmaextraktionen

Zur Herstellung von Kern- und Zytoplasmaextrakten wird zunächst die Zellmembran zerstört, was zur Freisetzung der Zytoplasmaproteine führt. Eine anschließende Denaturierung der Kernmembran ermöglicht es, die Proteine im Nukleus zu isolieren, welche als Kernextrakte für den EMSA dienen.

Um für die EMSA-Versuche Kernextrakte aus stimulierten Zellen zu erhalten, wurden die Zellen durch Zentrifugation vom Medium getrennt (2-3 Minuten, 500xg, Bremse 9, 4°C) und bei gleicher Einstellung in PBS gewaschen, um das Zellpellet anschließend in 100µl „Cytoplasma Extraction Reagent1“ (CER 1) aufzunehmen. Nach 10minütiger Inkubation wurden 5,5µl „Cytoplasma Extraction Reagent 2“ (CER 2) hinzugefügt. Nach der folgenden Zentrifugation (5 Minuten, 15000xg, Bremse 9, 4°C) enthielt der Überstand den Zytoplasmaextrakt, der bei -80°C tiefgefroren wurde. Dem verbleibenden Zellkernpellet wurden 50µl „Nuclear Extraction Reagent“ (NER) zugesetzt und 40 Minuten bei mehrmaligem Vortexen inkubiert. Diesem Schritt folgte die letzte Zentrifugation (10 Minuten, 15000xg, Bremse 9, 4°C), in deren Anschluss die im Überstand befindlichen Kernextrakte bei -80°C eingelagert werden konnten.

2.1.8 Proteinbestimmung nach Biuret

Bei der Proteinbestimmung nach Biuret handelt es sich um eine Farbbindereaktion, basierend auf Farbveränderungen, welche quantitativ der vorhandenen Proteinmenge entspricht. Dabei reagieren die Proteine der Probe mit alkalischem Kupfertatrat und reduzieren Folinreagenz, welches dadurch seine Farbe verändert. Diese Farbveränderung kann bei 750nm colorimetrisch gemessen werden.

Nach dem Ansetzen einer Standardreihe aus PBS und Serumalbuminlösung sowie dem Zusammenstellen der Arbeitsreagenz A aus 20µl Reagenz S und 1ml Reagenz A wurden die Wells einer 96-Well-Platte mit je 5µl der verschiedenen Standardkonzentrationen bzw. 5µl der jeweiligen Kernextrakte bestückt. Danach wurden 25µl der Arbeitsreagenz A und 200µl der Reagenz B in jedes Wells gegeben. Nach 15 Minuten erfolgte die Messung der Endpunktreaktion.

2.1.9 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Der EMSA ist eine sensitive Methode zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren und DNA-Sequenzen. Mit Hilfe von Biotin gelabelten Nukleinsäureoligonukleotiden, an die der Transkriptionsfaktor spezifisch bindet (Tbet-spezifische DNA-Sequenz: Biotin 5'-AAT TTC ACA CCT AGG TGT GAA ATT-3'), kann man das Vorhandensein bestimmter Transkriptionsfaktoren elektrophoretisch sichtbar machen. Das Prinzip basiert darauf, dass die Komplexe aus Protein und Oligonukleotid langsamer durch das Maschenwerk der Gelmatrix wandern als Oligonukleotidfragmente ohne Proteinbindung. Folglich spiegeln sich diese Wanderungsgeschwindigkeiten später in den Höhen der Banden wieder. Protein-DNA-Komplexe wandern dabei langsamer („Bandshift“: Bande nach „oben verschoben“) als DNA alleine. Daraus lässt sich schließen, welche der Proben den gesuchten Transkriptionsfaktor beinhalten und welche nicht. Die Biotin-gelabelte DNA wird dann durch eine Reaktion des Luminols mit Streptavidin-HRP-Konjugat als „Bandshift“ sichtbar gemacht. Die daraus resultierende Lumineszenz kann man mit einer CCD-Kamera aufnehmen und am Computer densitometrisch auswerten.

Zur Kontrolle der Spezifität der Methodik wurden Blockexperimente durchgeführt, bei denen u.a. eine 100fach größere Menge an ungelabelten Oligonukleotiden mit der gleichen Sequenz für Tbet zu den Proben gegeben wurde. Aufgrund der höheren Konzentration bindet der Transkriptionsfaktor Tbet wesentlich häufiger an die ungelabelten Oligonukleotide, was sich in fehlenden bzw. abgeschwächten Banden darstellt. Weiterhin führten wir Versuche mit mutierten Oligonukleotiden (DNA-Sequenz: Biotin 5'-AAT TTC ACG TCT AGG TAC GAA ATT-3') durch. Diese Oligonukleotide sind zwar Biotin markiert, haben aber eine leicht veränderte Nukleotid-Sequenz, an die Tbet nicht binden kann. Dementsprechend bleibt auch hier eine Bandshift-Bildung aus.

Das Gel wurde durch Zusammengabe von 0,5ml TBE, 1,31ml Acrylamid 40 plus 8,19ml Wasser und anschließenden Start der Polymerisationsreaktion durch Zugabe von 100µl 10%iges Ammoniumperoxodisulfat (APS) und 10µl TEMED hergestellt. Das Gel wurde in eine vorbereitete Kammer gegossen, ein Kamm eingesteckt und ausgehärtet.

Der Vorlauf zur Ausrichtung der Polaritäten im nativen 4%igen Acrylamidgel in einem 0.5x TBE Puffer betrug 40 Minuten bei 100V. In dieser Zeit wurde die Bindereaktion wie folgt pipettiert:

Bindereaktion:

Komponenten	Konzentration	Menge je Probe
Wasser		**
10x Bindepuffer	1x	2µl
50% Glycerol	2,5%	1µl
100mM MgCl ₂	5mM	1µl
1µg/µl Poly (dI+dC)	50ng	1µl
1% NP 40	0,05%	1µl
Proteinextrakte	1Unit	*
Biotin gelabelte DNA	100fmoles	2µl
nicht gelabelte DNA (nur für Blockexperimente)	20pmole	3µl
Endvolumen		20µl

Tabelle 2.1: Pipettierschema für die Bindereaktion bei EMSA-Experimenten

Für jede Probe wurden die Komponenten in den in der Tabelle aufgeführten Konzentrationen in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Die benötigte Menge des Proteinextrakts (*) und des Wassers (**) variierte je nach vorhandener Proteinmenge.

Nach Ablauf einer 20minütigen Inkubationszeit und Zugabe von 5µl „Loading Dye“ lief das mit der Bindereaktion beladene Gel bei 100V und 10°C ca. 65min (bis die Banden etwa $\frac{3}{4}$ der Gellänge durchlaufen hatten). Anschließend konnte das Gel auf eine 0.5x TBE equilibrierte Nylonmembran gelegt werden. Von beiden Seiten in mit 0.5x TBE getränktes Filterpapier eingebettet, wurde das Sandwich, mit TBE-Flüssigkeit benetzt, in der „Semi Dry Blotting Apparatur“ bei 20V 30 Minuten lang geblotet.

Um die Oligonukleotide auf der Nylonmembran zu fixieren, wurde die Membran im „UV Stratalinker“ ca. 30 Sekunden mit UV-Licht (254nm) bestrahlt. 15minütige Inkubationen mit „Blocking Buffer“ und „Blocking Buffer“ plus Streptavidin folgten, bevor die Nylonmembran viermal gewaschen und unter Verwendung des „Substrate Equilibration Buffers“ auf ein pH Optimum gebracht werden konnte.

Mit Hilfe von Luminol wurde die Chemilumineszenz der Biotin gelabelten Oligonukleotide im „Chemilmager“ sichtbar gemacht und aufgezeichnet.

2.1.10 Reverse Transkription und PCR

Die „polymerase chain reaction“ (PCR) ist ein Verfahren, mit dem selbst kleinste Mengen an DNA nach Amplifikation nachgewiesen werden können. Es wurde 1985 von Kary Mullis entwickelt. Die PCR funktioniert nach folgendem Prinzip: Die Sequenz eines nachzuweisenden DNA-Fragmentes ist bekannt. Durch Erhitzen auf Temperaturen im Bereich von 90°C wird die doppelsträngige Matrizen-DNA denaturiert und in ihre beiden Einzelstränge getrennt (*Denaturierung*). Zwei spezifische Primer mit einer Länge von jeweils 18-30 Basen umgrenzen den gesuchten Bereich und sind komplementär zu jeweils einem Strang in diesem Randbereich. Sie dienen als Reaktionsstarter für die DNA-Polymerisation.

Durch Abkühlen auf ca. 50°C hybridisieren die Primer mit den Einzelsträngen der Matrize (*Annealing*). Nach erneuter Erwärmung auf ca. 70°C werden mit Hilfe einer speziellen thermostabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) die Primer in 3'-Richtung verlängert. So entsteht ein neuer komplementärer Strang, der im nächsten Zyklus ebenfalls als Matrize dienen kann (*Elongation*). Zum Zwecke einer erneuten Denaturierung wird wieder auf 90°C erhitzt. Nach jedem durchlaufenem Zyklus verdoppelt sich bei idealer Effizienz der PCR das DNA-Material.

Zum Nachweis einer Genexpression mit mRNA muss diese zunächst mit dem Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden, um damit die PCR durchführen zu können. Auf diese Weise ist es möglich, die Expressionsmenge eines bestimmten Gens (Target) zu bestimmen.

2.1.10.1 RNA-Probengewinnung

Die CD4⁺-Zellen wurden in einer Zelldichte von 1×10^5 ausplattiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen in PBS gewaschen und anschließend in 80µl Lysispuffer aus dem „High Pure RNA Isolation kit“ (Roche Molecular Biochemicals) plus 20µl PBS aufgenommen. Nach Überführen der Flüssigkeit in ein 1,5ml-Eppendorf-Röhrchen wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C zwischengelagert.

2.1.10.2 Isolation der mRNA

Zur Isolation der mRNA diente das „High Pure RNA Isolation kit“ von Roche Molecular Biochemicals.

Das Prinzip der mRNA-Isolation besteht in der Bindung von Biotin-poly-T an die poly-A-Schwänze der mRNA. Darauf folgt eine Kopplung der Biotin-poly-T-mRNA an magnetische Streptavidinpartikel, die Separation in einem magnetischen Feld und das Herauslösen der so gewonnen mRNA aus der festen Phase der Magnetpartikel durch Erniedrigung der Salzkonzentration mit Hilfe von destilliertem Wasser.

Ein Magnetständer wurde mit einem 1,5ml-Eppendorf-Röhrchen für jede Probe vorbereitet und mit einem Volumen von 50µl der magnetischen Streptavidinpartikel gefüllt. Aufgrund des magnetischen Feldes setzten sich die magnetischen Partikel am Röhrchenrand fest, so dass die Flüssigkeit abgenommen werden konnte. Die Partikel wurden einmal mit 70µl Lysispuffer gewaschen, indem sie aus der Magnetbank herausgenommen, gevortext, in diese wieder zurückgestellt wurden und der Überstand abgenommen wurde. Die Probe wurde nun mit 0,6µl „Volume oligo(dt)₂₀ probe, biotin labeled,“ hybridisiert, die als Bindeglied zwischen mRNA und Magnetpartikeln fungierte. Das gesamte Volumen der Probe wurde anschließend in die vorbereiteten Eppendorf-Röhrchen überführt, aus dem Magnetständer genommen und fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden sie in die Magnetbank zurückgestellt und ruhten für die Dauer von drei Minuten. Nun wurde der Überstand abgenommen, während die mRNA an den am Rand befindlichen Magnetpartikeln haftete. Danach wurde das

Eppendorf-Röhrchen dreimal, wie bereits beschrieben, mit jeweils 200µl Waschpuffer gewaschen und der Überstand erneut abgenommen. Zuletzt wurden 60µl destilliertes Wasser hinzugefügt und zwei Minuten lang bei 72°C inkubiert. Durch Erniedrigung der Salzkonzentration und Erwärmung wurde die mRNA von den Magnetpartikeln und dem Biotin-poly-T separiert und konnte abschließend als Überstand abgenommen werden.

2.1.10.3 Reverse Transkription

Bei diesem Schritt wird die zuvor gewonnene RNA mittels einer reversen Transkriptase in eine einzelsträngige cDNA umgeschrieben, welche als Matrize für die PCR dienen kann. Zur Synthese der cDNA wurde das „cDNA synthesis kit“ der Firma Roche Molecular Biochemicals verwendet.

Je nach Anzahl der RNA-Proben wurden ebenso viele Eppendorf-Röhrchen mit dem folgenden Mastermix bestückt:

Komponenten	Menge je Probe
10X buffer	2µl
MgCl ₂	4µl
dNTPs 10mM	2µl
rRNasin	1µl
AMV RT enzym	0.8µl
oligo dT primer	2µl
RNA	8.2µl

Tabelle 2.2: Pipettierschema für den PCR-Mastermix

Die in der Tabelle aufgeführten Komponenten ergeben 11,8µl eines Mastermixes, der jeweils zusammen mit 8,2µl der RNA-Probe in die nachfolgend beschriebene PCR eingebracht werden kann.

Bevor die Proben dem Mastermix zugeführt wurden, war es notwendig, die mRNA bei 78°C für fünf Minuten zu „strippen“, um Sekundärstrukturen des RNA-Stranges zu glätten. Anschließend wurden alle Komponenten (11,8µl Mastermix auf 8,2µl RNA) für eine Stunde bei einem Temperaturoptimum für die „AMV RT“ von 42°C inkubiert. Bis zur abschließenden PCR war eine Lagerung bei –20°C möglich.

2.1.10.4 Effizienz korrigierte, Kalibrator angepasste, relative Quantifizierung mittels Real Time PCR

Die Messung der PCR erfolgt im LightCycler. Dieses Gerät ermöglicht es die PCR-Reaktion mit den verschiedenen Temperaturoptima innerhalb von ca. 30-40 Minuten durchzuführen und die Fluoreszenz der Proben zu detektieren. Mit Hilfe dieser Fluoreszenzanalyse ist es

möglich, die PCR während der Amplifikation zu überwachen und Analysen im Bereich der logarithmisch-linearen Phase durchzuführen.

Der LightCycler besteht aus einer Ober- und einer Untereinheit. Die Obereinheit enthält die Heizspirale, während die untere Einheit aus Thermokammer, Fluoreszenzdetektor, „drive units“, „electronic units“ und dem „Power Supply“ besteht. Eine Heizspirale heizt die Luft auf, die dann mit einem Gebläse in die Probenkammer eingespeist wird und die Temperatur in den Probenkapillaren reguliert. Dieses Gebläse sichert eine effiziente Luftzirkulation und homogene Temperatur während der Heizzyklen. Durch einen hohen Oberflächen/Volumen-Koeffizienten ist eine sehr schnelle Anpassung der Temperatur möglich.

Während der Messungen sorgt ein Motor für die Rotation des Probenkapillarenkarussell, so dass die Spitzen der Kapillaren genau vor dem Fluorimeter zum Stehen kommen.

Die Amplifikationsmessung wurde mit dem Farbstoff SYBR Green durchgeführt. Dieser Farbstoff band während der PCR an die dsDNA und fluoreszierte bei Interkalation an dsDNA. Nach der Elongationsphase eines jeden PCR-Zyklus wurde die Fluoreszenz in den Probenkammern bestimmt. So konnte bereits während der Reaktion die Bildung des spezifischen Produktes verfolgt werden. Eine Spezifitätskontrolle des amplifizierten Produktes erfolgte über eine Schmelzkurvenanalyse.

Für die oben beschriebene PCR wurde folgendes Pipettierschema eingehalten:

Komponenten	Menge je Probe
Template DNA	2µl
MgCl ₂	1,6 µl/3mM
Forward Primer	0,5µl /10µM
Reverse Primer	0,5µl/10µM
H ₂ O	12,6µl
Master-Mix mit SYBR Green	2µl

Tabelle 2.3: Pipettierschema für die PCR

Primer		Primersequenz
T-bet	forward	5`gatgtttgtggacgtggtcttg3`
	reverse	5`cttcacactgcacccactt3`
IFN-γ	forward	5`gcatcgtttgggttctcttggtgttactgc3`
	reverse	5`ctccttttgcgttcctgttttagctgctgg3`
c-fos	forward	5`tcacctgcctctcctcaat3`
	reverse	5`gctgcatagaaggaccagatag3`
ERM	forward	5`caatgctgaaacctctcaaagtgg3`
	reverse	5`ttccttttctgtcaatcacaggc3`

Tabelle 2.4: Primersequenzen

Nach einer zehnminütigen Denaturierung wurde für alle Zielgene (T-bet, IFN- γ , c-fos, ERM) eine „touch down PCR“ (erste Zieltemperatur 68°C, zweite Zieltemperatur 58°C, Stufengröße 0,5°C, Stufenverzögerung 1) durchgeführt.

Für die relative Quantifizierung wurde die Kalibrator-normalisierte relative Quantifizierung mit Effizienz-Korrektur benutzt. Für die quantitative Analyse wurde die „second derivative maximum method“ genutzt.

Für jede Probe und für einen definierten Kalibrator wurde die relative Menge von Zielgen und Referenzgen bestimmt. Die Berechnung der Daten basierte auf den Werten der Schnittpunkte (*Crossingpoints*), die durch den LightCycler erhoben wurden. Diese Schnittpunkte waren eine Funktion der Amplifikations-Effizienz der jeweiligen PCR. Die Ergebnisse wurden ausgedrückt als Verhältnis Ziel/Referenz der Probe geteilt durch das Verhältnis Ziel/Referenz des Kalibrators und waren folglich korrigiert für Probenungleichheiten und Abweichungen, die durch die Detektion entstanden.

Kleine Unterschiede in der Amplifikations-Effizienz zwischen den einzelnen Proben können zu großen Unterschieden in den Ergebnissen führen. Effizienzunterschiede haben einen bedeutenden Einfluss auf die Genauigkeit der Berechnung der initialen Menge. Die Effizienz-berichtete Quantifizierung basiert auf relativen Standardkurven, welche die PCR-Effizienz des Zielgens und des Referenzgens beschreibt. Diese relativen Standardkurven wurden einmalig erhoben und in der „Relative Quantification Software“ gespeichert.

Die Amplifikations-Effizienz der PCR wird durch folgende Formel beschrieben:

$$N = N_0 \times 2^{\exp n}.$$

N ist die Anzahl aller Kopien nach n Zyklen.

N_0 ist die initiale Anzahl der Kopien.

n ist die Anzahl der durchgeführten PCR-Zyklen.

Die maximal erreichbare Effizienz ist 2- dabei wird jedes PCR-Produkt bei jedem Zyklus repliziert. Die minimale Effizienz ist somit 1- es findet keine Amplifikation statt. In der Realität ist die PCR-Effizienz meist kleiner als 2. Die LightCycler-Software berechnet die Neigung (*slope*) für jede Standardkurve, wofür sie die relativen Abstände zwischen den einzelnen Kreuzungspunktwerten benutzt. Folglich kann die Effizienz einer PCR nach folgender Formel berechnet werden:

$$E = 10^{\exp - 1/\text{slope}}.$$

Bei schwachen Signalen ist die Standardkurve nicht mehr linear. Daher wird eine optimierte Kurvenpassform durch die Datenpunkte gelegt. Diese Kurve besteht aus zwei Abschnitten: einem linearen Abschnitt, der die oberen Konzentrationen mit starkem Signal beschreibt, und einem gebogenem Abschnitt im unteren Konzentrationsbereich. Die Passform ist mathematisch durch den Passformkoeffizienten definiert.

Relative Standardkurven werden aus den Verdünnungsreihen von Target und Referenz ermittelt. Unter Verwendung eines Kalibrators aus dem Standardlauf können die unbekannten Proben benutzer-unabhängig relativ quantifiziert werden.

2.1.11 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe der Software „Sigma Stat“ für Windows Version 2.03. (Jandel Scientific, Erkrath). Die Signifikanzberechnung wurde bei Normalverteilung mit dem student-t-test (Darstellung als Säulendiagramm) oder dem paired t-test (Darstellung als verbundene Einzelmessungen) durchgeführt. Bei nicht-normalverteilten Stichproben kam der Wilcoxon-Rank-Sum-Test zur Anwendung.

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte $\pm$ SEM oder als exemplarische Originalwerte dargestellt. Eine Signifikanz lag stets dann vor, wenn $p \leq 0.05$ betrug. In den Abbildungen steht * für einen p-Wert < 0.05 , ** für $p \leq 0.02$ und *** für $p \leq 0.01$.

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien/Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Aqua dest.	Merck, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Calciumchlorid (CaCl_2)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)	MoBiTec, Göttingen
EDTA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, Eggenstein
Gelatine	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Gentamycin	Seromed, Berlin
Heparin (Liquemin N 7500)	Hoffmann La Roche AG, Basel, Schweiz
humanes AB-Serum	Abteilung Transfusionsmedizin, MHH
humanes IgG	Zentralapotheke, Klinikum Hannover
Iscove-Basismedium	Biochrom, Berlin
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Seromed, Berlin
Lymphoprep (Ficoll-Hypaque)	Nycomed Pharma AS, Oslo, Norwegen
Magnesiumchlorid ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)	Serva, Heidelberg
Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Natriumazide (NaN_3)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)-Lösung	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Nichtessentielle Aminosäuren	Seromed, Berlin

Penicillin/Streptomycin	Seromed, Berlin
Phenolrot	Merck, Darmstadt
Phosphatpuffer (PBS)	Seromed, Berlin
Türk's Lösung	Merck, Darmstadt
Tween 20	Roth, Karlsruhe

2.2.2 Zellisolation und Kultur

Isolation von CD4⁺-Zellen:

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
CD4+ T-cell Isolation Kit II human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS Separation LS Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mini MACS Magnetständer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Midi MACS Magnet	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Zellkulturmedien:

Zellkulturmedien	Zusammensetzung
IAB-Vollmedium für PBMC, T-Zellen und Monozyten:	Iscove mit • 4% hitzeinaktiviertes humanes AB-Serum • 1% L-Glutamin • 100µg/ml Penicillin/Streptomycin • 50µg/ml Gentamycin • 1% nichtessentielle Aminosäuren 0,2µm Sterilfiltration

2.2.3 Stimulation

Zytokine/Stimuli	Hersteller
Ciclosporin A (CsA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
humanes anti-CD3 (mAk)	Tebu/Peptrotech, Frankfurt a.M.
humanes anti-CD28 (mAk)	Tebu/Peptrotech, Frankfurt a.M.
humanes IL-2	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
humanes IL-4	R&D Systems, Wiesbaden
humanes IL-10	R&D Systems, Wiesbaden
humanes IL-12	R&D Systems, Wiesbaden
humanes IL-18	R&D Systems, Wiesbaden
humanes IL-23	R&D Systems, Wiesbaden
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tacrolimus zur i.v.-Applikation (Prograf®)	Fujisawa Deutschland, München

2.2.4 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
1xPBS:	Instamed 9,55g/l PBS-Pulver w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} wurde in 1000ml Aqua dest. gelöst
Waschpuffer für Immunfluoreszenz:	In 100ml PBS wurden gelöst: • 1ml 2M Natriumazide (130mg) • 0,2g Gelatine Lagerung bei 4°C
Blockpuffer für Immunfluoreszenz:	Auf 100ml wurde mit PBS aufgefüllt: • 20ml hitzeinaktiviertes humanes IgG (10mg/ml) • 1ml 2M Natriumazide (130mg) • 0,2g Gelatine Lagerung bei 4°C
Waschpuffer für Selbstbau-ELISA:	In PBS wurden gelöst: • 0,05% Tween 20 pH 7,4
Puffer für CD4^{+} -T-Zellisolation (MACS-Puffer):	In PBS wurden gelöst: • 0,5% Bovines Serum Albumin • 2mM EDTA pH 7,4, Sterilfiltration 0,2µm, Lagerung bei 4°C

2.2.5 Durchflusszytometrie

monoklonale Antikörper	Hersteller
APC-conjugated mouse anti-human-IFN- γ mAb	BD, Heidelberg
rat anti-human IL-12R β 2 mAb	BD Pharmingen
CD3-PE mAb	Coulter Immunotech, Hamburg
CD3-FITC mAb	Coulter Immunotech, Hamburg
CD4-PE mAb	Coulter Immunotech, Hamburg
CD4-FITC mAb	Coulter Immunotech, Hamburg
CD8-PE mAb	Coulter Immunotech, Hamburg
CD8-FITC mAb	Coulter Immunotech, Hamburg
CD14-PE mAb	Coulter Immunotech, Hamburg
CD14-FITC mAb	Coulter Immunotech, Hamburg
CD20-FITC mAb	Coulter Immunotech, Hamburg
CD54-PE mAb	Coulter Immunotech, Hamburg
CD54-FITC mAb	Coulter Immunotech, Hamburg
Isotypic Control IgG1	Coulter Immunotech, Hamburg

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
Cytofix/Cytoperm Kit	BD Biosciences, Heidelberg
FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
CELLQuestPro™	BD Biosciences, Heidelberg

2.2.6 ELISA

Stimuli	Hersteller
Ready-Set-Go human IFN γ Elisa	Biocarta, Hamburg
Easy Reader EAR400AT	SLT/TECAN Lab instruments, Crailsheim, Österreich

2.2.7 Kern- & Zytoplasmaextraktion

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
NE-PER Nuclear and Cytoplasmatic Extraction Reagents Kit	Pierce, Bonn
Complete Mini Protease Inhibitor Control Tablets (1 Tablette in je 7ml CER1 bzw. NER gelöst)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

2.2.8 Proteinbestimmung nach Biuret

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
Protein Assay Standard 2 (Lyophilized Bovine Serum Albumin)	Bio-Rad, München
Dc Protein Assay Reagent A	Bio-Rad, München
Dc Protein Assay Reagent B	Bio-Rad, München
Dc Protein Assay Reagent S	Bio-Rad, München
Easy Reader EAR400AT	SLT/TECAN Lab instruments, Crailsheim, Austria

2.2.9 EMSA

Chemikalien/Reagenzien		Hersteller
Nitrocellulose Gel	Rotiphorese Gel 40 (gebrauchsfertige, gasstabilisierte, wässrige, 38%ige Acrylamidstammlösung mit 2%Bisarylamid)	Roth, Penzberg
	Rotiophorese 10x TBE Buffer	Roth, Penzberg
	Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Penzberg
	TEMED p.a. 99%	Roth, Penzberg
	LightShift® Chemiluminescence EMSA Kit	Pierce, Bonn
Biodyne B Precut Modified Nylon Membranes, 0.45µm (8x12cm)		Pierce, Bonn
Mini-PROTEAN 3 Cell		Bio-Rad, München
TransBlot SD Semi-Dry Transfer Cell		Bio-Rad, München
ChemiImager™ 4400		Biozym, Hess. Oldendorf
UV Stratalinker 1800		Stratagene

2.2.10 Reverse Transkription und PCR

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
High Pure RNA Isolation Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
1 st strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
DsDNA binding dye SYBR® Green	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
LightCycler™	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Relative Quantification Software	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

2.3 Geräte und sonstige Hilfsmittel

Geräte und Hilfsmittel	Hersteller
Autoklav, Tecnoklav 50	Tecnomara, Fernwald
Brutschrank	Heraeus, Hanau
ChemiImager™ 4400	Biozym, Hess. Oldendorf
ELISA-Lesegerät, Easy Reader EAR400AT	SLT/TECAN Lab instruments, Crailsheim, Österreich
FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Deutschland
Gefrierschrank (-80°C)	GFL, Burgwedel
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Deutschland
Light Cycler System für Real-time-PCR	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
MACS Separation LS Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mini MACS Magnetständer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Midi MACS Magnet	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikroskop	Zeiss, Jena
Mikroskopkamera MC 8 DX	Zeiss, Jena
Mikrowelle	Moulinex, Frankreich
Minifuge	Heraeus, Hanau
Neubauer-Improved (Objektträger, Tiefe 0,1mm, 0,0025mm ²)	Jürgens, Omnilab-Laborzentrum Hannover
pH-Meter	Jürgens, Omnilab-Laborzentrum Hannover
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Biozym, Hessisch Oldendorf
Spektrofluorometer Aminco Bowman Series	SLM-AMINCO Bowman, Urbana, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifuge: Rotina 46 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

2.4 *Computerprogramme*

Software	Firma
AlphaEase Software Version 5.5.	AlphaInnotech, San Leandro, USA
CELLQuestPro™	BD Biosciences, Heidelberg
Relative Quantification Software	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Sigma Stat für Windows Version 2.03.	Jandel Scientific, Erkrath

Allgemeine Labor- und Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und Plastikwaren für die Zellkultur wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Nunc (Wiesbaden), Roth (Karlsruhe), Greiner (Solingen), Becton-Dickinson (Heidelberg) und Sarstedt (Nürnberg) bezogen.

3 Ergebnisse

3.1 *Induktion der IFN- γ -Produktion von Lymphozyten durch Ciclosporin A*

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass humane T-Lymphozyten (PBMC, deren Anteil an Monozyten durch Adhärenzverfahren reduziert wurde, sowie aufgereinigte CD4⁺-T-Zellen) vermehrt IFN- γ produzieren, wenn eine TCR- und CD28-Stimulation in Gegenwart von IL-12 und Calcineurinantagonisten wie CsA oder Tacrolimus (FK506) (siehe 3.6) erfolgt. Nachgewiesen wurde dies sowohl auf Proteinebene mittels ELISA (siehe 3.1.1) und Durchflusszytometrie (siehe 3.7.1) als auch auf mRNA-Ebene (siehe 3.7.2) durch quantitative Real Time PCR. Die TCR- und Kostimulation wurde mit anti-CD3-Ak und anti-CD28-Ak, aber auch mit Allergenen durchgeführt. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich zwischen Atopikern und Normalpersonen (siehe 3.1.2) und eine zeitkinetische Analyse (siehe 3.2.1) sowie die Ermittlung von Schwellenwerten für die Konzentrationen der verwendeten Antikörper und IL-12 (siehe 3.2.2). Die Gegenwart von IL-12 ist notwendige Voraussetzung für einen IFN- γ -Anstieg, so blieb bei Aktivierung mit anderen Zytokinen wie IL-2, IL-18, IL-4 und IL-23 die vermehrte Produktion aus (siehe 3.3.1). Der CsA-induzierte Anstieg des IFN- γ bei Stimulation über TCR/CD28 und IL-12 war nicht durch die Th2-Zytokine IL-4 und IL-10 antagonisierbar (siehe 3.5). In PCR- und EMSA-Experimenten war keine vermehrte mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors ERM („*Ets related molecule*“) sowie Protein-DNA-Bindung von T-bet (siehe 3.8), wohl aber ein verzögert eintretender CsA-vermittelter Anstieg der mRNA-Expression und Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren c-fos (siehe 3.9) und AP-1 (siehe 3.10) detektierbar.

3.1.1 Anstieg der IFN- γ -Produktion durch CsA bei TCR- und Kostimulation in Gegenwart von Interleukin 12

Der Einfluss von CsA auf die IFN- γ -Produktion von PBMC, bei Stimulation über den TCR und CD28-Kostimulation sowie Gegenwart von IL-12, wurde u.a. mittels IFN- γ -ELISA untersucht. Dazu wurden die Zellen mit anti-CD3-Ak und anti-CD28-Ak plus CsA in den drei Konzentrationen 100ng/ml, 10ng/ml und 1ng/ml inkubiert. Gegebenfalls wurden die Zellen zeitgleich oder 24 Stunden zuvor mit IL-12 aktiviert. Nach Ablauf der 48stündigen Inkubationszeit wurde die IFN- γ -Konzentration im Überstand mit Hilfe eines ELISA gemessen.

Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse: In den Kulturen, die lediglich über den TCR und CD28 aktiviert wurden, führte CsA in den Konzentrationen 1ng/ml und 10ng/ml zu einer signifikanten Reduktion der IFN- γ -Produktion. Erfolgte nun zusätzlich zeitgleich eine Stimulation mit IL-12, kam es in Anwesenheit von CsA zu einer Erhöhung der IFN- γ -Produktion auf >2,5fache im Vergleich zum Wert der Kontrolle „anti-CD3/-CD28-Ak plus IL-12“. Der Anstieg fiel für die höheren CsA-Konzentrationen 10ng/ml und 100ng/ml signifikant aus. Dieser Effekt ließ sich ebenfalls bei 24stündiger Vorinkubation mit IL-12 beobachten. Auffällig war ein geringfügig höheres Konzentrationsniveau der gesamten Versuchsreihe über dem der Kulturen ohne Vorinkubation mit IL-12. Der Anstieg fiel ebenfalls bei CsA-Konzentrationen von 10ng/ml und 100ng/ml signifikant aus. In beiden Versuchsreihen ließ sich erkennen, dass mit Verringerung der CsA-Dosis auch die IFN- γ -Produktion abnahm, so dass eine Konzentration von 1ng/ml CsA zu keinem signifikanten Anstieg mehr führte.

IFN- γ -Produktion nach Stimulation mit IL-12

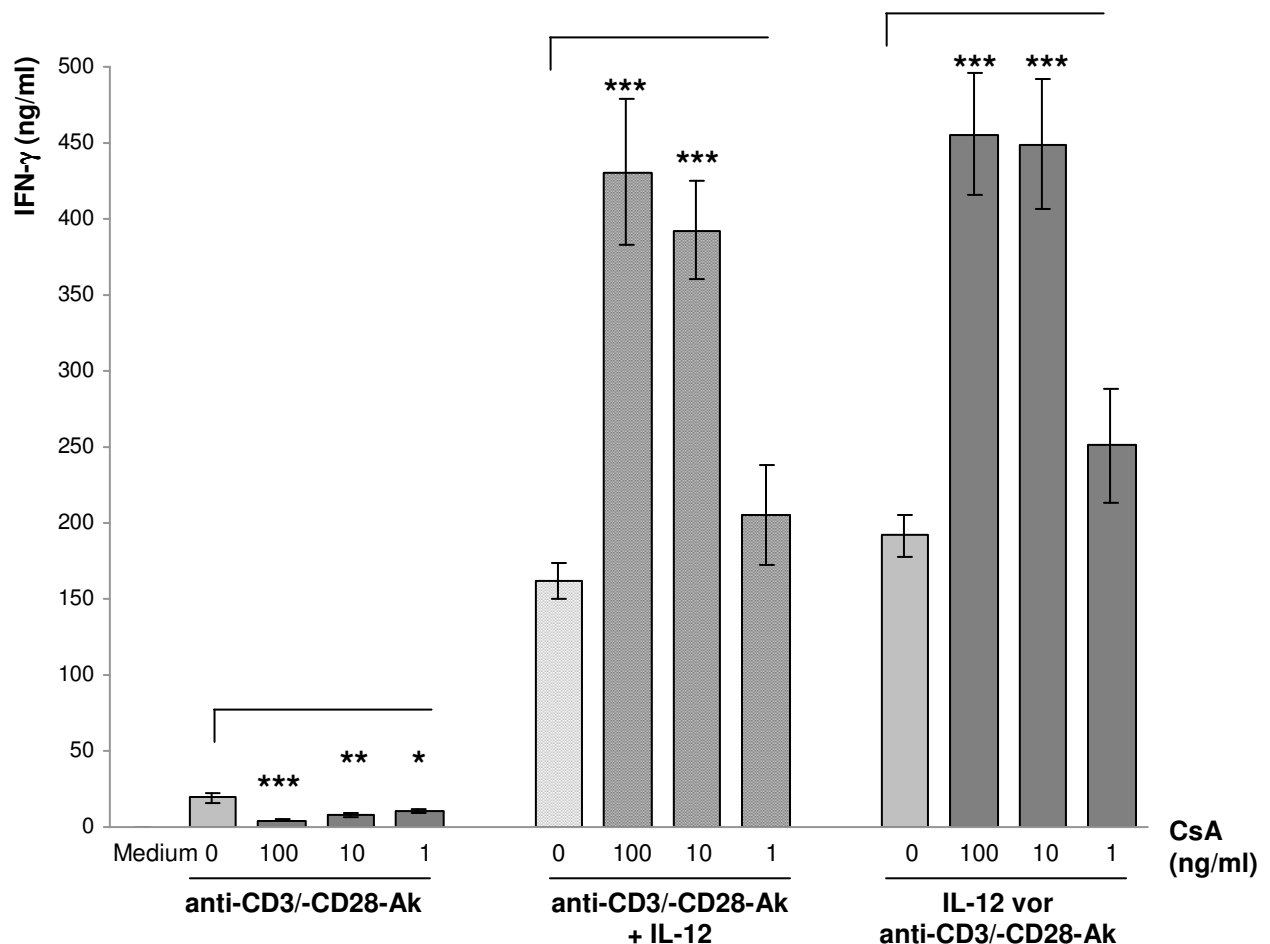


Abbildung 3.1: Effekt von CsA auf die IFN- γ -Produktion von PBMC nach 48stündiger Stimulation über TCR/CD28 und mit IL-12.

1x10⁵ PBMC/200 μ l wurden mit folgenden Antikörpern und Zytokinen stimuliert: anti-CD3-Ak 1 μ g/ml, anti-CD28-Ak 0,2 μ g/ml, IL-12 10ng/ml und CsA in den Konzentrationen 100ng/ml, 10ng/ml und 1ng/ml. In den letzten vier Fällen erfolgte eine Vorstimulation mit IL-12 für 24 Stunden. Als

Negativkontrolle diente Medium. Die Überstände wurden nach 48stündiger Inkubation abgenommen und im IFN- γ -ELISA analysiert.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der gemessenen IFN- γ -Konzentrationen und die SEM (n=16).

Die Abhängigkeit des beobachteten IFN- γ -Anstiegs von der Höhe der CsA-Konzentration lässt sich in der folgenden prozentualen Darstellung besonders gut veranschaulichen. Die Mittelwerte der IFN- γ -Produktion nach

- TCR- und Kostimulation + IL-12 + CsA und
- nach 24stündiger Vorinkubation mit IL-12 und anschließender Stimulation mit anti-CD3/-CD28-Ak + CsA

wurden auf die jeweiligen Werte der Kontrolle „ohne CsA“ normalisiert.

Auch in dieser Darstellung ist eine signifikante Zunahme der IFN- γ -Produktion auf >2,5fache durch Inkubation mit CsA in den Konzentrationen 10ng/ml und 100ng/ml erkennbar. Während die vorherige Abbildung noch den Eindruck erweckte, dass es durch eine 24stündige Vorinkubation mit IL-12 zu einer stärkeren Erhöhung der IFN- γ -Produktion käme, lässt sich nun erkennen, dass der relative Anstieg der IFN- γ -Konzentration in beiden Fällen sehr ähnlich ausfiel.

IFN- γ -Produktion nach Stimulation mit IL-12

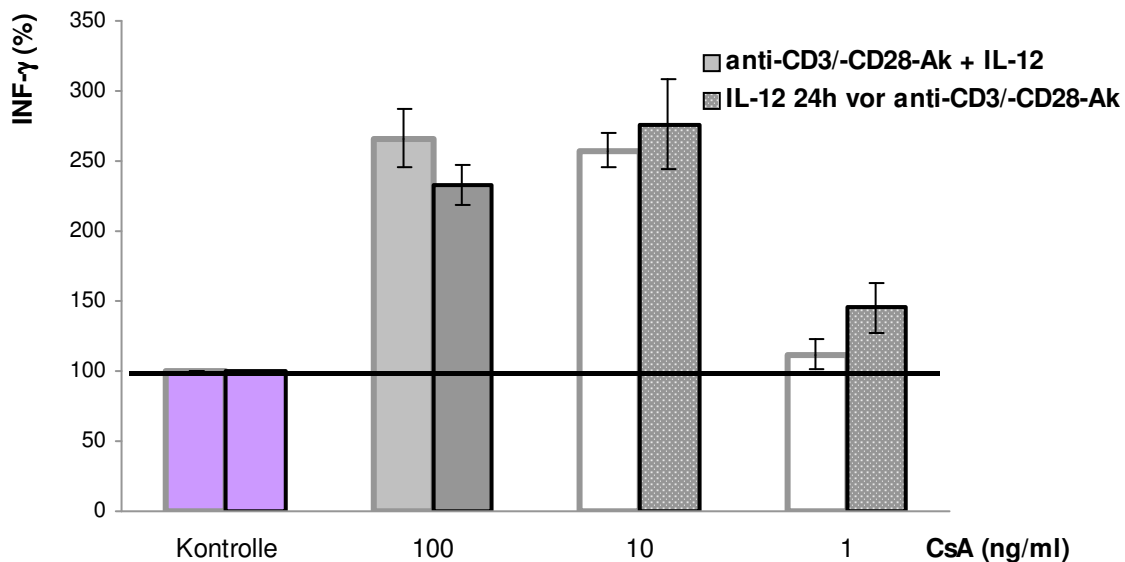


Abbildung 3.2: Prozentualer Vergleich der IFN- γ -Produktion nach 48stündiger Stimulation, normalisiert auf Kontrollkultur ohne Aktivierung mit IL-12

1×10^5 PBMC/200 μ l wurden mit folgenden Antikörpern und Zytokinen stimuliert: anti-CD3-Ak 1 μ g/ml, anti-CD28-Ak 0,2 μ g/ml, IL-12 10ng/ml und drei verschiedenen Konzentrationen an CsA 100ng/ml, 10ng/ml und 1ng/ml. In der rechts dargestellten Versuchsreihe erfolgte eine Vorstimulation mit IL-12 für 24 Stunden. Die Überstände wurden nach 48stündiger Inkubation abgenommen und im IFN- γ -ELISA analysiert.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der gemessenen IFN- γ -Konzentrationen, normalisiert auf die Werte der Kontrolle „anti-CD3/-CD28-Ak plus IL-12“, und die SEM (n=16).

Der CsA-induzierte IFN- γ -Anstieg ließ sich ebenfalls für stark aufgereinigte CD4⁺-T-Zellen nachweisen. Es ist unschwer zu erkennen, dass es auch hier zu sehr starken Anstiegen der Werte bei Inkubation mit CsA kam. Wie bei den PBMC war auch bei den CD4⁺-Lymphozyten ersichtlich, dass dieser Effekt abhängig von der Gegenwart von IL-12 war. So kam es bei Absenz von IL-12 ebenso zu einer CsA-vermittelten Suppression der IFN- γ -Produktion.

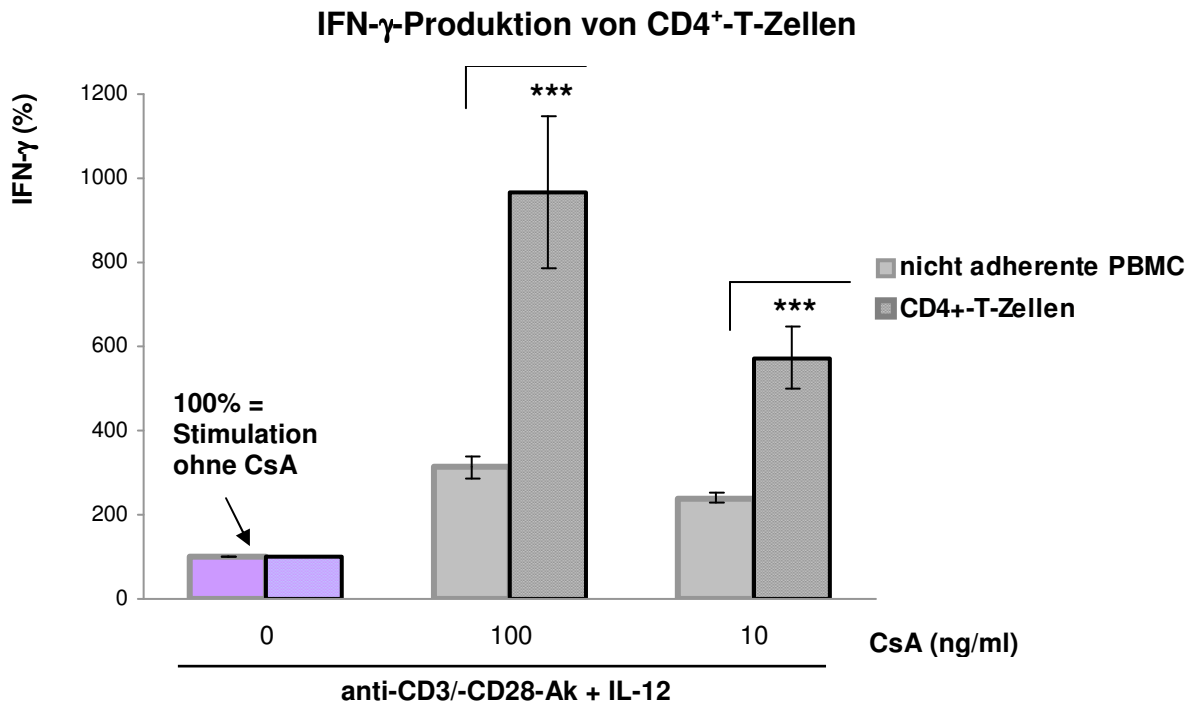


Abbildung 3.3: IFN- γ -Produktion von CD4⁺-T-Zellen nach Inkubation mit CsA

1x10⁵ CD4⁺-T-Zellen/200 μ l wurden mit folgenden Konzentrationen an Antikörpern und Zytokinen stimuliert: anti-CD3-Ak 1 μ g/ml, anti-CD28-Ak 0,2 μ g/ml, IL-12 10ng/ml und drei verschiedenen Konzentrationen an CsA 100ng/ml, 10ng/ml und 1ng/ml. Die Überstände wurden nach 48stündiger Inkubation abgenommen und mittels IFN- γ -ELISA analysiert.

Die Abbildung zeigt die gemessenen IFN- γ -Konzentrationen, normalisiert auf die Werte der Kontrolle „anti-CD3/-CD28-Ak plus IL-12“ (n=8).

3.1.2 Unterschiede in der Induktion der IFN- γ -Produktion von Lymphozyten durch CsA zwischen Normalpersonen und Atopikern

Das Kollektiv der Versuchspersonen wurde aufgeteilt in die Gruppe der Atopiker, d.h. Patienten, die Krankheiten des atopischen Formenkreises, wie atopische Dermatitis oder eine allergische Rhinitis zeigten, und in die der Normalpersonen. Weiterhin wurde ein aktueller positiver RAST für eine Einteilung als Atopiker vorausgesetzt und die systemische Einnahme von Immunmodulatoren wie Kortikosteroiden ausgeschlossen.

Nach 48stündiger Kultur schien ein verstärktes Ansprechen der Lymphozyten von Atopikern auf die höheren CsA-Konzentrationen erkennbar, während die Zellen von Normalpersonen insgesamt mit einem geringeren Anstieg der IFN- γ -Produktion reagierten, welche in niedrigen Konzentrationsbereichen die der atopischen Zellen allerdings überstieg. Dies galt sowohl für die zeitgleiche Applikation aller Stimuli, als auch für die 24stündige Vorstimulation mit IL-12 (ohne Abbildung).

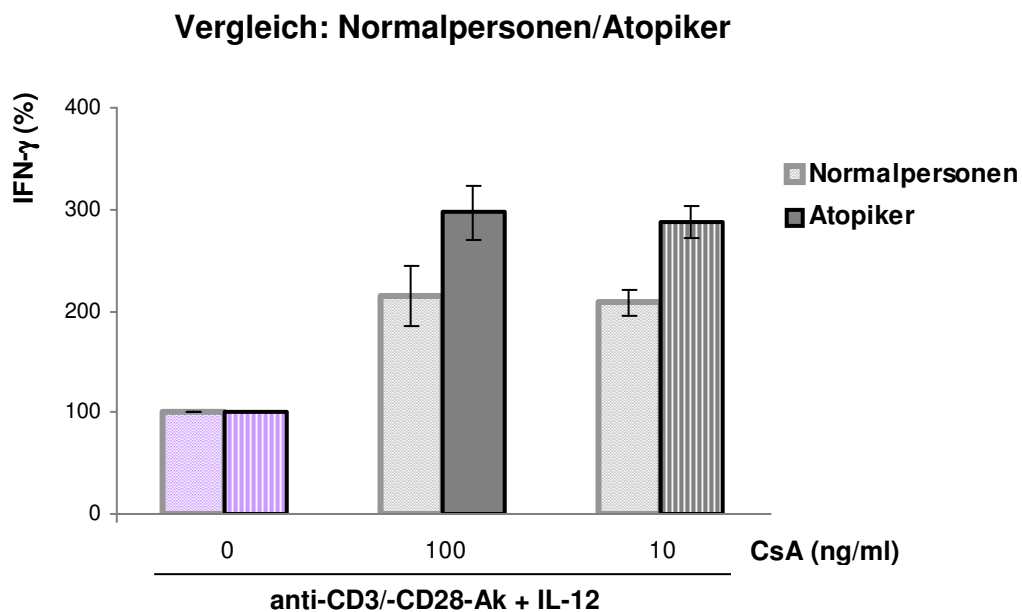


Abbildung 3.4: Vergleich der CsA-vermittelten IFN- γ -Induktion zwischen Atopikern und Normalpersonen

1×10^5 PBMC/200 μ l wurden mit folgenden Antikörpern und Zytokinen stimuliert: anti-CD3-Ak 1 μ g/ml, anti-CD28-Ak 0,2 μ g/ml, IL-12 10ng/ml und drei verschiedenen Konzentrationen an CsA 100ng/ml und 10ng/ml. Nach 48stündiger Kultur wurden die IFN- γ -Konzentration in den Überständen ermittelt.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der gemessenen IFN- γ -Konzentrationen, normalisiert auf die Mittelwerte der Kontrolle „anti-CD3/-CD28-Ak plus IL-12“, und die SEM (Normalpersonen n=6, Atopiker n=10).

3.2 Einfluss von Inkubationszeit und Konzentration der Antikörper und Zytokine

3.2.1 Abhängigkeit der IFN- γ -Produktion von der Inkubationszeit

Um den Einfluss der Inkubationszeit auf die IFN- γ -Produktion zu untersuchen, erfolgte eine zeitkinetische Analyse. Hierzu wurden PBMC über einen Zeitraum von 24, 48, 72 und 96 Stunden mit anti-CD3/-CD28-Ak plus IL-12 jeweils mit und ohne CsA in der Konzentration 10ng/ml aktiviert. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurde die IFN- γ -Konzentration in den Überständen mit Hilfe eines ELISA ermittelt.

In der zeitkinetischen Darstellung ist zu erkennen, dass mit der Dauer der Inkubation die IFN- γ -Konzentration stetig zunahm. Dies galt sowohl für die Kontrolle „TCR- und Kostimulation plus IL-12“ als auch für die zusätzliche Stimulation mit CsA. Dabei war der Unterschied zwischen dem 24- und dem 48-Stundenwert der Kultur „plus CsA“ signifikant (Paired t-test: $P=0.048$).

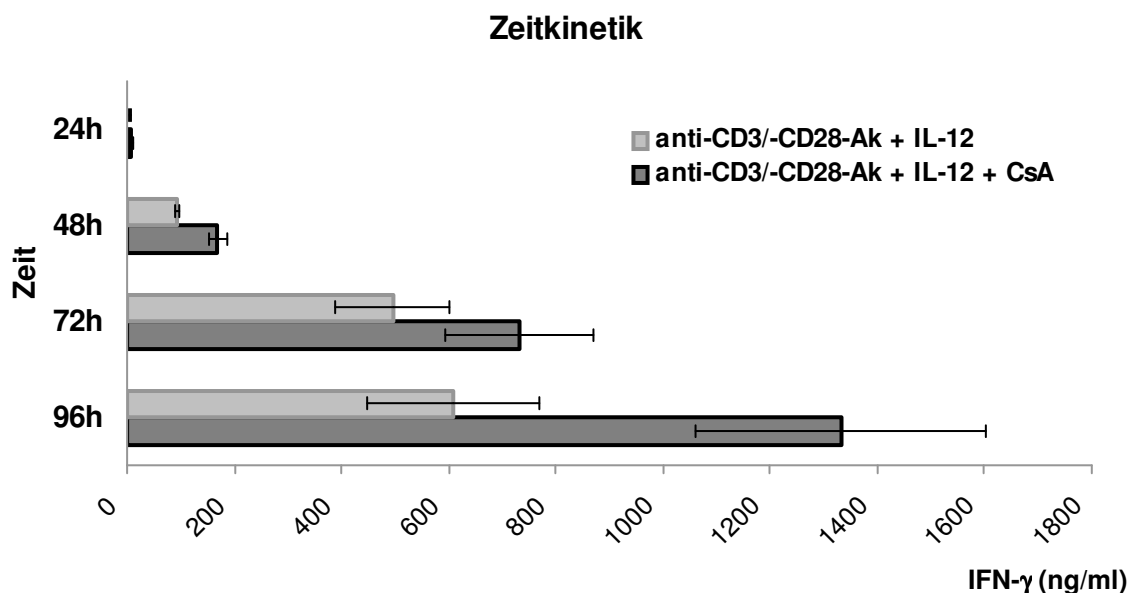


Abbildung 3.5: Abhängigkeit der IFN- γ -Produktion von der Inkubationszeit

1×10^5 PBMC/200 μ l wurden mit folgenden Antikörpern und Zytokinen stimuliert: anti-CD3-Ak 1 μ g/ml, anti-CD28-Ak 0,2 μ g/ml, IL-12 100ng/ml und CsA 10ng/ml. Die Überstände wurden jeweils nach 24-, 48-, 72-, 96ständiger Inkubation abgenommen und im IFN- γ -ELISA analysiert.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der gemessenen IFN- γ -Konzentrationen und die SEM (n=3).

Der statistische Unterschied war im Paired t-test signifikant ($p \leq 0.05$). Der Übersichtlichkeit halber wurde hier dennoch eine Säulendarstellung gewählt.

3.2.2 Einfluss der Konzentrationen von Interleukin 12 und anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern

Interleukin 12

Um den Schwellenwert der IL-12-Konzentration zu bestimmen, die zu einer maximalen Steigerung der IFN- γ -Produktion von Lymphozyten bei Stimulation über TCR/CD28 plus IL-12 jeweils mit und ohne CsA führt, wurde eine Titrationsreihe mit den IL-12-Konzentrationen 0,01ng/ml, 0,1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml und 200ng/ml erstellt. Im Anschluss an die 48stündige Kultur wurden die Überstände im IFN- γ -ELISA analysiert.

Dabei schien der Effekt der IFN- γ -Hochregulation bei TCR- und Kostimulation plus IL-12 und CsA gegenüber der Kultur ohne Inkubation mit dem Calcineurinantagonisten unabhängig von der IL-12-Konzentration. Im Konzentrationsbereich von 0,01 bis 0,1ng/ml IL-12 unterschieden sich die Werte nur geringfügig von denen der Kontrolle „anti-CD3/-CD28-Ak“. Ab einer Konzentration von 1ng/ml ließ sich allerdings ein exponentieller Anstieg des IFN- γ beobachten. Die Werte der Kontrolle „anti-CD3/-CD28-Ak plus IL-12“ stiegen um mehr als 500%, ebenso wie die der Kulturen „plus CsA“, bei denen eine Steigerung um fast 400% zu beobachten war. Eine weitere Erhöhung der IL-12-Konzentration bis auf 200ng/ml zeigte keinen zusätzlichen Effekt. In einem ähnlichen Experiment trat bei einer Konzentration von 1000ng/ml allerdings wieder einen Abfall der IFN- γ -Produktion auf.

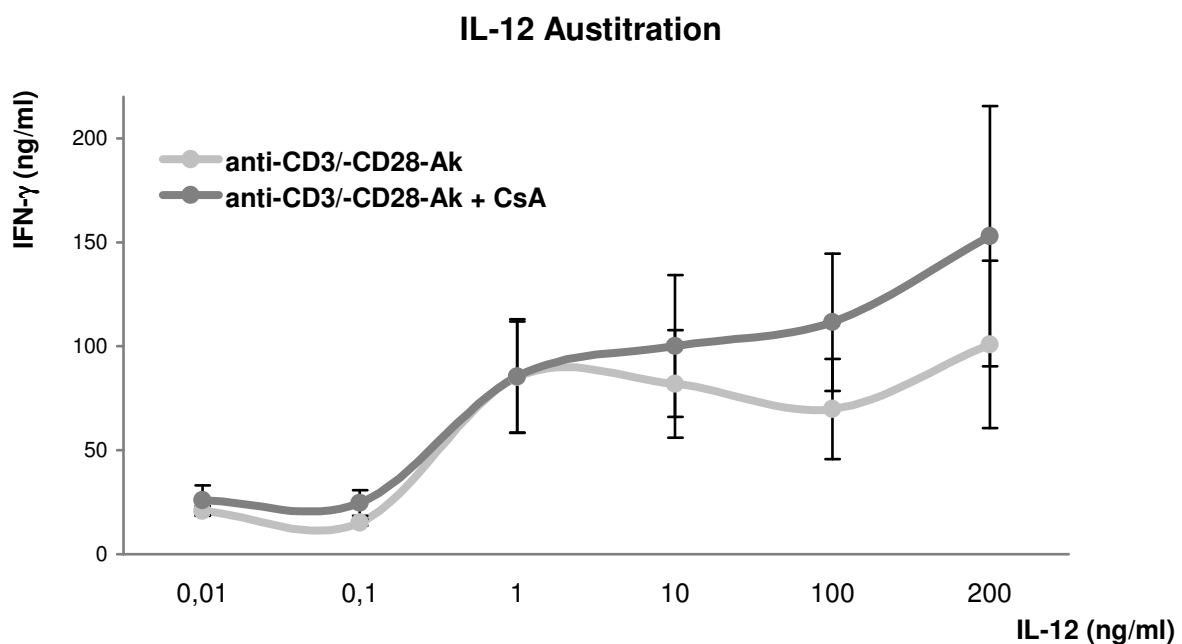


Abbildung 3.6: Abhängigkeit der IFN- γ -Produktion von der IL-12-Konzentration

1×10^5 PBMC/200 μ l wurden mit folgenden Antikörpern und Zytokinen stimuliert: anti-CD3-Ak 1 μ g/ml, anti-CD28-Ak 0,2 μ g/ml, IL-12 (siehe Titrationsreihe) und CsA 10ng/ml. Für IL-12 wurde

eine Titrationsreihe mit den Konzentrationen 0,01ng/ml, 0,1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml, 200ng/ml und 1000ng/ml erstellt. Die Überstände wurden nach 48stündiger Inkubation abgenommen und im IFN- γ -ELISA analysiert.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der gemessenen IFN- γ -Konzentrationen und die SEM (n=8).

anti-CD3/-CD28-Ak

Zur Bestimmung der Schwellenwerte der Konzentrationen von anti-CD3-Ak und anti-CD28-Ak, die ebenfalls zu einer maximalen Steigerung der IFN- γ -Produktion von T-Lymphozyten in Gegenwart von IL-12 $\pm$ CsA führen, wurden auf gleiche Weise Titrationsreihen erstellt. Die Titrationsreihen umfassten folgende Konzentrationen an anti-CD3-Ak: 0ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml, 1000ng/ml und 2000g/ml. Für anti-CD28-Ak wurden folgende Konzentrationen gewählt: 0ng/ml, 0,2ng/ml, 2ng/ml, 20ng/ml, 200ng/ml und 1000ng/ml. Die Kulturen wurden 48 Stunden lang inkubiert und die Überstände anschließend auf ihren Gehalt an IFN- γ hin im ELISA analysiert.

Für die Konzentration von anti-CD3-Ak ergab sich aus den Verdünnungsreihen ein Schwellenwert von 100ng/ml. Im Vergleich zur nächstgeringeren Konzentration stiegen die Werte der Kontrolle „anti-CD3/-CD28-Ak plus IL-12“ um mehr als das neunfache. Noch größere Steigerungen traten unter dem zusätzlichen Einfluss von CsA auf, wo Anstiege auf mehr als das 58fache zu beobachten waren. Anschließend verdoppelte sich die IFN- γ -Produktion lediglich bei jeder weiteren Konzentrationserhöhung.

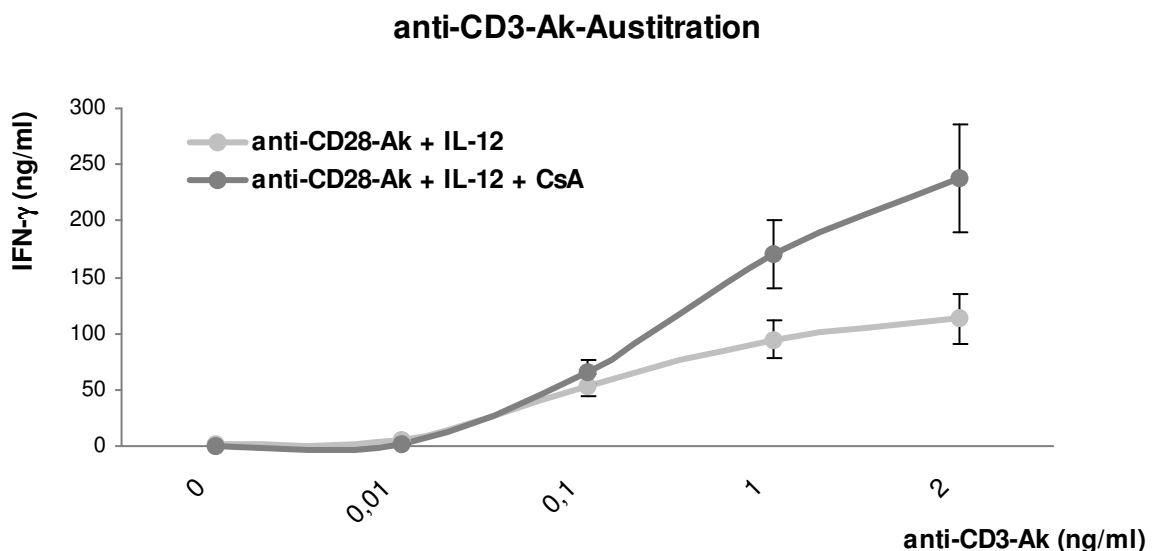


Abbildung 3.7: Abhängigkeit der IFN- γ -Produktion von der anti-CD3-Ak-Konzentration

1x10⁵ PBMC/200 μ l wurden mit folgenden Konzentrationen an Antikörpern und Zytokinen anti-CD3-Ak (siehe Titrationsreihe), anti-CD28-Ak 0,2 μ g/ml, IL-12 10ng/ml und CsA 10ng/ml stimuliert. Für anti-CD3-Ak wurde eine Titrationsreihe mit den Konzentrationen 0ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml, 1000ng/ml und 2000ng/ml erstellt. Die Überstände wurden nach 48stündiger Kultur abgenommen und im IFN- γ -ELISA analysiert.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der gemessenen IFN- γ -Konzentrationen und die SEM (n=5).

Der Schwellenwert für die anti-CD28-Ak-Konzentration betrug 200ng/ml. Eine weitere Konzentrationserhöhung auf 1000ng/ml führte lediglich zu einer zusätzlichen Steigerung der IFN- γ -Produktion um das 2,7fache bei der Kultur „plus CsA“. Die der Kontrolle fiel noch geringer aus. Im niedrigeren Konzentrationsbereich bestanden nur geringe Unterschiede zwischen den Kulturen mit und ohne Inkubation mit dem Calcineurinantagonisten.

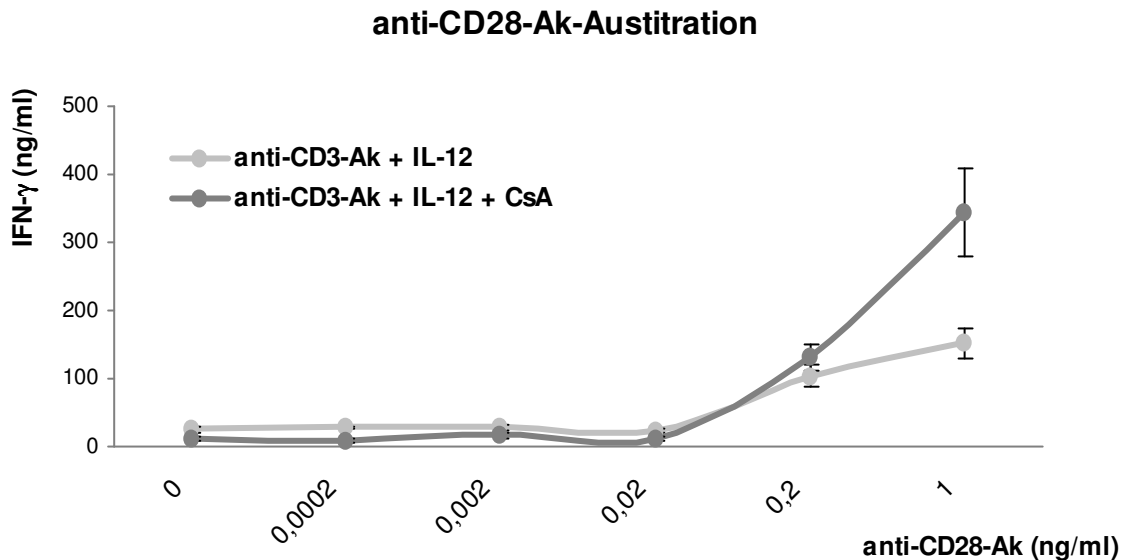


Abbildung 3.8: Abhängigkeit der IFN- γ -Produktion von der anti-CD28-Ak-Konzentration

1×10^5 PBMC/200 μ l wurden mit folgenden Antikörpern und Zytokinen stimuliert: anti-CD3-Ak 1 μ g/ml, anti-CD28-Ak (siehe Titrationsreihe), IL-12 10ng/ml und CsA 10ng/ml. Für anti-CD28-Ak wurde eine Titrationsreihe mit den Konzentrationen 0ng/ml, 0,2ng/ml, 2ng/ml, 20ng/ml, 200ng/ml und 1000ng/ml erstellt. Die Überstände wurden nach 48stündiger Inkubation abgenommen und im IFN- γ -ELISA analysiert.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der gemessenen IFN- γ -Konzentrationen und die SEM (n=5).

3.3 *Einfluss weiterer Zytokine auf die Induktion der IFN- γ Produktion durch Ciclosporin A*

3.3.1 Keine Induktion der IFN- γ -Produktion durch die Zytokine IL-2, IL-4, IL-18 und IL-23

Nachdem in den vorherigen Abschnitten demonstriert werden konnte, dass CsA in Kombination mit TCR- und Kostimulation und IL-12 die IFN- γ -Produktion von Lymphozyten induziert, sollte nun der Einfluss weiterer Zytokine anstelle von IL-12 untersucht werden. Die Versuchspersonen hatten in vorherigen Experimenten allesamt eine IFN- γ -Induktion durch CsA gezeigt. Die Zellen wurden wiederum 48 Stunden lang mit anti-CD3-Ak und anti-CD28-

Ak, als Kostimulus, plus CsA in den drei Konzentrationen 100ng/ml, 10ng/ml und 1ng/ml inkubiert. Je nach Versuchsreihe wurden die Zellen nun zusätzlich mit unterschiedlichen Zytokinen stimuliert. Untersucht wurde der Einfluss von IL-2, IL-4, IL-18 und IL-23, weiter unten dargestellt. Anschließend wurde die IFN- γ -Konzentration im Überstand mit Hilfe eines ELISA gemessen.

Zum besseren Vergleich sind die nachfolgenden Ergebnisse im gleichen Maßstab dargestellt. In der Kontrolle zeigte sich die bereits bekannte signifikante CsA-vermittelte Herunterregulation des IFN- γ . Gleichmaßen kam es auch bei zusätzlicher Aktivierung mit IL-2 zu einem signifikanten Absinken der IFN- γ -Produktion durch CsA in der Konzentration 100ng/ml. Bei niedrigeren CsA-Konzentrationen fiel die Reduktion geringer aus. Ähnliches ließ sich auch für eine Stimulation mit IL-4, allerdings auf einem niedrigeren Konzentrationsniveau, und mit IL-18, in einem höheren Konzentrationsbereich, nachweisen. Auch in diesen beiden Fällen führte CsA (100ng/ml) zu einer signifikanten Reduktion des IFN- γ . Entsprechende Effekte ließen sich auch für CD4⁺-Lymphozyten demonstrieren.

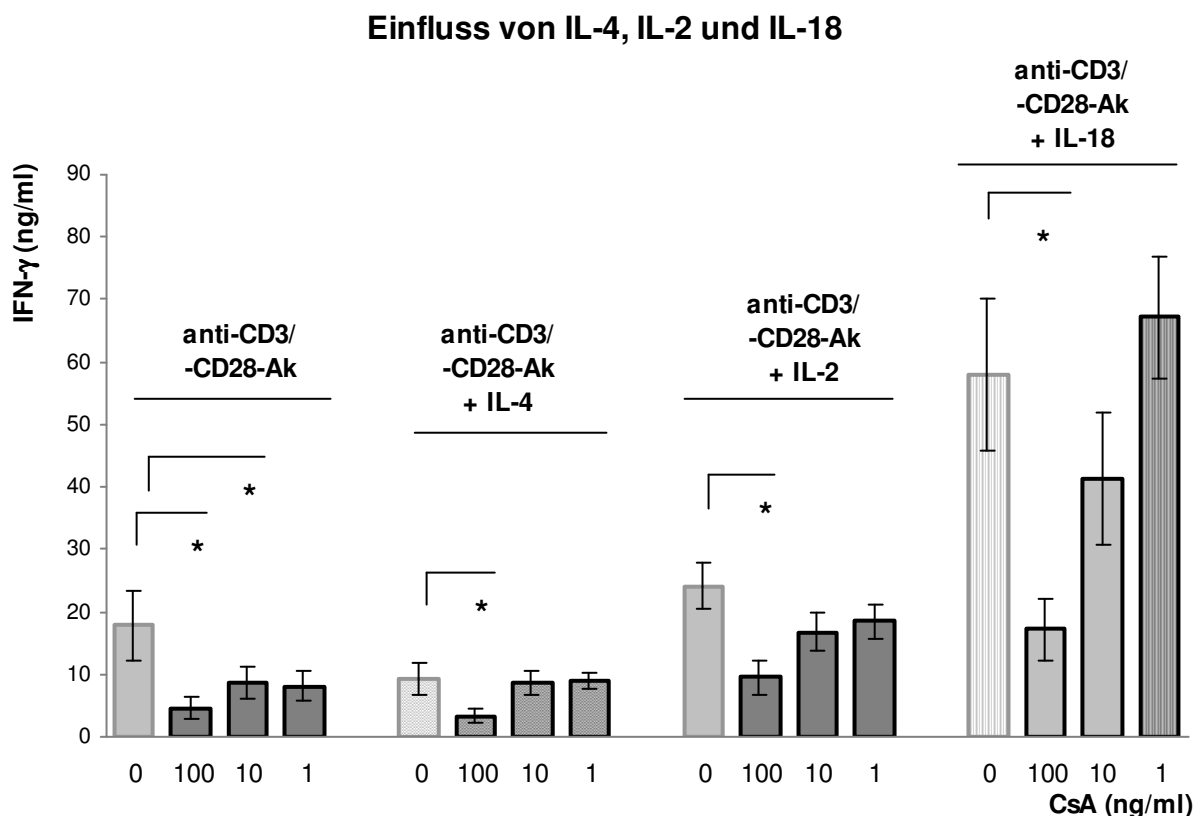


Abbildung 3.9: Einfluss der Interleukine 4, 2 und 18 auf die IFN- γ -Produktion von PBMC bei Inkubation mit CsA

1x10⁵ PBMC/200 μ l wurden mit folgenden Antikörpern und Zytokinen stimuliert: anti-CD3-Ak 1 μ g/ml, anti-CD28-Ak 0,2 μ g/ml, drei verschiedene Konzentrationen an CsA 100ng/ml, 10ng/ml und 1ng/ml und je nach Versuchsreihe entweder mit IL-2 10ng/ml, IL-4 20ng/ml oder IL-18 50ng/ml. Als Kontrolle diente eine Versuchsreihe ohne Zusatz von Zytokinen. Die Überstände wurden nach 48ständiger Inkubation abgenommen und im IFN- γ -ELISA analysiert.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der gemessenen IFN- γ -Konzentrationen und die SEM (n=8).

Auch für IL-23 konnte keine Induktion der IFN- γ -Produktion durch CsA nachgewiesen werden. Stattdessen war wie bei Stimulation mit den Zytokinen IL-2, IL-4 und IL-18 ein Absinken des IFN- γ in Gegenwart von CsA, insbesondere bei höheren Konzentrationen (100ng/ml), zu beobachten. Bei Werten von 1ng/ml CsA erreichte die IFN- γ -Konzentration wieder das Niveau der Kontrolle. Hier exemplarisch anhand eines Versuchs dargestellt. Es erfolgten noch zwei weitere Wiederholungsexperimente.

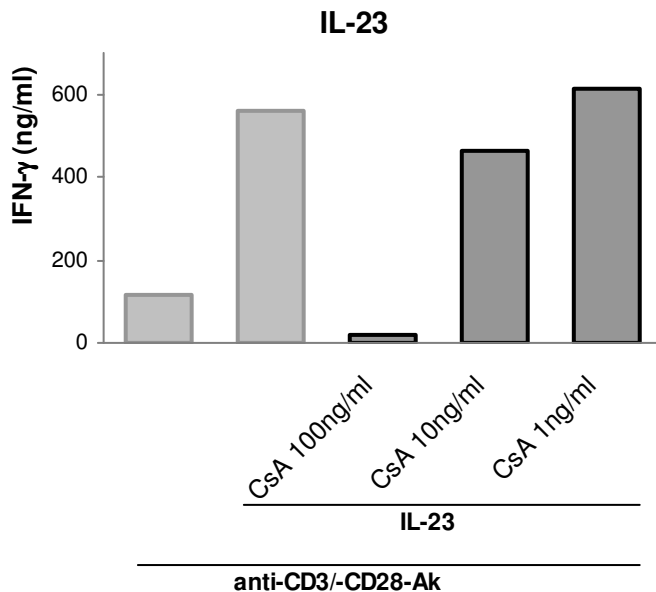


Abbildung 3.10: Einfluss von IL-23 auf die IFN- γ -Produktion von PBMC bei Inkubation mit CsA

1×10^5 PBMC/200 μ l wurden mit folgenden Konzentrationen an Antikörpern und Zytokinen anti-CD3-Ak 1 μ g/ml, anti-CD28-Ak 0,2 μ g/ml, IL-23 100ng/ml und drei verschiedene Konzentrationen an CsA 100ng/ml, 10ng/ml und 1ng/ml stimuliert. Die Überstände wurden nach 48stündiger Kultur abgenommen und im IFN- γ -ELISA analysiert.

Die Abbildung zeigt die gemessene IFN- γ -Konzentrationen. Es erfolgten noch zwei Wiederholungsexperimente.

3.4 Alternativen zur TCR- und Kostimulation und ihre Auswirkungen auf die IFN- γ -Produktion

3.4.1 Keine Induktion der IFN- γ -Produktion durch Kombination von IL-12 und IL-18

In den folgenden Experimenten sollte der Einfluss der Signalübertragung über den TCR und über den kostimulatorischen Rezeptor CD28 untersucht werden. Hierzu wurden die Lymphozyten nur mit IL-12 und IL-18 jeweils mit und ohne CsA aktiviert. In einem weiteren Versuch erfolgte zusätzlich eine Stimulation mit anti-CD3-Ak. Als Positivkontrolle diente eine Kultur, deren PBMC über TCR und CD28 plus IL-12 $\pm$ CsA (10ng/ml) aktiviert wurden. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 48 Stunden wurde die IFN- γ -Konzentration im Überstand durch einen ELISA ermittelt.

Während in der Positivkontrolle der erwartete CsA-induzierte Anstieg der IFN- γ -Produktion nachgewiesen werden konnte, war dieser Effekt bei einer Aktivierung mit den Lymphokinen 12 und 18 plus CsA im Vergleich zur Inkubation ohne den Calcineurinantagonisten nicht zu beobachten. Zwar führte in einem weiteren Versuch eine zusätzliche Stimulation mit anti-CD3-Ak zu einer Hochregulation des IFN- γ , diese trat allerdings unabhängig von CsA auf.

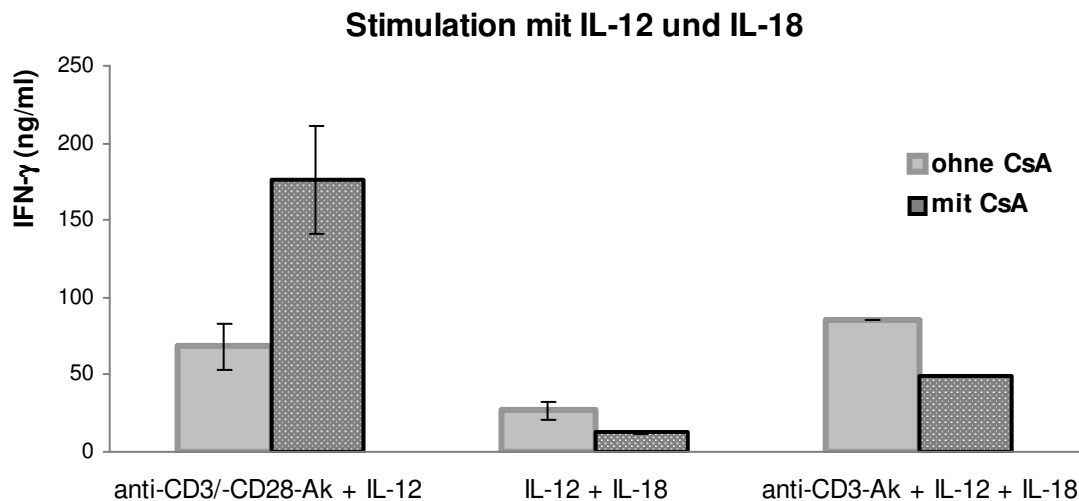


Abbildung 3.11: Effekt von IL-12 plus IL-18 auf die IFN- γ -Produktion bei Inkubation mit CsA

1×10^5 PBMC/200 μ l wurden mit folgenden Antikörpern und Zytokinen stimuliert: anti-CD3-Ak 1 μ g/ml, anti-CD28-Ak 0,2 μ g/ml, IL-12 100ng/ml, IL-18 20ng/ml und CsA 10ng/ml. Die Überstände wurden nach 48stündiger Inkubation abgenommen und im IFN- γ -ELISA analysiert.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der gemessenen IFN- γ -Konzentrationen und die zugehörigen SEM (n=2), im letzten Fall nur exemplarische Darstellung.

3.5 *Keine Aufhebung des „CsA-Effektes“ durch Th2-Zytokine*

1998 veröffentlichten Rafiq et al. Ergebnisse, wonach der Anstieg der IFN- γ -Produktion in Gegenwart von CsA auf die Aufhebung der endogenen Suppression durch IL-4 und IL-10, verursacht durch den Calcineurinantagonisten, zurückzuführen sei. Hierzu fügten sie mit CsA behandelten Kulturen rhIL-4 und rhIL-10 (jeweils 20ng/ml) zu. Sie stellten für drei Experimente nach 4tägiger Kultur eine partielle Inhibition des CsA (400ng/ml)-vermittelten IFN- γ -Anstiegs durch IL-4 und eine komplette Aufhebung durch Zugabe von IL-10 fest³³.

3.5.1 Gegentitration mit IL-4

In Anlehnung an die Versuche von Rafiq et al. wurde mit CsA behandelten Kulturen rhIL-4 zugefügt. Die Zellen wurden 48 Stunden lang mit anti-CD3/-CD28-Ak plus IL-12 $\pm$ CsA (10ng/ml) inkubiert. Als Positivkontrolle diente eine Kultur ohne IL-4-Zusatz jeweils mit und ohne CsA-Inkubation. Den weiteren Zellkulturen wurde IL-4 in aufsteigender Konzentration zugefügt. Die Titrationsreihe umfasste die Konzentrationen 0,1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml und abschließend 100ng/ml. Nach zweitägiger Kultur wurde die IFN- γ -Konzentration im Überstand mittels ELISA ermittelt.

Es konnte gezeigt werden, dass rhIL-4 keineswegs zu einer Inhibition des „CsA-Effektes“ auf die IFN- γ -Produktion führte. Stattdessen kam es sogar zu einer weiteren Steigerung der IFN- γ -Hochregulation. Diese war sowohl für die Kulturen ohne als auch für die Kulturen „mit CsA“ zu beobachten. Die prozentuale Auswertung letzterer ließ ebenfalls deutlich den zusätzlichen Anstieg durch IL-4, insbesondere für die Konzentrationen 0,1 und 1ng/ml, erkennen.

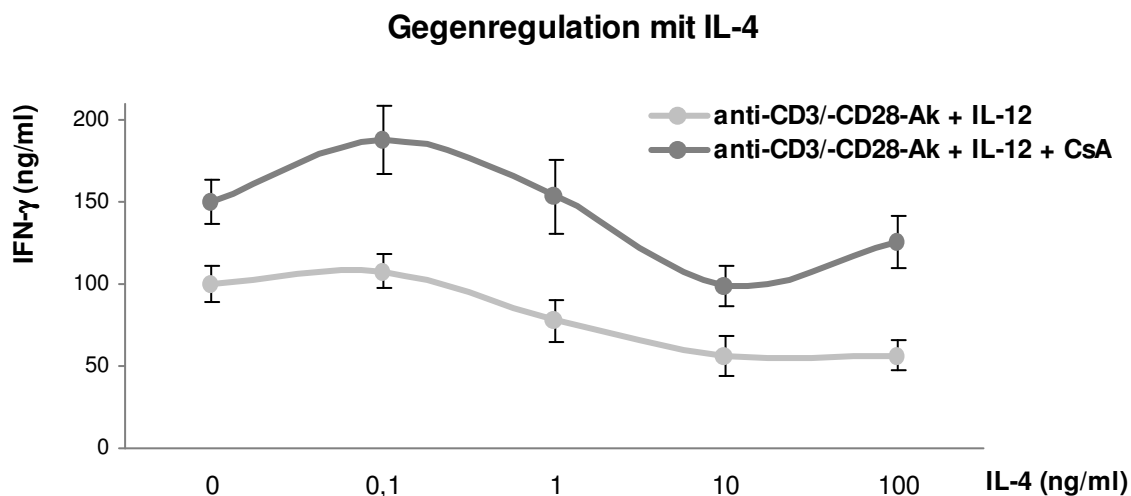


Abbildung 3.12: Keine Aufhebung der CsA-vermittelten IFN- γ -Induktion durch IL-4

1×10^5 PBMC/200 μ l wurden mit folgenden Konzentrationen an Antikörpern und Zytokinen stimuliert: anti-CD3-Ak 1 μ g/ml, anti-CD28-Ak 0,2 μ g/ml, IL-12 10ng/ml, IL-4 (mit Ausnahme der Kontrolle) $\pm$ CsA 10ng/ml (+ CsA = dunkle Linie, - CsA = helle Linie). Für IL-4 wurde eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 0,1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml und 100ng/ml erstellt. Nach 48stündiger Kultur wurde die IFN- γ -Konzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der gemessenen IFN- γ -Konzentrationen in ng/ml plus die SEM für n=12.

3.5.2 Gegentitration mit IL-10

Analog zu 3.5.1 erfolgten weiterhin Experimente, um die von Rafiq et al. beschriebene komplette Aufhebung des CsA-induzierten IFN- γ -Anstiegs durch rhIL-10 zu untersuchen.

Als Positivkontrolle diente, wie bereits oben beschrieben, eine Kultur ohne rhIL-10-Zusatz, jeweils mit und ohne CsA. Den weiteren Zellkulturen wurde rhIL-10 in aufsteigender Konzentration (0,1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml und 100ng/ml) zugefügt.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Rafiq et al. lässt die Abbildung wie für IL-4, allerdings in geringerem Ausmaße, auch in diesem Fall eine weitere Steigerung des IFN- γ -Anstiegs, hervorgerufen durch rhIL-10, erkennen. Die Hochregulation war sowohl für die Kulturen ohne als auch für die mit CsA-Inkubation zu beobachten und fiel für die Konzentration 1ng/ml am größten aus. Eine „komplette Aufhebung“ des CsA-Effektes auf die IFN- γ -Produktion ließ sich durch die Experimente ausschließen.

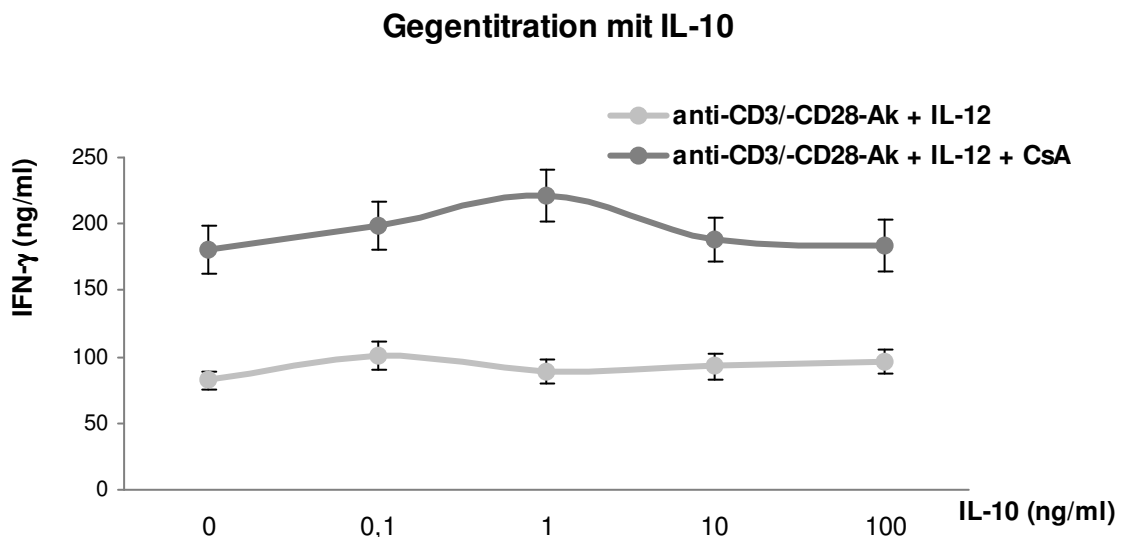


Abbildung 3.13: Keine Aufhebung der CsA-vermittelten IFN- γ -Induktion durch IL-10

Analoger Versuchsaufbau wie bei „Gegentitration mit IL-4“ lediglich mit IL-10, siehe daher auch Abb.3.14.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen in ng/ml (+ CsA = dunkle Linie, - CsA = helle Linie) plus die SEM (n=13).

3.6 Einfluss des Calcineurinantagonisten Tacrolimus (FK506) auf die IFN- γ -Produktion von Lymphozyten

Nachdem in den vorherigen Abschnitten ausführlich beschrieben wurde, dass CsA unter bestimmten Bedingungen die IFN- γ -Produktion von Lymphozyten induzieren kann, sollte nun der Einfluss des Calcineurinantagonisten Tacrolimus (FK506) auf dieselbige untersucht werden.

Dazu wurden die Kulturen analog zu den Versuchen in Abschnitt 3.1.1 mit anti-CD3-Ak, anti-CD28-Ak und IL-12 plus Tacrolimus in Konzentrationen von 0,01ng/ml bis 1000ng/ml für 48 Stunden stimuliert. Anschließend wurde die IFN- γ -Konzentration im Überstand mit Hilfe eines ELISA's bestimmt.

Wie für CsA konnte auch für Tacrolimus eine Induktion der IFN- γ -Produktion von PBMC nachgewiesen werden. Auch dieser Effekt war IL-12-abhängig. Bei Präsenz von IL-12 und Tacrolimus reagierten die PBMC mit einer Steigerung der IFN- γ -Produktion, die ihr Maximum bei einer Tacrolimuskonzentration von 1ng/ml erreichte. Im Vergleich zur Kontrolle kam es zu einem Anstieg auf >225%. Dies entsprach dem Effekt von CsA auf die IFN- γ -Produktion von Lymphozyten.

Vergleich der IFN- γ -Induktion durch CsA und Tacrolimus

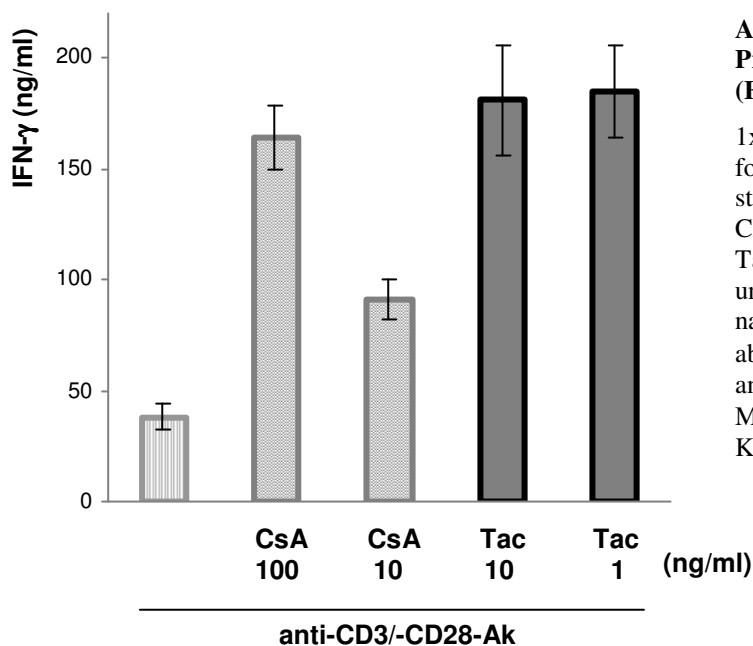


Abbildung 3.14: Induktion der IFN- γ -Produktion durch Tacrolimus (FK506)

1×10^5 PBMC/200 μ l wurden mit folgenden Antikörpern und Zytokinen stimuliert: anti-CD3-Ak 1 μ g/ml, anti-CD28-Ak 0,2 μ g/ml, IL-12 10ng/ml und Tacrolimus in Konzentrationen 1ng/ml und 10ng/ml. Die Überstände wurden nach 48stündiger Inkubation abgenommen und im IFN- γ -ELISA analysiert. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der gemessenen IFN- γ -Konzentrationen und die SEM (N=6).

Dumont et al. konnten 1998 zeigen, dass Tacrolimus zu einer bis zu 500%igen Steigerung der anti-CD3/-CD28-Ak-induzierten IFN- γ -Produktion führt. Dazu stimulierten sie humane T-Zellen für die Dauer von 24 Stunden mit anti-CD3-Ak (0,4 μ g/ml) und anti-CD28-Ak in den

Konzentrationen 0,4µg/ml oder alternativ 0,1µg/ml. Zusätzlich wurde Tacrolimus in Konzentrationen von 10^{-2} nM bis 10^2 nM zu den Zellen gegeben. Anschließend wurde die IFN- γ -Konzentration in den Überständen mittels ELISA bestimmt⁵⁰.

Bei Wiederholung dieses Experiments konnte unter den hiesigen Versuchsbedingungen keine Induktion der IFN- γ -Produktion nachgewiesen werden. Stattdessen war bei Fehlen von IL-12 eine Suppression des IFN- γ zu beobachten.

3.7 „CsA-Effekt“ ebenfalls nachweisbar durch Durchflusszytometrie und PCR

In den vorherigen Kapiteln konnte auf Proteinebene mittels ELISA gezeigt werden, dass humane T-Zellen vermehrt IFN- γ produzieren, wenn eine TCR- und CD28-Stimulation in Gegenwart von IL-12 und Calcineurinantagonisten wie CsA oder Tacrolimus vorlag. Dieser Effekt des CsA ließ sich ebenfalls in durchflusszytometrischen Messungen und auf mRNA-Ebene durch PCR nachweisen.

3.7.1 Ciclosporin A induziert die IFN- γ -Produktion in mittels Allergen aktivierten proliferierten Lymphozyten

In durchflusszytometrischen Messungen war zu beobachten, dass CsA die IFN- γ -Produktion in Lymphozyten induziert, die zuvor mit Allergenen aktiviert worden waren. Dieser Effekt war insbesondere für proliferierte Lymphozyten nachweisbar und ließ sich mit verschiedenen Allergenen wie Birke und Hausstaubmilbe sowie Recall-Antigenen wie Tetanustoxoid hervorrufen.

Hierzu wurden zunächst T-Lymphozyten mit CFSE markiert, um deren Proliferation durchflusszytometrisch zu erfassen. Anschließend erfolgte die Stimulation mit einem Allergen plus kostimulatorischen Signal und IL-12 $\pm$ CsA (10ng/ml). Parallel wurden die Kontrollen mit anti-CD3/-CD28-Ak plus IL-12 $\pm$ CsA (10ng/ml) stimuliert. Nach Ablauf der Inkubationszeit von fünf Tagen wurde die Proliferation und die IFN- γ -Produktion im FACS gemessen.

In der nachfolgenden Abbildung ist auf der X-Achse die CFSE-Konzentration, nach oben zunehmend, dargestellt. Da eine vermehrte Proliferation mit einer Abnahme der CFSE-Dichte

einhergeht, nimmt die Proliferation von oben nach unten hin zu. Auf der X-Achse ist die intrazelluläre IFN- γ -Konzentration in APC, von links nach rechts ansteigend, abgebildet.

In der nichtstimulierten Kultur erkennt man die Ausgangspopulation. Eine Proliferation ist nicht zu erfassen, im Gegensatz zur Kontrolle „anti-CD3/-CD28-Ak plus IL-12“, in der eine deutliche Vermehrung der Lymphozyten stattfand. Diese Proliferation der Zellen wurde durch die Zugabe von CsA (10 und 100ng/ml) nicht inhibiert. Hingegen fällt eine vermehrte intrazelluläre IFN- γ -Konzentration der proliferierten T-Lymphozyten auf, auch erkennbar am angegebenen Wert des geometrischen Mittels im rechten unteren Quadranten.

Für eine Stimulation mit Allergenen, im dargestellten Fall mit Hausstaubmilbe (HDM), fällt die Proliferation zwar geringer aus, eine gesteigerte IFN- γ -Produktion der proliferierten Zellen, hervorgerufen durch CsA, ist aber auch hier nachweisbar. Es war nicht in allen untersuchten Fällen ein Anstieg der IFN- γ bei Allergenexposition zu beobachten. Möglicherweise besteht eine Abhängigkeit von der Stärke der TCR-Aktivierung oder Patienten-spezifische Unterschiede. Weitere Untersuchungen sind in Planung.

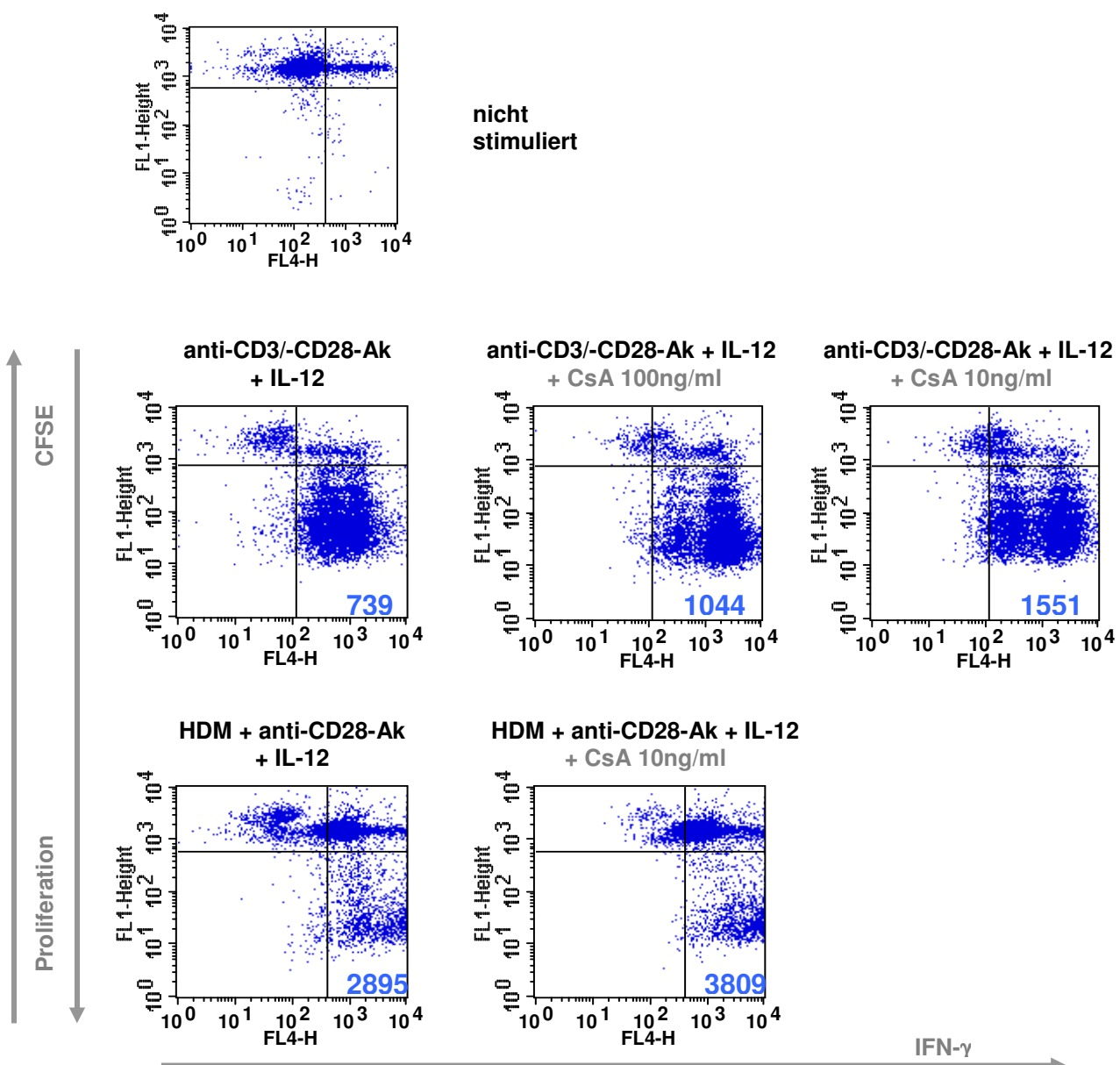


Abbildung 3.15a: Ciclosporin A induziert die IFN- γ -Produktion proliferierter Lymphozyten, die zuvor mit Allergenen aktiviert wurden.

CFSE (1 μ M)-markierte T-Lymphozyten wurden mit einem Allergen, in dargestellten Fall Hausstaubmilbe (HDM) (3 μ g/ml) + anti-CD28-Ak (0,2 μ g/ml) und IL-12 (10ng/ml) $\pm$ CsA (10ng/ml) aktiviert. Parallel erfolgte die Stimulation der Kontrollen mit anti-CD3-Ak (1 μ g/ml) + anti-CD28-Ak (0,2 μ g/ml) + IL-12 (10ng/ml) $\pm$ CsA (10 und 100ng/ml).

Nach Ablauf der Inkubationszeit von fünf Tagen wurden die Zellen für 2 Stunden mit PMA (10ng/ml), Ionomycin (400ng/ml) und Brefeldin A (3 μ g/ml) restimuliert. Anschließend wurde die Fluoreszenz im FL-1-H (CFSE) und die intrazelluläre IFN- γ -Expression im FL-4-H durchflusszytometrisch gemessen. Als Maß für die T-Zell-Proliferation diente die Abnahme der Fluoreszenz im FL-1-H (CFSE), wobei der Geo Mean (=geometrisches Mittel) im rechten unteren Quadranten ausgewertet wurde.

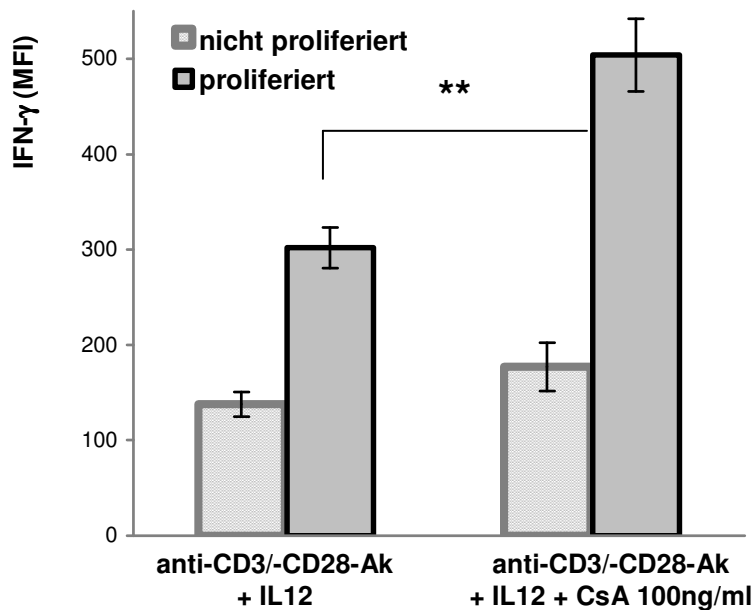


Abbildung 3.15b: CsA-induziertes IFN- γ in antigen- und IL-12-stimulierten Lymphozyten wird v.a. von proliferierten Zellen produziert.

Versuchsaufbau siehe Abb.3.18a.

3.7.2 CsA induziert in Kombination mit IL-12 einen verzögerten IFN- γ -mRNA-Anstieg

Parallel zu den auf Proteinebene beobachteten verzögerten IFN- γ -Anstiegen konnten wir in der IFN- γ -PCR eine Zunahme der IFN- γ -mRNA-Expression erst nach 24 Stunden feststellen.

CD4⁺-T-Zellen wurden für einen Zeitraum von vier und 24 Stunden mit anti-CD3-Ak und anti-CD28-Ak $\pm$ CsA stimuliert. In den in der Abb. jeweils rechts dargestellten Kulturen erfolgte zusätzlich eine Aktivierung mit IL-12. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurde die IFN- γ -mRNA-Expression durch Real-Time-PCR bestimmt und die Ergebnisse der Kulturen,

die zuvor mit CsA behandelt worden waren, auf die derjenigen normalisiert, die lediglich über TCR und kostimulatorischen Rezeptor $\pm$ IL-12 aktiviert worden waren.

Nach vier Stunden war sowohl für eine Stimulation ohne als auch mit IL-12 eine deutliche CsA-vermittelte Reduktion der IFN- γ -mRNA-Expression zu beobachten. Dagegen trat nach 24stündiger Kultur ein später IL-12-abhängiger Anstieg der Expression der IFN- γ -mRNA unter CsA auf.

CsA induziert IL-12-abhängig einen verzögerten IFN- γ -mRNA-Anstieg

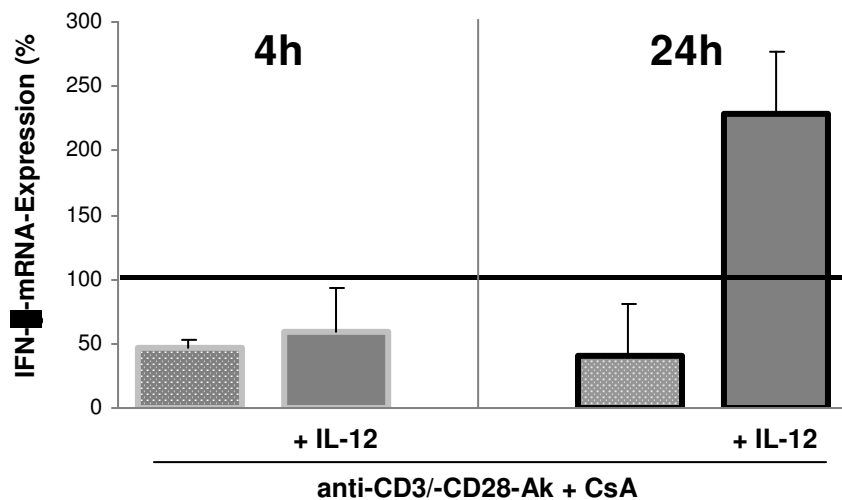


Abbildung 3.16: CsA induziert IL-12-abhängig einen verzögerten IFN- γ -mRNA-Anstieg

1×10^5 CD4⁺-T-Lymphozyten/200 μ l wurden mit Antikörpern und Zytokinen in folgenden Konzentrationen behandelt: anti-CD3-Ak 1 μ g/ml, anti-CD28-Ak 0,2 μ g/ml $\pm$ IL-12 10ng/ml $\pm$ CsA 10ng/ml.

Nach Ablauf der Inkubationszeit von vier bzw. 24 Stunden wurde die IFN- γ -mRNA-Expression durch PCR bestimmt und die Ergebnisse der Kulturen, die zuvor mit CsA behandelt worden waren, auf die derjenigen normalisiert, die lediglich über TCR/CD28 $\pm$ IL-12 stimuliert worden waren.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten sowie die SEM (n=4).

3.8 *Keine Hochregulation der Th1-assoziierten Transkriptionsfaktoren T-bet und ERM durch CsA in Kombination mit TCR- und CD28-Triggerung und IL-12*

Eine kritische Beteiligung des Transkriptionsfaktors T-bet am CsA-Effekt konnte in PCR- und EMSA-Experimenten zu den gemessenen Zeitpunkten nicht nachgewiesen werden.

Wie in der IFN- γ -PCR wurden CD4⁺-T-Zellen mit anti-CD3/-CD28-Ak $\pm$ CsA (10ng/ml) in An- bzw. Abwesenheit von IL-12 stimuliert. Nach Ablauf der Inkubationszeiten, vier und 24

Stunden, wurde die T-bet-mRNA-Expression bestimmt und auch hier die Ergebnisse der Kulturen, die zuvor mit CsA behandelt worden waren, auf die derjenigen normalisiert, die lediglich über TCR und durch kostimulatorische Signale $\pm$ IL-12 aktiviert worden waren.

Man erkennt, sowohl für eine Stimulation ohne als auch mit IL-12, eine Reduktion der T-bet-mRNA-Expression durch CsA. Dies galt für eine Inkubationszeit von vier ebenso wie für 24 Stunden.

verminderte T-bet-mRNA-Expression unter CsA

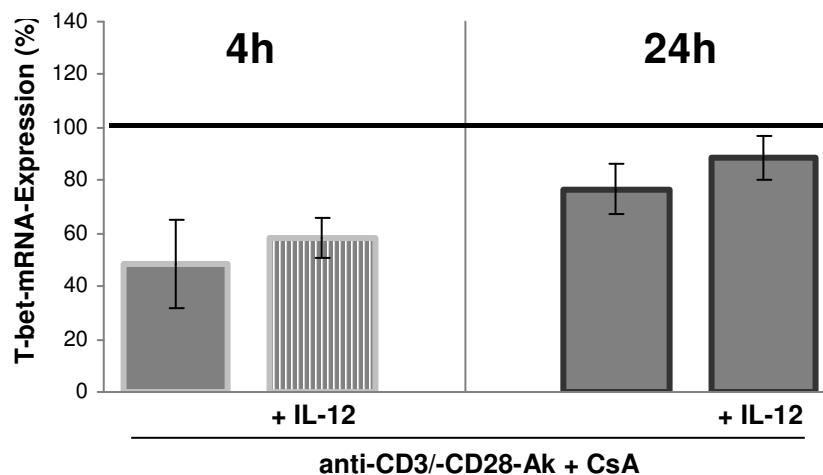


Abbildung 3.17: T-bet-mRNA-Expression ist unter CsA vermindert

1×10^5 CD4⁺-T-Lymphozyten/200 μ l wurden mit Antikörpern und Zytokinen in folgenden Konzentrationen stimuliert: anti-CD3-Ak 1 μ g/ml, anti-CD28-Ak 0,2 μ g/ml $\pm$ IL-12 10 ng/ml $\pm$ CsA 10 ng/ml.

Nach Ablauf der Inkubationszeiten (vier und 24 Stunden) wurde die T-bet-mRNA-Expression durch PCR bestimmt und die Ergebnisse der Kulturen, die zuvor mit CsA behandelt worden waren, auf die derjenigen normalisiert, die lediglich über TCR/CD28 $\pm$ IL-12 stimuliert worden waren.

Auch im nachfolgend dargestellten EMSA konnten wir keine erhöhte T-bet-DNA-Bindungsaktivität nachweisen: In der Kultur, die 24 Stunden über TCR und Korezeptor plus IL-12 stimuliert wurde, erkennt man deutlich die T-bet-Bande, die bei zusätzlicher Inkubation mit CsA wieder verschwindet.

Auch für ERM, einen weiteren Th1-assoziierten Transkriptionsfaktor, der, wie berichtet wurde, Zytokinsignale am IFN- γ -Promoter übermitteln soll, konnte keine Induktion der mRNA nachgewiesen werden (ohne Abbildung).

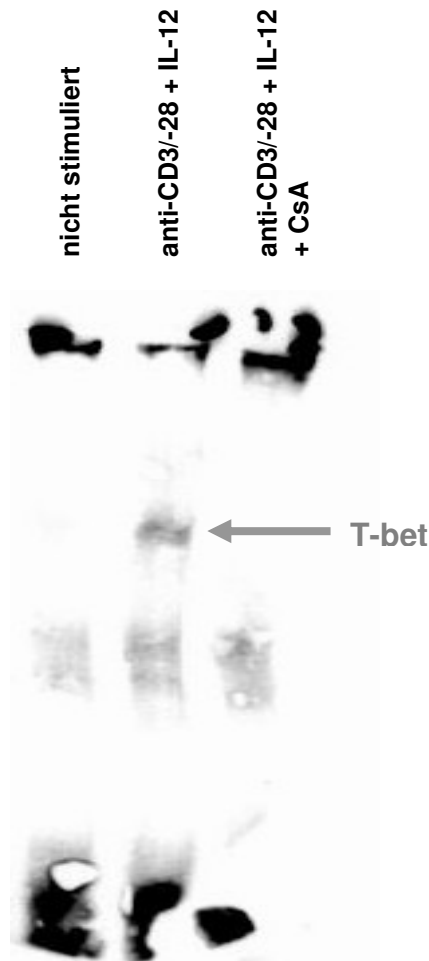


Abbildung 3.18: T-bet-DNA-Bindungsaktivität ist durch CsA vermindert.

1×10^7 $CD4^+$ -T-Lymphozyten/ml wurden mit Antikörpern und Zytokinen in folgenden Konzentrationen aktiviert: anti-CD3 $1 \mu\text{g/ml}$, anti-CD28-Ak $0,2 \mu\text{g/ml}$ + IL-12 10 ng/ml $\pm$ CsA 10 ng/ml . Nach 24stündiger Inkubation wurde die T-bet-DNA-Bindungsaktivität durch T-bet-EMSA ermittelt. Das Ergebnis ließ sich in zwei weiteren Wiederholungsexperimenten bestätigen.

3.9 *Erhöhte, späte c-fos-Bindungsaktivität und -mRNA-Expression durch CsA*

In den im folgenden dargestellten PCR- und EMSA-Experimenten konnte ein später Anstieg der c-fos-mRNA-Expression und der c-fos-Bindungsaffinität bei Inkubation mit CsA beobachtet werden.

$CD4^+$ -T-Lymphozyten wurden vier Stunden lang über TCR und CD28 plus IL-12 und, wo angegeben, mit CsA stimuliert. Im Anschluss erfolgte eine PCR zur Bestimmung der c-fos-mRNA, wobei die Ergebnisse der Kulturen „anti-CD3/-CD28-Ak + IL-12“ und „anti-CD3/-CD28-Ak + IL-12 + CsA“ auf die derjenigen normalisiert wurden, die nur mit anti-CD3-Ak und anti-CD28-Ak stimuliert worden waren.

Dabei war in allen Fällen ein Anstieg der c-fos-mRNA-Expression unter CsA im Vergleich zur Kontrolle „anti-CD3/-CD28-Ak + IL-12“ nach vier Stunden zu beobachten.

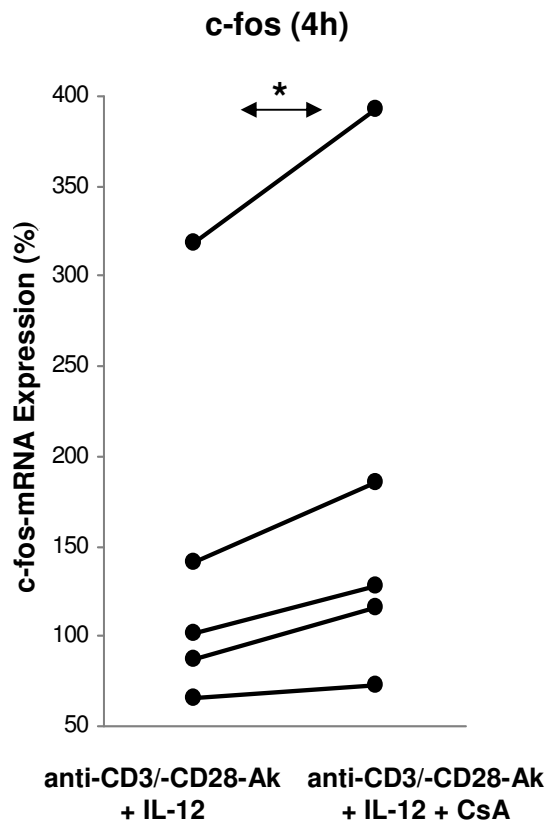


Abbildung 3.19: CsA führt zu einer erhöhten c-fos-mRNA-Expression.

1×10^5 CD4⁺-T-Lymphozyten/200 μ l wurden mit Antikörpern und Zytokinen in folgenden Konzentrationen stimuliert: anti-CD3 1 μ g/ml, anti-CD28-Ak 0,2 μ g/ml $\pm$ IL-12 10ng/ml $\pm$ CsA 10ng/ml.

Nach Ablauf der vierstündigen Inkubationszeit wurde die c-fos-mRNA durch PCR bestimmt und die Ergebnisse der beiden dargestellten Kulturen auf die derjenigen normalisiert, die lediglich über TCR und CD28 stimuliert worden waren. Die Abbildung zeigt fünf Experimente.

Zusätzlich konnten wir in weiteren EMSA-Versuchen nach 24 Stunden eine erhöhte c-fos-Bindungsaktivität feststellen, die nach 30 Minuten (hier rechts) noch nicht erkennbar war.

Die Stimulation war dabei die gleiche wie schon bei den PCR-Experimenten, die weiter oben bereits beschrieben wurden.

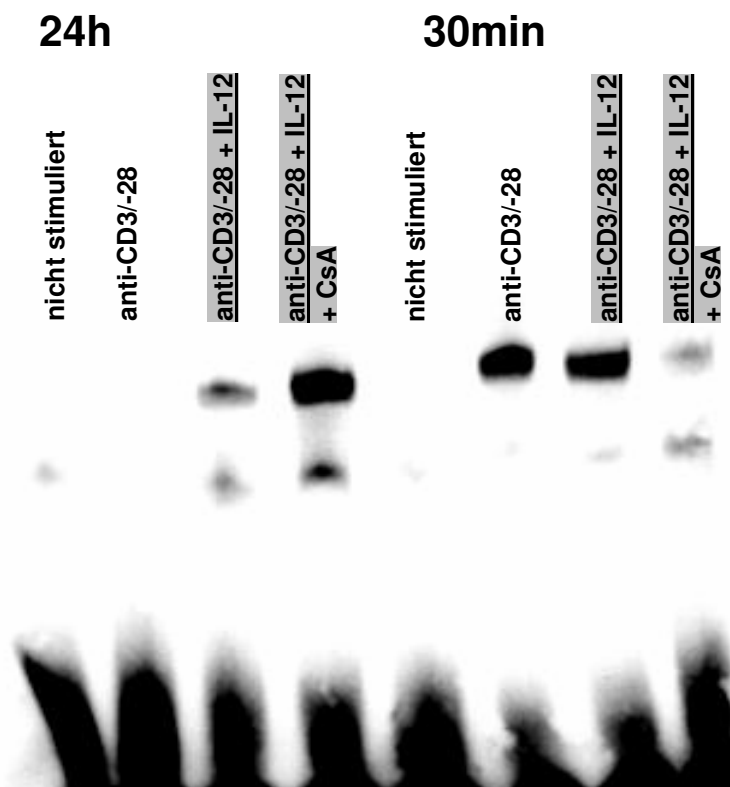


Abbildung 3.20: CsA führt nach 24h zu einer erhöhten c-fos-DNA-Bindungsaktivität.

1×10^7 CD4⁺-T-Lymphozyten/ml wurden mit Antikörpern und Zytokinen in folgenden Konzentrationen stimuliert: anti-CD3-Ak 1 μ g/ml, anti-CD28-Ak 0,2 μ g/ml $\pm$ IL-12 10ng/ml $\pm$ CsA 10ng/ml. Nach jeweils 30 Minuten und 24 Stunden Inkubationszeit wurde die c-fos-DNA-Bindungsaktivität durch c-fos-EMSA ermittelt.

Das Ergebnis ließ sich in einem Wiederholungsexperiment bestätigen.

Wegen der sehr unterschiedlichen Zeitkinetik und „Doserresponse“ der einzelnen Spender wurde auf Jurkat-Zellen zurückgegriffen.

3.10 *Verzögerte AP-1-Aktivierung in mit CsA stimulierten T-Zellen in Gegenwart eines TCR-Signales und IL-12*

In EMSA-Experimenten konnte mit einer zeitlichen Verzögerung eine gesteigerte DNA-Bindungsaktivität an einer AP-1-Bindungsstelle beobachtet werden. c-fos (kodiert für Fos, einem Teil des AP-1-Komplexes) ist als ein „frühes“ Gen bekannt, welches umgehend bereits 30 Minuten nach Aktivierung hochreguliert ist. In über den TCR und mit IL-12 aktivierten Zellen, die CsA ausgesetzt waren, konnte erst nach sechs Stunden ein Anstieg der DNA-Bindungsaktivität mittels EMSA nachgewiesen werden. Diese beobachtete Verzögerung passt zu den Daten, die für die IFN- γ -Expression/-Produktion und c-fos-mRNA-Expression ermittelt wurden. So war eine gesteigerte IFN- γ -mRNA-Expression erst nach 24 Stunden, nicht aber nach vier Stunden detektierbar. Übereinstimmend damit wurde nach 48 Stunden eine erhöhte IFN- γ -Produktion beobachtet.

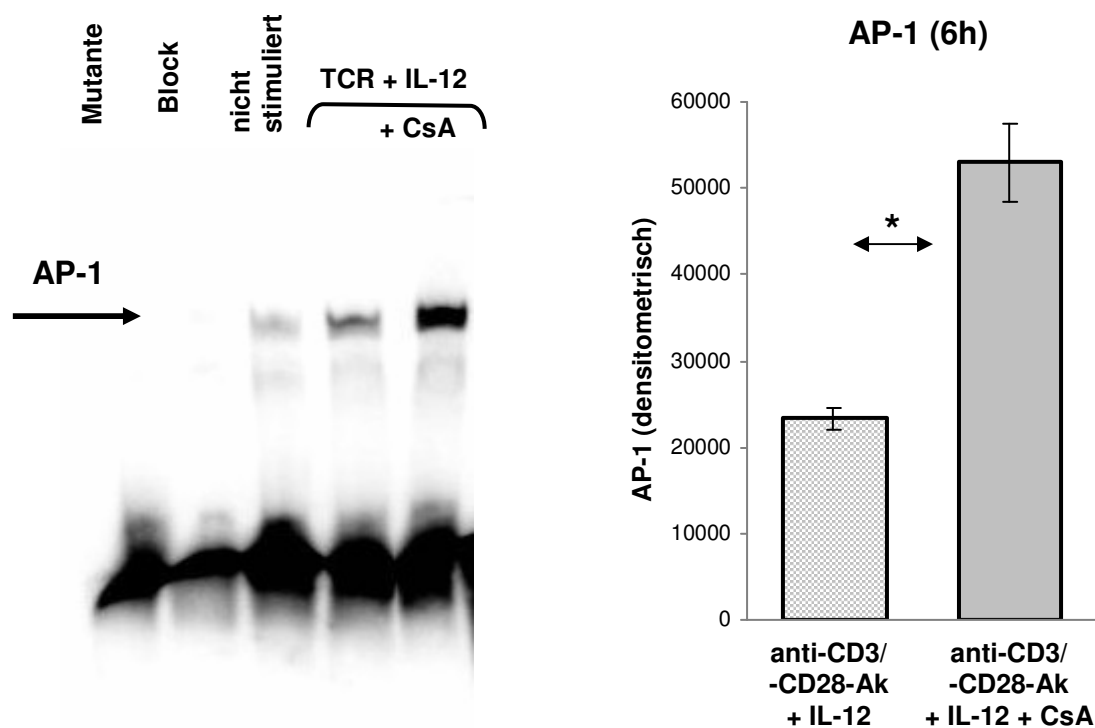


Abbildung 3.21: Anstieg der AP-1-DNA-Bindungsaktivität unter dem Einfluss von CsA.

Die AP-1-Protein-DNA-Aktivität wurde mittels EMSA in Jurkat-T-Zellen ermittelt. Die Zellen wurden stimuliert mit anti-CD3-Ak 1 μ g/ml, anti-CD28-Ak 0,2 μ g/ml $\pm$ IL-12 10ng/ml $\pm$ CsA 100ng/ml. Sechs Stunden nach der Stimulation wurden die Zellen lysiert und die Nukleii extrahiert. Für die Blocking-Experimente wurden ungelabelte Oligonukleotide, welche die gleiche Bindungsstelle für AP-1 wie gelabelte Oligonukleotide aufweisen, in 200fach höherer Konzentration eingesetzt; die „Mutanten“-Oligonukleotide wurden in der gleichen Konzentration wie die von AP-1 verwendet. Linksseitig ist ein repräsentatives Experiment abgebildet. Es erfolgte eine densitometrische Auswertung, vier unabhängige Experimente finden sich zusammengefasst rechtsseitig dargestellt.

3.11 *Keine Hochregulation der Zelloberflächenmolekül-Expression durch CsA in Kombination mit IL-12*

T-Lymphozyten, die mit CsA in Gegenwart von IL-12 behandelt wurden, waren nicht generell unsensibel für eine Inhibition ihrer Calcineurinaktivität. Das Zelloberflächenmolekül ICAM-1 (CD54) wurde durch CsA in allen untersuchten Konzentrationen sowohl in Messungen nach 24 als auch nach 48 Stunden deutlich herunterreguliert. Eine signifikante Verminderung wurde ebenfalls für den IL-12R β 2 nach 48stündiger Stimulation beobachtet. Dagegen konnte für den IL-18R α (Interleukin 18-Rezeptor- α), welcher bei niedrigen CsA-Konzentrationen (10ng/ml) tendenziell sogar eine vermehrte Expression an der Zelloberfläche zeigte, keine signifikante Herunterregulation durch CsA auch in höheren Konzentrationen nachgewiesen werden. Für IL-12R β 1 und IL-12R β 2 wurde der Expressionsgrad zusätzlich noch bei Abwesenheit von IL-12, aber in Gegenwart von anti-CD3/-CD28-Triggerung untersucht. Ein Anstieg der Expression durch CsA ließ sich unter diesen Bedingungen für diese Rezeptoren nicht beobachten (ohne Abbildung).

Einfluss von CsA auf die Oberflächenmolekül-Expression

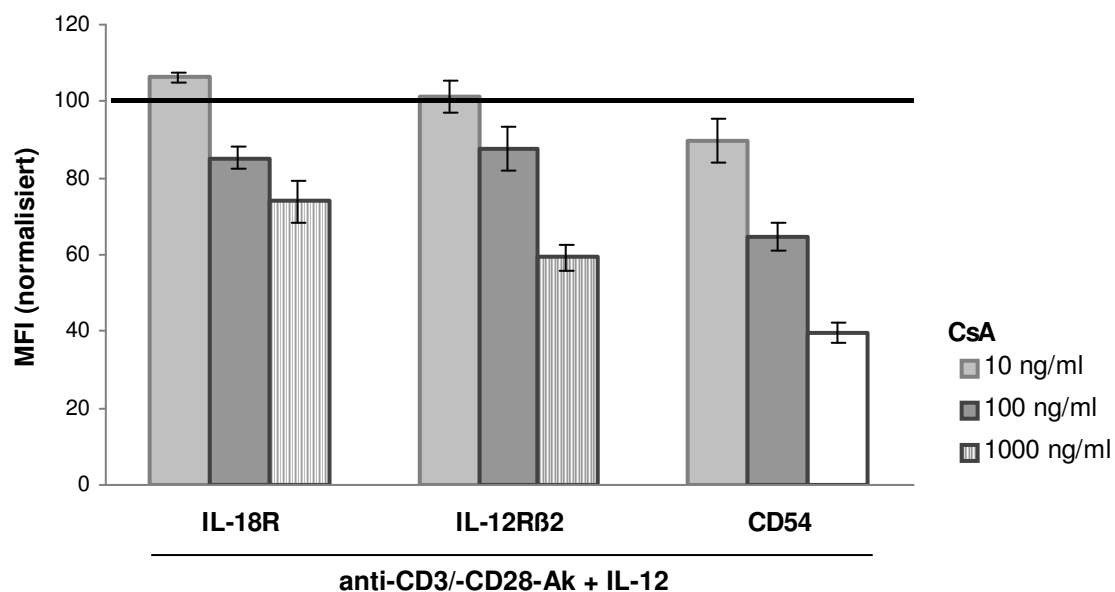


Abbildung 3.22: Keine Hochregulation der Zelloberflächenmolekül-Expression durch CsA in Kombination mit IL-12

1×10^5 PBMC/200 μ l wurden mit folgenden Antikörpern und Zytokinen stimuliert: anti-CD3-Ak 1 μ g/ml, anti-CD28-Ak 0,2 μ g/ml, IL-12 10ng/ml und CsA in den Konzentrationen 100ng/ml, 10ng/ml und 1ng/ml. Nach 48stündiger Stimulation wurde die Expression der Oberflächenmoleküle IL-18R α , IL-12R β und CD54 durchflusszytometrisch analysiert.

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der geometrischen Mittel der mit CsA stimulierten Zellen, normalisiert auf die Werte der Kontrolle anti-CD3/-CD28-Ak plus IL-12, und die SEM (n=6).

4 Diskussion

4.1 *Induktion der IFN- γ -Produktion von Lymphozyten durch Ciclosporin A*

4.1.1 Anstieg der IFN- γ -Produktion durch CsA bei TCR- und Kostimulation in Gegenwart von Interleukin 12

In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass Calcineurinantagonisten wie CsA und Tacrolimus unter geeigneten Bedingungen zu einem deutlichen Anstieg der IFN- γ -Produktion von humanen T-Lymphozyten führen können. Dabei erfordert die CsA-vermittelte IFN- γ -Induktion die Kooperation dreier unterschiedlicher Signalwege: eine TCR-, CD28- und IL-12/STAT4-Signalgebung. So soll diese Studie zum Verständnis beitragen, auf welche Weise die IFN- γ -Produktion humaner T-Zellen durch die Integration verschiedener Signalwege reguliert wird.

Hierzu wurden PBMC und CD4⁺-T-Lymphozyten nach etablierten Protokollen aus humanem Vollblut gewonnen (siehe dazu 2.1.1) und anschließend über TCR und den kostimulierenden Rezeptor CD28 sowie gegebenenfalls mit IL-12 und den Calcineurinantagonisten Ciclosporin A bzw. Tacrolimus stimuliert. Die verwendeten CsA-Konzentrationen (1 bis 100ng/ml) lagen dabei im Bereich therapeutisch wirksamer Talblutspiegel bei Transplantatempfängern (100 bis 200ng/ml). Im Anschluss an die 48stündige Kultur wurde die IFN- γ -Produktion der T-Zellen auf Protein-, aber auch auf mRNA-Ebene (4.1.2) ermittelt.

Es konnte demonstriert werden, dass auch in Gegenwart therapeutischer CsA-Spiegel, NFAT in geringer Konzentration im Nukleus vorhanden ist. Batiuk et al. zeigten, dass der antagonistische Effekt des CsA auf die Calcineurinaktivität rasch reversibel ist⁴⁵ und dass es unwahrscheinlich ist, in vivo eine Inhibition der Phosphatase von mehr als 50% zu erreichen¹⁸⁷. So lässt sich bei immunsupprimierten Patienten mit mittleren CsA-Blutspiegeln von 180ng/ml eine im Vergleich zur Kontrolle um 50% reduzierte Calcineurinaktivität detektieren. Daher werden in der Regel in vitro im Vergleich zu der in vivo-Situation sehr viel höhere Konzentrationen erreicht.

Der Einfluss des CsA auf die IFN- γ -Sekretion von T-Zellen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So konnte in Experimenten von Schandené et al. eine Einschränkung der IFN- γ -Produktion durch CsA gezeigt werden⁴¹. Auch Pacocha et al.⁴⁴ stellten eine

konzentrationsabhängige Inhibition der Genexpression wie auch der Sekretion der Zytokine IL-4, IL-5, IL-13 und IFN- γ durch die Calcineurinantagonisten CsA und FK506 fest. Zahlreiche weitere Studien demonstrierten ebenfalls eine Herunterregulation der IFN- γ -Produktion durch CsA. So beschrieben Batiuk et al.^{45,46} eine CsA-induzierte Inhibition von IFN- γ in OKT3-stimulierten humanen PBMC, ebenso wie Briscoe et al. für mitogenstimulierte T-Zellen in der Gegenwart kostimulatorischer Signale durch endotheliale Zellen⁴⁷. Auch Iacono et al. berichteten von einem CsA-vermittelten Absinken der IFN- γ -Spiegel von Lungentransplantatempfängern mit akuter Abstoßungsreaktion⁴⁸. In Einklang hierzu zeigen die vorliegenden Daten ebenfalls eine signifikante CsA-vermittelte Reduktion der IFN- γ -Produktion von T-Lymphozyten in Absenz von IL-12.

Entgegen diesen Ergebnissen konnten Rafiq et al.³³ sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene eine deutliche Stimulation der Produktion von IFN- γ durch CsA demonstrieren. Dazu erfolgte eine Aktivierung der Lymphozyten mit anti-CD3-Ak als primärem Stimulus, während anti-CD28-Ak oder CD80 bzw. CD86 auf stabil transfezierten P815-Zellen als kostimulatorisches Signal dienten. Der Einsatz von PMA in Kombination mit Ionomycin anstelle von anti-CD3-Ak und eine alternative Kostimulation über CD2 verdeutlichte, dass die Resistenz der IFN- γ -Produktion gegenüber einer Inhibition durch CsA sowohl eine starke CD3- als auch CD28-Triggerung erfordert.

Dumont et al.⁵⁰ untersuchten den Effekt einer Hemmung des Calcineurinsignalweges durch Tacrolimus auf die Zytokinproduktion humaner T-Lymphozyten, die mit anti-CD3-Ak plus PMA bzw. plus anti-CD28-Ak stimuliert wurden. Sie beobachteten eine Suppression der durch anti-CD3-Ak induzierten T-Zell-Proliferation, welche auf eine Inhibition von IL-2 durch FK506 zurückgeführt wurde.

Bei einer Stimulation mit anti-CD3/-CD28-Ak führte FK506 zu einer Reduktion der Produktion der Zytokine IL-3, IL-4, IL-10, TNF- α und IL-6, steigerte aber die von GM-CSF, IL-5, IFN- γ und IL-13. Die IFN- γ -Produktion, gemessen mittels ELISA, wurde auf das fünffache gesteigert. Ein Anstieg der IFN- γ -mRNA-Expression konnte ebenfalls nachgewiesen werden.

Dumont et al. vermuteten, dass der Mek/Erk/Elk-Signalweg für die Induktion der IL-2-Produktion bei der T-Zell-Aktivierung bedeutsam ist. Dieser Signalweg könne zu einer Regulation der c-fos-Expression beitragen⁵¹, der einen Komponente von AP-1, die NFAT zur Bildung von Komplexen höherer Ordnung ergänzt, die fähig sind, an Promotoren, wie den IL-2-Promotor, zu binden und diese zu aktivieren⁵².

Diametral zu den Ergebnissen von Rafiq et al. führte CsA in dieser Studie bei einer Aktivierung lediglich über den TCR und CD28 zu einer signifikanten Reduktion der IFN- γ -Produktion. Dagegen war bei einer zusätzlichen Stimulation mit IL-12 ein starker Anstieg des IFN- γ in Gegenwart von CsA zu beobachten. Dieser fiel für die CsA-Konzentrationen 10ng/ml und 100ng/ml signifikant aus. Eine Induktion der IFN- γ -Produktion durch

Calcineurinantagonisten scheint somit die Gegenwart von IL-12 und die damit verbundene Aktivierung von STAT4 zu erfordern.

Bekanntermaßen besitzt IL-12 einen starken synergetischen Effekt mit der B7/CD28-Interaktion bei der Induktion der Proliferation und Zytokinproduktion humaner T-Lymphozyten, insbesondere von IFN- γ ¹⁶⁴. Dieser Synergie-Effekt wird auf eine Stabilisierung der IFN- γ -mRNA durch IL-12 in Kombination mit einem CD28-Signal zurückgeführt.

NFAT besitzt eine relativ geringe Affinität zur DNA, so dass die Kombination mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie AP-1, erforderlich ist, um Promotoren wie den des IFN- γ zu aktivieren. Für eine vermehrte Bildung des AP-1-Komplexes im Nukleus ist die Kostimulation durch B7 obligat⁵.

Van Rietschoten et al. entdeckten bei einer Untersuchung des IL-12R β 2-Gens¹⁵⁵, ein Silencer-NFAT-Element, welches NFATc2 bindet und an der Unterdrückung der TCR-induzierten IL-12R β 2-Expression beteiligt ist. Die negativ regulatorische Wirkung dieses Elements wurde durch die Beobachtung unterstrichen, dass CsA zu einem Anstieg der IL-12R β 2-mRNA-Expression in stimulierten naiven Th-Zellen führt. Dagegen konnten in dieser Arbeit durchflusszytometrisch keine gesteigerte Oberflächenexpression des Rezeptors nachgewiesen werden. Dies könnte auf eine posttranslationale Regulation hindeuten, die in den beobachteten Unterschieden auf mRNA- und Proteinebene resultieren. Weiterhin differieren beide Studien in Bezug auf Stimulationsschema und Art der kultivierten Zellen. So verwendeten van Rietschoten et al. naive T-Zellen, die in rhIL-2-haltigen Medium kultiviert wurden.

Möglicherweise ist die Induktion der IFN- γ -Produktion durch CsA bei Präsenz eines starken TCR- und kostimulatorischen Signales sowie von IL-12 teilweise auf eine gesteigerte Expression der IL-12R β 2-Kette zurückzuführen, die im Vergleich zur reichlich existenten β 1-Kette sonst relativ niedrig ist und damit den limitierenden Faktor für die IL-12-Sensitivität darstellt. Somit könnte CsA u.a. über eine gesteigerte Sensitivität gegenüber IL-12 und unter Ausnutzung des synergetischen Effektes zwischen IL-12 und der B7/CD28-Interaktion zum beobachteten Anstieg des IFN- γ führen.

Eine Beteiligung verschiedener Transkriptionsfaktoren an der CsA-vermittelten IFN- γ -Induktion soll an späterer Stelle (siehe 4.7) diskutiert werden.

Um die kontroversen Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen zu erklären, müssen die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen berücksichtigt werden, insbesondere die unterschiedlichen Stimulationsprozedere, die Zellmaterialien und Kulturmedien.

Pazderka et al. berichteten, dass die Sensitivität von Zellen gegenüber Calcineurinantagonisten mit der Qualität und Quantität des Aktivierungssignales variieren kann⁴⁹. Eventuell ist die Diskrepanz zwischen den hier beschriebenen Beobachtungen und den

Ergebnissen der genannten Arbeitsgruppen (Schandené, Pacocha, Batiuk, Briscoe, Iacono und Rafiq, Dumont) durch deren Einsatz zu hoher CsA-Konzentrationen (1µg/ml), zu niedriger anti-CD3-Ak-Konzentrationen (100ng/ml) für die Stimulation und/oder durch einen zu geringen Anteil an anti-CD28-Ak bzw. CD80 transfezierter Zellen in den Kulturen zu erklären. In den Studien von Dumont et al.⁵⁰ und Rafiq et al.³³, in denen eine erhöhte IFN-γ-Produktion von T-Zellen in Gegenwart von CsA demonstriert werden konnte, wurde 10% FCS oder BCS verwendet. In diesen Studien wurde keine Abhängigkeit der IFN-γ-Induktion von der Gegenwart IL-12 im Kulturmedium festgestellt. Das Vorhandensein geringer Mengen an IL-12 wurde allerdings nicht ausgeschlossen. Somit könnte IL-12 in den Kulturen gegenwärtig gewesen sein, insbesondere da die verwendeten Medien einen entscheidenden Einfluss auf die endogene IL-12-Produktion haben könnten. So wurde beispielsweise demonstriert, dass DC in FCS-haltigem Medium vergleichsweise sehr viel größere Mengen IL-12 nach Stimulation produzieren als Zellen, die in Medium, welches humanes Serum enthält, kultiviert werden¹⁸⁷. Die Verwendung unterschiedlicher Kulturmedien resultiert des weiteren in einer unterschiedlichen Expression von Oberflächenproteinen sowie einem anderen Zytokinprofil¹⁸⁸. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Serumkomponenten wie Fibronectin die Aktivität von AP-1 induzieren können, welche abhängig von der Inhibition der Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3)-Aktivität ist¹⁸⁹. GSK3 ist bekannt als nukleäre Export-Kinase NFAT's^{102,103,105,189}. Da in dieser Studie 4% humanes Serum zum Einsatz kam, könnte dies u.a., neben den unterschiedlichen Stimulationsprozedere und Zeitpunkten der IFN-γ-Detektion, die beobachteten Unterschiede erklären.

4.1.1.1 Unterschiede in der Induktion der IFN-γ-Produktion von Lymphozyten durch CsA zwischen Normalpersonen und Atopikern

Es erfolgte die Aufteilung des Versuchspersonenkollektivs in die Gruppe der Normalpersonen, ohne Symptome einer Atopie und mit negativem RAST, und die der Atopiker, die unter einer atopischen Dermatitis bzw. einer allergischen Rhinitis litten und eine spezifische Sensibilisierung im RAST aufwiesen. Weiterhin wurde die systemische Einnahme von Kortikosteroiden ausgeschlossen.

Dabei fiel auf, dass die Lymphozyten der Atopiker im Vergleich zu denjenigen der Normalpersonen bei CsA-Konzentrationen von 10 und 100ng/ml mit einem stärkeren Anstieg der IFN-γ-Produktion reagierten.

In allen bisherigen Studien, die sich mit der „CsA-Resistenz“ beschäftigt haben, einschließlich dieser Arbeit, herrscht Übereinstimmung über die Bedeutsamkeit der Kostimulation über CD28. Zwei wichtige Signalwege könnten dabei entscheidend sein, die CD28-Abhängigkeit zu erklären: die Aktivierung von Elk-1 sowie die Inhibition der GSK3¹⁹⁰.

Bei der GSK3 handelt es sich um eine NFAT-Nuklear-Export-Kinase. Signale, die durch den TCR sowie durch Kostimulation übermittelt werden, tragen dazu bei, die Aktivität der GSK3 herunterzuregulieren. Eine Inhibition resultiert in einer Verminderung des nukleären Exports und folglich in einer Akkumulation NFAT's im Zellkern.

Der c-fos-Promotor enthält eine Bindungsstelle, die auch von Elk-1 erkannt wird¹⁹¹. Die Aktivität von Elk-1 wird durch alle drei MAPK-Kaskaden stimuliert, welche durch CD28- wie auch durch TCR-Triggerung aktiviert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die c-fos-Promotor-Aktivität zeitlich mit der phosphorylierten Form von Elk-1 korreliert¹⁹². Calcineurin konnte als eine physiologisch relevante Elk-1-Phosphatase identifiziert werden^{19,20,193}, was bedeutet, dass die Elk-1-Transkriptionsaktivität negativ durch Calcineurin reguliert wird. Folglich kommt es in Gegenwart von Calcineurinantagonisten zu einer weiteren Steigerung der Elk-1-Aktivierung als Resultat der durch CD28-induzierten MAPK-Aktivierung. Die Folge ist eine verstärkte c-fos-Aktivität.

4.1.2 CsA induziert in Kombination mit IL-12 einen verzögerten IFN- γ -mRNA-Anstieg

Die Ergebnisse auf Proteinebene konnten durch IFN- γ -PCR bestätigt werden. So war bei analogem Stimulationsmuster (siehe 4.1.1) nach 24stündigerer Inkubation ein später CsA-vermittelter Anstieg der IFN- γ -mRNA-Expression zu beobachten. Dieser war nach vier Stunden noch nicht nachweisbar. Dabei zeigte sich auch auf mRNA-Ebene eine deutliche IL-12-Abhängigkeit des beobachteten Effektes.

4.1.3 „CsA-Effekt“ ebenfalls durchflusszytometrisch nachweisbar- CsA induziert die IFN- γ -Produktion in mittels Allergenen aktivierten proliferierten Lymphozyten

Mittels durchflusszytometrischer Messungen sollte untersucht werden, ob CsA die IFN- γ -Produktion von Lymphozyten induziert, die anstelle von anti-CD3-Ak mit Allergenen wie Birke und Hausstaubmilbe oder Recall-Antigenen wie Tetanustoxid aktiviert wurden. Untersuchungen dieser Art wurden in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Im Anschluss an eine Markierung der T-Zellen mit CFSE, welches invers mit der Proliferation korreliert, erfolgte die Stimulation mit einem Allergen (bzw. als Kontrolle mit anti-CD3-Ak) plus einem kostimulatorischen Signal und IL-12 $\pm$ CsA. Nach siebentägiger Kultur wurden die Proliferation sowie die IFN- γ -Produktion durchflusszytometrisch ermittelt.

Bei Stimulation mit anti-CD3/-CD28-Ak und IL-12 war eine deutliche Proliferation der Ausgangspopulation zu erkennen. Diese trat ebenfalls, allerdings in geringerem Ausmaße, bei einer Aktivierung mit einem Allergen anstelle anti-CD3-Ak auf. Die Vermehrung der Zellen war nicht durch CsA inhibierbar. Stattdessen führte der Calcineurinantagonist zu einer Induktion der IFN- γ -Produktion, welche hauptsächlich in den proliferierten Lymphozyten nachweisbar war. Dieser Effekt ließ sich mit verschiedenen Allergenen wie Birke und Hausstaubmilbe hervorrufen.

Die hier beobachtete Resistenz der Proliferation gegenüber CsA widerspricht Ergebnissen von Pacocha et al.⁴⁴, die eine Suppression der durch Ragweed (Allergen) und Tetanus induzierten Proliferation von PBMC durch CsA wie auch durch FK506 feststellten. Auch Dumont et al.⁵⁰ beschrieben ähnliche Effekte von Tacrolimus auf eine anti-CD3-Ak induzierte T-Zell-Proliferation.

Dieser Unterschied könnte ähnlich der kontrovers diskutierten IFN- γ -Induktion durch CsA auf die unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen der einzelnen Arbeitsgruppen zurückzuführen sein. So könnte auch hier der synergetische Effekt des IL-12 und der B7/CD28-Interaktion auf die Induktion der Proliferation humaner T-Zellen, neben der der Zytokinproduktion¹⁶⁴, zum Tragen kommen. Demzufolge lag ein starkes proliferatives Signal vor.

4.2 *Einfluss von Inkubationszeit und Konzentration der Antikörper und Zytokine*

4.2.1 Abhängigkeit der IFN- γ -Produktion von der Inkubationszeit

Um den Einfluss der Inkubationszeit auf die IFN- γ -Produktion zu klären, erfolgte eine zeitkinetische Analyse. Hierzu wurden PBMC über einen Zeitraum von 24, 48, 72 und 96 Stunden mit anti-CD3-Ak und anti-CD28-Ak plus IL-12 und gegebenenfalls CsA stimuliert und im Anschluss die IFN- γ -Konzentration mit Hilfe eines ELISA ermittelt.

Dabei war zu erkennen, dass mit der Dauer der Inkubation die IFN- γ -Konzentration in den Überständen sowohl bei den Kontrollen als auch den Kulturen, die CsA ausgesetzt waren, stetig zunahm. Der Unterschied zwischen dem 24- und dem 48-Stundenwert der Kultur „plus CsA“ fiel signifikant aus.

In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass, auch wenn bereits nach 24 Stunden ein geringer Anstieg der IFN- γ -Produktion zu beobachten war, der CsA-Effekt bis zur vollständigen Ausprägung 48 Stunden benötigte. Anschließend erfolgte keine signifikante Steigerung mehr, weshalb für die weiteren Experimente jeweils eine Inkubationszeit von 48 Stunden gewählt wurde.

Das verzögerte Auftreten des IFN- γ -Anstiegs soll an späterer Stelle (4.7.2) näher erläutert werden.

4.2.2 Einfluss der Konzentrationen von Interleukin 12 und anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern

Zur Bestimmung der Schwellenwerte für die Konzentrationen der Stimuli anti-CD3/-CD28-Ak und IL-12 wurden Titrationsreihen erstellt. Nach 48stündiger Kultur erfolgte die Analyse der Überstände mittels IFN- γ -ELISA.

Für anti-CD3-Ak ergab sich ein Schwellenwert von 100ng/ml, für anti-CD28-Ak betrug dieser 200ng/ml, während sich für IL-12 ein Wert von 1ng/ml mittels Verdünnungsreihe ermitteln ließ.

Entsprechende Analysen sind bisher nur für anti-CD3-Ak von Rafiq et al. erfolgt. Deren Ergebnisse fielen in diesem Fall mit einer Schwellenkonzentration von 1 μ g/ml ähnlich aus. Für die Stimuli anti-CD28-Ak und IL-12 sind dies die ersten Untersuchungen dieser Art.

Dabei ist erwähnenswert, dass die Stärke des TCR-Signales für eine Immunantwort von entscheidender Bedeutung ist. So führt ein schwaches TCR-Signal zu einer Th2-Antwort, während ein starkes Signal eine Th1-Antwort provoziert. Wird ein Antigen zwar erkannt, aber ohne dass eine Kostimulation erfolgt, werden naive T-Zellen inaktiviert und verfallen in den Zustand der Anergie. Dies trägt zur Toleranz der T-Zellen gegenüber körpereigenen Gewebeantigenen bei¹³.

4.3 *Einfluss weiterer Zytokine auf die Induktion der IFN- γ Produktion durch Ciclosporin A*

4.3.1 Keine Induktion der IFN- γ -Produktion durch die Zytokine IL-2, IL-4, IL-18 und IL-23

Nachdem zuvor gezeigt werden konnte, dass CsA in Kombination mit TCR- und Kostimulation plus IL-12 die IFN- γ -Produktion von Lymphozyten induziert, sollte nun der Einfluss der Zytokine IL-2, IL-4, IL-18 und IL-23 anstelle von IL-12 analysiert werden. Wiederum wurde die IFN- γ -Konzentration im Überstand nach 48stündiger Kultur mittels ELISA gemessen. Dabei wurde postuliert, dass die T-Zellen der gleichen Versuchspersonen nach einer Stimulation mit anti-CD3/-CD28-Ak plus IL-12 plus CsA einen Anstieg des IFN- γ zeigten.

IL-2 ist für die T-Zell-Aktivierung und -Proliferation ausgesprochen wichtig. Neben IL-12 übt IL-2 einen starken Einfluss auf die IFN- γ -Expression aus, indem es entweder separat oder synergetisch mit IL-12 die Induktion großer IFN- γ -Mengen bewirkt¹³⁴. Die Transkription des IL-2-Gens wird von NFAT in Kooperation mit AP-1-Transkriptionsfaktoren reguliert⁵². Dementsprechend wird die IL-2-Produktion auch durch PD98059, welches zu einer Unterbrechung des Mek/Erk-Signalweges führt, und Tacrolimus inhibiert⁵⁰. Die ebenfalls durch beide Pharmaka hervorgerufene Suppression der durch anti-CD3-Ak induzierten T-Zell-Proliferation ist durch exogen zugeführtes IL-2 reversibel⁵⁰. Ob rhIL-2 einen entsprechenden Effekt auf die IFN- γ -Produktion besitzt, wurde bisher noch nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit führte IL-2 allerdings nicht zu einer Aufhebung bzw. Umkehrung der durch CsA hervorgerufenen Suppression der IFN- γ -Produktion bei TCR- und Kostimulation. Bereits die Werte der Kontrolle „anti-CD3/-CD28-Ak plus IL-2“ überstiegen nur geringfügig die der Kultur, die nur mit anti-CD3/-CD28-Ak stimuliert wurde. Es konnte demzufolge kein dem IL-12 vergleichbarer Einfluss des IL-2 auf die IFN- γ -Produktion der T-Zellen nachgewiesen werden.

Die Expression des Th2-Zytokins IL-4 wird ebenfalls durch NFAT reguliert⁵². So konnten verschiedene Arbeitsgruppen eine Reduktion der IL-4-Produktion bei Antigenstimulation durch die Calcineurinantagonisten CsA^{33,44} und Tacrolimus^{50,44} nachweisen. Es ist gezeigt worden, dass IL-4 und IL-10^{37,38} einen regulatorischen Effekt auf die IFN- γ -Produktion ausüben können. So konnten Rafiq et al.³³, in Übereinstimmung mit Daten von Tanaka et al.³⁹, eine durch rhIL-4 hervorgerufene geringfügige Reduktion der IFN- γ -Produktion

demonstrieren. In Kombination mit IL-10 zeigte sich sogar eine komplette Umkehr der CsA-vermittelten IFN- γ -Induktion.

Im Konsens mit der Literatur führte in dieser Arbeit IL-4 ebenfalls zu einer Suppression der IFN- γ -Produktion, induziert durch anti-CD3/-CD28-Ak. Durch Zusatz von CsA (100ng/ml) verstärkte sich diese noch, so dass ein signifikanter Abfall nachzuweisen war. Eine IFN- γ -Induktion in Gegenwart von CsA und IL-4 trat dagegen nicht auf, weshalb sich ein negativ regulatorischer Effekt des IL-4 unter diesen Bedingungen nicht aufzeigen ließ. Dieser soll aber an späterer Stelle neben dem des IL-10 noch näher betrachtet werden.

IL-18 wird auch als „*IFN- γ inducing factor*“ (IGIF) bezeichnet, da es u.a. die IFN- γ -Produktion und Proliferation von T-Zellen steigert. Auch wenn IL-18 die Th1-Entwicklung selbst nicht induzieren kann, unterstützt es wesentlich die effektive Aktivierung von Th1-Zellen in Gegenwart von IL-12. Unterstrichen wird dies durch Arbeiten, in denen demonstriert werden konnte, dass IL-12 und IL-18 einen synergetischen Effekt auf die IFN- γ -Produktion von T-Zellen ausüben^{172,173}. Die Synergie bezüglich der IFN- γ -Produktion wird im Folgenden noch näher erläutert. An dieser Stelle wird der Einfluss von IL-18 allein in Gegenwart von anti-CD3/-CD28-Ak auf die IFN- γ -Produktion von T-Zellen betrachtet. In den durchgeführten Versuchen steigerte rhIL-18 die IFN- γ -Produktion von anti-CD3/-CD28-Ak-stimulierten Lymphozyten deutlicher als IL-12¹⁷¹, was möglicherweise auf eine direkte Aktivierung von AP-1 und dessen folgender Bindung an den IFN- γ -Promotor zurückzuführen ist¹⁴¹. Gleiches bewirkt auch eine Stimulation mit IL-12 plus anti-CD3/-CD28-Ak¹⁴¹.

Dementsprechend führte IL-18 bei TCR- und Kostimulation in Abwesenheit von CsA zu einer Induktion der IFN- γ -Produktion im Vergleich zur Kontrolle „anti-CD3/-CD28-Ak“. Diese fiel aber geringer aus als bei einer Stimulation der T-Lymphozyten über TCR und CD28 plus IL-12. Wie bei den Versuchen mit IL-2 und IL-4 war eine signifikante Suppression der IFN- γ -Sekretion durch CsA (100ng/ml) zu beobachten, die bei geringeren CsA-Konzentrationen rückläufig war. Bei einer Stimulation mit CsA in einer Konzentration von 1ng/ml plus anti-CD3/-CD28-Ak und IL-18 war eine geringfügige Steigerung derselbigen im Vergleich zur Kontrolle anti-CD3/-CD28-Ak plus IL-18 feststellbar.

Somit konnte in unseren Experimenten zwar eine Steigerung der IFN- γ -Sekretion durch IL-18 bei Präsenz von CsA in einer Konzentration von 1ng/ml demonstriert werden, die Beobachtung von Okamura et al.¹⁷¹, wonach rhIL-18 die IFN- γ -Produktion stärker erhöht als IL-12, ließ sich nicht bestätigen. Eine signifikante Induktion des Th1-Zytokins bei Zusatz von CsA blieb unter diesen Bedingungen ebenfalls aus.

Ähnlich IL-12 besteht auch IL-23 aus zwei Ketten, von denen die schwere p40-Kette mit der des IL-12 identisch ist. Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft werden ähnliche

Eigenschaften der beiden Zytokine postuliert¹⁷⁷.

Doch auch für IL-23 konnte keine Induktion der IFN- γ -Produktion durch CsA demonstriert werden. Stattdessen sank das IFN- γ wie in den Versuchen mit IL-2 und IL-4 in Gegenwart von CsA, insbesondere bei höheren Konzentrationen wie 100ng/ml, stark ab.

Um die Eventualität einer zu geringen Menge an eingesetztem IL-23 auszuschließen, wurde wie für IL-12 eine Austitration vorgenommen. Doch auch eine Erhöhung der IL-23-Konzentration auf 500ng/ml führte zu keinem signifikanten Anstieg der IFN- γ -Produktion in Gegenwart von CsA, sondern zeigte in der normalisierten Darstellung eine signifikante Reduktion des IFN- γ bei IL-23-Konzentrationen von 1ng/ml bzw. 10ng/ml.

Daher konnte trotz struktureller Gemeinsamkeiten mit IL-12 kein adäquater Einfluss des IL-23 auf die IFN- γ -Produktion in Gegenwart von CsA nachgewiesen werden.

Zusammenfassend führte keines der anstelle von IL-12 eingesetzten Zytokine zu einer Induktion der IFN- γ -Produktion bei Präsenz von CsA. Wie bei der Stimulation über TCR und CD28, führte CsA (100ng/ml) bei einer zusätzlichen Stimulation mit den verschiedenen Zytokinen zu einer signifikanten Reduktion des Th1-Zytokins. Bei niedrigeren CsA-Konzentrationen war diese rückläufig und die IFN- γ -Sekretion erreichte wieder das Niveau der Kontrolle. Lediglich für IL-18 ließ sich bei niedrigen CsA-Konzentrationen ein geringer Anstieg beobachten, doch ein Effekt wie der des IL-12 blieb in jedem Fall aus.

4.4 *Alternativen zur TCR- und Kostimulation und ihre Auswirkungen auf die IFN- γ -Produktion*

4.4.1 Keine Induktion der IFN- γ -Produktion durch Kombination von IL-12 und IL-18

Wie bereits erwähnt, induziert IL-18 ähnlich IL-12 die IFN- γ -Produktion und Proliferation von T-Zellen und unterstützt IL-12 bei der Induktion der Th1-Entwicklung. Robinson et al. sowie Kohno et al. berichteten, dass die Interleukine 12 und 18 synergetisch auf die IFN- γ -Produktion von T-Lymphozyten wirken^{172,173}. Als Ursache wurde eine Induktion des IGIF („IFN- γ -inducing factor“-)Rezeptors (IL-18-R), durch IL-12 und die demzufolge erhöhte Sensibilität der T-Zellen gegenüber IL-18 beschrieben¹⁷⁴. Andere Theorien erklären die Synergie durch Aktivierung zweier Signalwege, eine IL-18-induzierte NF κ B-Aktivierung und eine TCR/CD3-vermittelte Aktivierung von NFAT¹⁷⁵.

Yang et al.¹⁷⁶ berichteten von einer TCR-unabhängigen IFN- γ -Induktion im murinen System lediglich durch das Zusammenwirken von IL-12 und IL-18. Die IFN- γ -Produktion war im Gegensatz zur TCR-induzierten Produktion nicht durch CsA inhibierbar. Sie unterschieden in den CD4⁺-T-Zellen von Mäusen zwischen einem CsA-sensitiven und einem CsA-unsensitiven Signalweg zur IFN- γ -Induktion, von denen letzterer durch eine Kooperation der Zytokine IL-12 und IL-18 unter Beteiligung der Transkriptionsfaktoren ERM und NF- κ B induziert wird.

Um zu untersuchen, ob die Kombination der beiden Zytokine einen adäquaten Ersatz für die TCR- und Kostimulation darstellt, erfolgte eine Inkubation von Lymphozyten nur mit IL-12 und IL-18 jeweils mit und ohne CsA. Gegebenenfalls wurde zusätzlich mit anti-CD3-Ak stimuliert.

Die gewonnenen Ergebnisse zeigten allerdings, dass eine Kombination von IL-12 und IL-18 die Produktion des IFN- γ deutlich geringer induzierte als die Positivkontrolle „anti-CD3/-CD28-Ak plus IL-12“. In Gegenwart von CsA war unter diesen Bedingungen eine weitere Reduktion des IFN- γ zu beobachten. Auch ein zusätzliches TCR-Signal ermöglichte keinen Anstieg der IFN- γ -Produktion in Gegenwart von CsA.

Die Beobachtung von Yang et al.¹⁷⁶ von einer CsA-resistenten IFN- γ -Produktion im Mausmodell bei einer Stimulation mit IL-12 und IL-18 ließ sich für humane Zellen folglich nicht nachweisen. Zusätzlich verdeutlicht dieses Ergebnis die Bedeutung der Kostimulation über CD28 und der Aktivierung von AP-1-Transkriptionsfaktoren. Die Bedeutung ERM's für die IFN- γ -Induktion durch CsA soll an späterer Stelle (4.7.1) näher beleuchtet werden.

4.5 *Keine Aufhebung des „CsA-Effektes“ durch die Th2-Zytokine IL-4 und IL-10*

Wie in der Einleitung näher beschrieben (vergleiche Abschnitt 1.5.2) vertreten Rafiq et al.³³ die Theorie, dass der CsA-induzierte Anstieg der IFN- γ -Produktion auf die ebenfalls CsA-vermittelte Aufhebung der autokrinen Suppression durch IL-4 und IL-10 zurückzuführen ist. So konnten sie eine Unterdrückung der Produktion von IL-10 und in geringerem Maße von IL-4 bei Inkubation mit CsA feststellen, da das IL-4-Gen, wie bereits erwähnt (siehe 4.2.1), zu den NFAT-regulierten Genen gehört³⁴ und die Produktion von IL-10 sowohl über einen calciumabhängigen Signalweg³⁵ als auch calciumunabhängig über PKC³⁶ reguliert wird. Im Konsens mit früheren Berichten³⁷⁻³⁹ demonstrierten Rafiq et al., dass rhIL-4 und rhIL-10 die Produktion von IFN- γ , die durch CsA induziert wurde, vollständig aufheben. Rafiq et al.

zeigten, dass eine Blockade der IL-4- und IL-10-Rezeptoren zu einer gesteigerten Produktion des Th1-Zytokins führt.

Vor diesem Hintergrund wurde Kulturen, die zuvor mit anti-CD3-Ak und anti-CD28-Ak plus IL-12 $\pm$ CsA stimuliert worden waren, IL-4 respektive IL-10 in unterschiedlichen Konzentrationen zugefügt. Als Kontrolle diente eine Kultur ohne IL-4-Zusatz. Nach 48stündiger Inkubation erfolgte die Messung der IFN- γ -Konzentration im Überstand mittels ELISA.

Entgegen den Beobachtungen von Rafiq et al. führten IL-4 und IL-10 sowohl in den Kulturen ohne als auch mit CsA statt zu einer Inhibition des CsA-Effektes zu einem zusätzlichen Anstieg des IFN- γ . Besonders ausgeprägt war der positive Einfluss des IL-4.

Da eine umfassende Austitration für beide Zytokine erfolgte, ließ sich der Einsatz zu geringer Konzentrationen als Fehlerquelle ausschließen.

Eine gegenregulatorische Wirkung von IL-4 und IL-10 auf die CsA-induzierte IFN- γ -Produktion bei Präsenz von IL-12 ließ sich durch die erhobenen Ergebnisse nicht bestätigen. Hauptproduzenten von IL-10 sind Monozyten und DC. Es konnte jedoch sowohl für reine CD4⁺-T-Zellen als auch für PBMC eine erhöhte IFN- γ -Produktion nachgewiesen werden. Folglich ließ sich in dieser Arbeit die Vermutung, dem Anstieg des IFN- γ unter CsA liege die Aufhebung der endogenen Suppression durch IL-4 und IL-10 zugrunde, für den vorliegenden Versuchsaufbau nicht bestätigen. Ein relativer Mangel dieser Zytokine könnte möglicherweise den Effekt der IFN- γ -Induktion in vivo verstärken, ihr Fehlen scheint aber nicht für die Induktion des IFN- γ verantwortlich zu sein.

4.6 *Einfluss des Calcineurinantagonisten Tacrolimus (FK506) auf die IFN- γ -Produktion von Lymphozyten*

Bisher wurde nur die Wirkung des Calcineurinantagonisten CsA auf die IFN- γ -Produktion von Lymphozyten betrachtet. Um abzuklären, ob es sich bei der IFN- γ -Induktion um ein rein CsA-spezifisches Phänomen handelt oder auch durch andere Calcineurinantagonisten hervorgerufen werden kann, wurde der Einfluss Tacrolimus (FK506) auf die Produktion des Th1-Zytokins untersucht. Dies erfolgte unter denselben Bedingungen wie in Abschnitt 4.1.1. Die Kulturen wurden mit anti-CD3/-CD28-Ak und IL-12 plus Tacrolimus in Konzentrationen von 0,01ng/ml bis 1000ng/ml für 48 Stunden stimuliert und die IFN- γ -Konzentration anschließend im Überstand mit Hilfe eines ELISA ermittelt.

Dabei ließ sich wie für CsA auch für Tacrolimus eine Induktion der IFN- γ -Produktion von PBMC's nachweisen. Auch dieser Effekt war IL-12-abhängig, was signifikante Unterschiede zwischen den Kulturen ohne respektive mit IL-12 verdeutlichen. Das Maximum des IFN- γ -Anstiegs lag bei einer FK506-Konzentration von 1ng/ml, wobei der CsA-induzierte IFN- γ -Anstieg sogar übertroffen wurde.

Dumont et al.⁵⁰ untersuchten die Konsequenzen einer Unterbrechung des Calcineurinsignalweges durch FK506 für die Zytokinproduktion humaner T-Lymphozyten, die u.a. mit anti-CD3/-CD28-Ak für eine Dauer von 24 Stunden stimuliert worden waren. Dabei ergab sich neben einer Suppression der Zellproliferation eine reduzierte Produktion der Zytokine IL-3, IL-4, IL-10, TNF- α und IL-6, im Gegensatz zu einer Steigerung von GM-CSF, IL-5, IFN- γ und IL-13. Der IFN- γ -Anstieg auf Proteinebene konnte durch eine gesteigerte IFN- γ -mRNA-Expression untermauert werden.

Bei der Reproduzierung dieses Versuchs, zu deren Zwecke eine Stimulation der PBMC nur mit anti-CD3-Ak (0,4 μ g/ml) und anti-CD28-Ak (0,4 μ g/ml bzw. 0,1 μ g/ml) erfolgte, konnte in dieser Studie keine Induktion der IFN- γ -Produktion nachgewiesen werden. Wie bereits für CsA demonstriert wurde, scheint auch die IFN- γ -Induktion durch Tacrolimus ein IL-12-abhängiger Effekt zu sein.

Die erhobenen Ergebnisse bestätigen den gemeinsamen Wirkungsmechanismus der beiden Calcineurinantagonisten (siehe 1.1.1) sowie die stärkere Wirkung Tacrolimus⁵. Zahlreiche vergleichende Studien weisen auf den analogen Einfluss von CsA und Tacrolimus auf die Zytokinproduktion verschiedener Zellen hin⁴⁴. Dies kann für deren IFN- γ -Produktion hier bestätigt werden. Zudem scheint der Effekt der IFN- γ -Induktion durch Calcineurinantagonisten in beiden Fällen die Präsenz von IL-12 zu erfordern.

4.7 T-bet und AP-1: zwei relevante Transkriptionsfaktoren am IFN- γ Gen

Da Calcineurinantagonisten zu einer Inhibition der Aktivierung NFAT's führen, wird die IFN- γ -Induktion durch CsA und FK506 möglicherweise über T-bet- oder AP-1-Transkriptionsfaktoren vermittelt, die neben NFAT wesentlich an der Regulation der Transkription des IFN- γ -Gens beteiligt sind. Sequenzanalysen des IFN- γ -Gens von Lee et al.⁸⁴ identifizierten innerhalb einer CNS zahlreiche Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren T-bet, NFAT und AP-1.

Auch NF κ B, dessen Aktivierung calciumunabhängig über CD28 erfolgt, fungiert als

Transkriptionsfaktor am IFN- γ -Gen⁸⁹. Sica et al. identifizierten eine neue c-Rel-Bindungsstelle (C3), welche innerhalb einer „*IFN- γ intronic-enhancer-region*“ lokalisiert ist und eine Sequenzhomologie sowohl mit NFAT- als auch NF κ B-Bindungsstellen aufzeigt⁹⁴. Sie konnten außerdem, eine Bindung sowohl von NF κ B p50/p65 als auch von NFAT-Proteinen⁹⁶ an eine neu identifizierte C3-verwandte Stelle nachweisen⁹⁵. Somit können NF κ B und NFAT, obwohl sie aus unterschiedlichen, voneinander unabhängigen Signalwegen hervorgehen, ihre Transkriptionsaktivität durch gemeinsame Enhancer-Elemente ausüben und sind beide an der Transkription des IFN- γ -Gens beteiligt.

Ebenso soll ERM, als IL-12-induzierter Th1-spezifischer Transkriptionsfaktor, für die hohe IFN- γ -Produktion in Th1-Zellen verantwortlich sein. Wie andere Ets-Faktoren¹⁶⁵ ist auch ERM auf die Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren wie c-Jun¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ und STAT4 bzw. STAT4-induzierten Faktoren¹⁶³ angewiesen, um seine regulatorische Aktivität am IFN- γ -Gen auszuüben.

4.7.1 Verminderte T-bet-mRNA-Expression und -DNA-Bindungsaktivität unter CsA- ebenfalls verminderte ERM-mRNA-Expression

Der T-Box-Transkriptionsfaktor T-bet ist für die Entwicklung einer Th1-Immunantwort und IFN- γ -Produktion ausgesprochen wichtig⁸⁵. Gleichzeitig ist T-bet direkt an der Regulation der Transkription des IL-12R β 2-Gens¹⁵⁴ und demzufolge an der Sensibilität der Zelle gegenüber IL-12 beteiligt, während zugleich die Expression T-bet's durch IL-12 hochreguliert wird.

Um eine Beteiligung T-bet's an dem CsA-induzierten IFN- γ -Anstieg nachzuweisen, wurde die T-bet-mRNA-Expression und T-bet-DNA-Bindungsaktivität in Gegenwart von CsA bestimmt.

Der Ansatz der T-bet-PCR glich dem der IFN- γ -PCR (vergleiche 4.1.2). CD4⁺-T-Zellen wurden für vier respektive 24 Stunden mit anti-CD3/-CD28-Ak $\pm$ IL-12 $\pm$ CsA stimuliert. Für den EMSA erfolgte ebenfalls eine 24stündige Kultur CD4⁺-T-Lymphozyten, die zuvor mit anti-CD3/-CD28-Ak plus IL-12 $\pm$ CsA aktiviert worden waren.

Aufgrund einer klaren Reduktion der T-bet-mRNA-Expression und -DNA-Bindungsaktivität durch CsA, konnte eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors T-bet's an der CsA-vermittelten IFN- γ -Induktion zumindest für die gemessenen Zeitpunkte (vier und 24 Stunden) durch die erfolgten PCR- und EMSA-Experimente nicht nachgewiesen werden. Auch wenn CsA nicht zu einem Anstieg der T-bet-DNA-Bindungsaktivität führt, schließt dies eine

Beteiligung T-bet's an der IFN- γ -Induktion nicht aus. Die IL-12-getriggerte Aktivierung T-bet's könnte eine entscheidende Rolle bei der Öffnung des IFN- γ -Locus spielen¹⁹⁹⁻²⁰¹ und somit den Zugang weiterer Transkriptionsfaktoren zu Promotor- bzw. Enhancerregionen in den durchgeführten Experimenten ermöglicht haben.

Ein weiterer IL-12-induzierter Transkriptionsfaktor, der an der IFN- γ -Produktion differenzierter Th1-Zellen beteiligt scheint, konnte im Mausmodell mittels „*subtractive cloning*“ als ERM identifiziert werden¹⁶³. Da ERM in Abwesenheit anderer Transkriptionsfaktoren wie STAT4 die IFN- γ -Expression nur gering erhöht, vermutete man, dass ERM zur Regulation der IFN- γ -Produktion auf eine Kooperation mit anderen Th1-spezifischen Transkriptionsfaktoren angewiesen ist¹⁶³⁻¹⁶⁹.

Yang et al. unterschieden in murinen CD4⁺-T-Zellen zwischen einem CsA-sensitiven und einem CsA-unsensitiven Signalweg zur IFN- γ -Induktion, von denen letzterer TCR-unabhängig durch eine Kooperation der Zytokine IL-12 und IL-18 unter Beteiligung der Transkriptionsfaktoren ERM und NF- κ B induziert wird¹⁷⁶.

Unter den hier beschriebenen Versuchsbedingungen konnte mittels PCR kein Anstieg der mRNA-Expression von ERM in humanen Zellen beobachtet werden.

Es wurde beschrieben, dass ERM von entscheidender Bedeutung für die Expression und Hochregulation von ICAM-1 („*intercellular adhesion molecule-1*“) ist¹⁹⁵. So unterstützt die beobachtete Verminderung der Oberflächenexpression von ICAM-1 die Annahme, dass ERM in unseren Experimenten keine bedeutende Rolle bei der Induktion von humanem IFN- γ einnimmt.

4.7.2 Später CsA-vermittelter Anstieg der c-fos-Bindungsaktivität und –mRNA-Expression

Eine Antigenaktivierung von T-Zellen über den TCR führt u.a. über eine Aktivierung von Mek und Erk zu einer Steigerung der Synthese des Transkriptionsfaktors c-fos, während eine Signalgebung durch den kostimulierenden Rezeptor CD28 über eine Aktivierung von Mekk, Jnk und Jnk schließlich zu einer Phosphorylierung und Aktivierung Jun's führt. Heterodimere aus Fos und Jun bilden den Transkriptionsfaktor AP-1¹³. AP-1 interagiert mit den zahlreichen „*cis-acting*“-Regulatorelementen innerhalb des IFN- γ -Promotors, welche die gewebespezifische Expression von IFN- γ fördern können¹⁶⁶. Zusätzlich bindet AP-1, wie von Lee et al. beschrieben wurde, an Enhancer-Elemente, durch die es zu einer weiteren Steigerung der IFN- γ -Expression kommt⁸⁴. Eine Aktivierung von T-Zellen mit anti-CD3/-CD28-Ak führt über eine Besetzung dieser AP-1-Bindungsstellen innerhalb des IFN- γ -

Promotors zu einer hohen Promotoraktivität und folglich zu einer starken IFN- γ -Produktion¹⁴¹. Dabei existiert eine kooperative Interaktion mit NFAT⁶⁰. Auch Dumont et al.⁵⁰ vermuteten eine Beteiligung des Mek/Erk-Signalweges an der Induktion der Zytokinproduktion im Rahmen der T-Zell-Aktivierung, indem dieser Signalweg zu einer Regulation der c-fos-Expression beiträgt⁵¹. Bei c-fos handelt es sich um die eine Komponente von AP-1, die NFAT komplettiert, um Komplexe höherer Ordnung zu bilden. Diese Komplexe sind fähig, an Promotoren der Zytokine zu binden, die für die T-Zell-Aktivierung nötig sind. Es ist bekannt, dass eine balancierte Aktivierung von NFAT und AP-1 für eine produktive Immunantwort erforderlich ist⁶⁸.

Um eine Beteiligung c-fos' an der IFN- γ -Induktion durch CsA nachzuweisen, wurde die c-fos-mRNA-Expression und -DNA-Bindungsaktivität unter CsA bestimmt.

Daher erfolgte analog zu den T-bet-Experimenten (4.7.2) die Stimulation CD4⁺-T-Lymphozyten über den TCR und CD28 plus IL-12 sowie gegebenenfalls mit CsA. Die Inkubationszeiten betrugen, obwohl es sich bei c-fos eigentlich um einen bei Aktivierung früh exprimierten Transkriptionsfaktor („*immediate early gene*“) handelt, für die PCR vier Stunden sowie 30 Minuten bzw. 24 Stunden in den EMSA-Experimenten. Die „langen“ Inkubationszeiten ergaben sich vor dem Hintergrund des späten IFN- γ -Anstieges.

Nach vierstündiger Kultur war ausnahmslos ein CsA-induzierter Anstieg der c-fos-mRNA-Expression in der PCR zu beobachten. Dieses Ergebnis konnte durch EMSA-Experimente bestätigt werden, in denen nach 24 Stunden, nicht aber wie erwartet nach 30 Minuten, eine erhöhte c-fos-Bindungsaktivität unter CsA feststellbar war.

Mittels PCR- und EMSA-Versuchen konnte somit ein ungewöhnlich später CsA-vermittelter Anstieg der c-fos-mRNA-Expression und der -DNA-Bindungsaffinität demonstriert werden. Nach Ausschluss einer differentiellen T-bet-Expression könnte die MAP-Kinase-Kaskade mit Beteiligung von Mek/Erk sowie der Desinhibition von Elk-1 den entscheidenden Signalweg nach Inhibition von Calcineurin darstellen. Somit wären c-fos und Elk-1 die relevanten Transkriptionsfaktoren, die den Effekt des CsA auf die IFN- γ -Produktion vermitteln. Der c-fos-Promotor enthält eine Bindungsstelle, die auch von Elk-1 erkannt wird¹⁹¹. Die Aktivität von Elk-1 wird durch alle drei MAPK-Kaskaden stimuliert, welche durch CD28- wie auch durch TCR-Triggerung aktiviert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die c-fos-Promotor-Aktivität zeitlich mit der phosphorylierten Form von Elk-1 korreliert¹⁹². Calcineurin wurde als eine physiologisch relevante Elk-1-Phosphatase identifiziert^{19,20,193}, was bedeutet, dass die Elk-1-Transkriptionsaktivität negativ durch Calcineurin reguliert wird.

Folglich kommt es in Gegenwart von Calcineurinantagonisten zu einer weiteren Steigerung der Elk-1-Aktivierung als Resultat der durch CD28-induzierten MAPK-Aktivierung. Die

Folge ist eine verstärkte c-fos-Aktivität. Die gewonnenen Daten unterstützen die Bedeutsamkeit der Elk-1-c-fos-Aktivität in Signalwegen, welche durch Calcineurininhibition sowie über CD28 aktiviert werden. So konnte neben einer erhöhten c-fos-mRNA-Expression auch eine gesteigerte AP-1-Bindungsaktivität demonstriert werden. Dieser Nachweis einer erhöhten AP-1-Bindungsaktivität unter dem Einfluss von CsA stimmt mit den Daten von Boulougouris überein¹⁹⁴.

Basierend auf den oben genannten Beobachtungen und Daten dieser Studie werden folgende Hypothesen aufgestellt: Bei der Transkription des IFN- γ -Gens scheint Fos eine entscheidende Rolle im NFAT:AP-1(Fos/Jun)-DNA-Komplex einzunehmen, wenn dieser Locus zuvor über IL-12 und T-bet geöffnet und gegenregulatorische Th2-Signalwege, wie die Aktivierung von GATA-3, blockiert wurden. Relativ geringe Mengen an NFAT reichen in der Gegenwart eines AP-1-Überschusses aus, um zu einer vermehrten Anhäufung der IFN- γ -mRNA, welche u.a. auch auf einer erhöhten Stabilität der mRNA basiert^{198,199}, und somit zu einer Steigerung der Proteinsekretion zu führen. In dieser Situation ergibt sich die AP-1-Aktivität aus einer Aktivierung des CsA-unsensitiven CD28-Signalweges sowie der Desinhibition von Elk-1 infolge der reduzierten Calcineurinaktivität. Eine Bindung an CD28 führt zudem zu einer Inhibition der GSK3¹⁹⁰, resultierend in einem verminderten nukleären Export und einer konsequenten Akkumulation NFAT's im Zellkern. Da das Remodeling des IFN- γ -Locus, die Anhäufung NFAT's im Kern infolge des verminderten Exports aus dem Nukleus und die erhöhte Stabilität der IFN- γ -mRNA einige Zeit zum Etablieren benötigen, könnte dies die Zeitverzögerung erklären, mit der der Anstieg der IFN- γ -Produktion eintritt.

4.8 *Schlussfolgerungen und klinischer Ausblick*

Ziel dieser Arbeit war es, durch Untersuchungen auf Proteinebene mittels ELISA und Durchflusszytometrie sowie auf mRNA-Ebene den Einfluss Ciclosporins auf die IFN- γ -Produktion humaner antigenaktivierter Lymphozyten aufzuzeigen. Durch neue Informationen über die Bedeutung der Antigenaktivierung über den TCR und den kostimulatorischen Rezeptor CD28 und die Gegenwart verschiedener Zytokine wie IL-12 oder IL-4 und IL-10 für die IFN- γ -Induktion durch CsA, sowie durch die Untersuchung beteiligter Transkriptionsfaktoren sollten sich mögliche Hinweise auf den Wirkungsmechanismus der Calcineurinantagonisten bei inflammatorischen Hauterkrankungen wie der atopischen Dermatitis und Psoriasis ergeben.

Diese Arbeit demonstriert, dass therapeutische Konzentrationen an Calcineurinantagonisten wie CsA oder Tacrolimus (FK506) die IFN- γ -Produktion aktivierter humaner Lymphozyten induzieren können. Für diese IFN- γ -Induktion durch CsA ist die Kooperation dreier

unterschiedlicher Signalwege erforderlich: eine Aktivierung über den TCR und CD28-Kostimulation sowie die Gegenwart von IL-12. Aber auch eine Stimulation mit Allergenen in Kombination mit IL-12 führte zu ähnlichen Resultaten, während bei einer Aktivierung mit den Zytokinen IL-2, IL-18, IL-4 oder IL-23 anstelle von IL-12 ein Anstieg der IFN- γ -Produktion ausblieb. Diese entscheidende Bedeutung von IL-12 für die Induktion des IFN- γ in Gegenwart von CsA wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. So berichteten Rafiq et al.³³ und Dumont et al.⁵⁰ von einem CsA-induzierten IFN- γ -Anstieg bei lediglich ausreichend starkem TCR- und kostimulatorischen Signal. Des weiteren ließ sich die Theorie von Rafiq et al., die IFN- γ -Induktion sei auf eine CsA-vermittelte Aufhebung der endogenen Suppression durch IL-4 und IL-10 zurückzuführen, in dieser Arbeit nicht bestätigen. Anstelle dessen beobachteten wir bei näherer Untersuchung des Wirkungsmechanismus der Calcineurinantagonisten zeitverzögert eine gesteigerte Expression der c-fos-m-RNA und einen Anstieg der AP-1-DNA-Bindungsaktivität.

Basierend auf den genannten Beobachtungen und Daten dieser Studie können folgende Hypothesen aufgestellt werden: Bei der Transkription des IFN- γ -Gens scheint Fos eine entscheidende Rolle im NFAT:AP-1(Fos/Jun)-DNA-Komplex einzunehmen, wenn dieser Locus zuvor über IL-12 und T-bet geöffnet und gegenregulatorische Th2-Signalwege, wie die Aktivierung von GATA-3, blockiert wurden. Relativ geringe Mengen an NFAT reichen in der Gegenwart eines AP-1-Überschusses aus, um zu einer vermehrten Anhäufung der IFN- γ -mRNA zu führen, welche u.a. auch auf einer erhöhten Stabilität der mRNA durch die Präsenz von IL-12 und anti-CD28-Ak basiert^{198,199}. Die Folge ist eine Steigerung der Proteinsekretion. In dieser Situation ergibt sich die AP-1-Aktivität aus einer Aktivierung des CsA-unsensitiven CD28-Signalweges sowie der Desinhibition von Elk-1 infolge der reduzierten Calcineurinaktivität. Die Aktivität von Elk-1 wird durch die MAPK-Kaskaden stimuliert, welche durch CD28- wie auch durch TCR-Triggerung aktiviert werden. Da es sich bei Calcineurin um eine physiologisch relevante Elk-1-Phosphatase handelt^{19,20,193}, kommt es in Gegenwart von Calcineurinantagonisten zu einer weiteren Steigerung der Elk-1-Aktivierung als Resultat der durch CD28-induzierten MAPK-Aktivierung. Die Folge ist eine verstärkte c-fos-Aktivität.

Eine Bindung an CD28 führt zudem zu einer Inhibition der GSK3¹⁹⁰, resultierend in einem verminderten nukleären Export und einer konsequenten Akkumulation NFAT's im Zellkern. Da das Remodeling des IFN- γ -Locus, die Anhäufung NFAT's im Kern infolge des verminderten Exports aus dem Nukleus und die vermehrte Stabilität der IFN- γ -mRNA einige Zeit zum Etablieren benötigen, könnte dies die Zeitverzögerung erklären, mit welcher der Anstieg der IFN- γ -Produktion beobachtet wird.

Die divergenten Effekte Ciclosporins auf die Zytokin-Produktion von T-Zellen könnten Auswirkungen auf immunsuppressive Strategien haben. So trägt ein Anstieg des IFN- γ unter

Therapie mit CsA möglicherweise zu einem Versagen bei der Unterdrückung von „GVH-Diseases“, akuten Transplantatabstoßungen und entzündlichen oder autoimmun bedingten Erkrankungen bei. Die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren, dass sich in Situationen mit erhöhten endogenen IL-12-Spiegel eine Therapie mit CsA auch nachteilig für Patienten auswirken kann. Im Falle konkomitierender Infektionen werden professionelle APC aktiviert, um große Mengen an IL-12 zu produzieren und um ihre kostimulative Kapazität (CD28-Liganden) hochzuregulieren. Eine Interaktion mit T-Zellen resultiert schließlich in dem hier geschilderten Szenario. Der CsA-abhängige Anstieg der IFN- γ -Produktion erklärt somit, weshalb konkomitierende Infektionen verhältnismäßig häufig zu einer Verschlechterung der zugrundeliegenden Krankheit, wie beispielsweise einer Autoimmunerkrankung, führen.

Weiterhin konnten auf Proteinebene Unterschiede in der IFN- γ -Produktion zwischen den einzelnen Versuchspersonen festgestellt werden. So fiel eine Gruppe von Personen auf, die keine IFN- γ -Induktion durch CsA zeigte, sogenannte „non-responder“. Unter Umständen ist es somit möglich, ein Ansprechen von Patienten auf eine Therapie mit CsA bereits vor Therapiebeginn vorherzusagen.

Die Tatsache, dass nicht nur die Produktion von IFN- γ , sondern auch die der Zytokine IL-5⁴¹, IL-13⁴², und TGF- β ⁴³ resistent oder sogar mit einem Anstieg auf CsA bei definierten Stimulationsbedingungen reagieren, unterstreicht, wie Calcineurinantagonisten das empfindliche Gleichgewicht Th1/Th2 beeinflussen können. Tatsächlich konnte eine klinische Studie von Shiohara et al. illustrieren, dass sich die atopische Dermatitis ihrer Patienten unter einer Therapie mit CsA, welche mit einem CsA-induzierten Anstieg der Serum-IFN- γ -Spiegel assoziiert war²⁸, deutlich verbesserte. Angesichts einer weiteren Beobachtung, wonach sich während einer Therapie von Patienten mit atopischer Dermatitis mit rekombinantem IFN- γ klinische Erfolge einstellten^{31,32}, vermuteten Shiohara et al., dass der Anstieg des Serum-IFN- γ -Spiegels während der Behandlung mit CsA möglicherweise zu dem klinischen Erfolg beigetragen haben könnte. Unter Umständen handele es sich bei dem beobachteten IFN- γ -Anstieg aber auch nur um eine Konsequenz des klinischen Erfolgs³⁰.

CsA könnte bei chronisch entzündlichen Hauterkrankungen das zwar kutan, nicht aber systemisch zugunsten der Th1-Immunantwort verschobene Gleichgewicht Th1/Th2 durch die Modulation der Produktion verschiedener Zytokine, insbesondere die des IFN- γ , wiederherstellen.

Die Modulation der Produktion individueller Zytokine für therapeutische Zwecke scheint demzufolge ein mögliches Ziel bei der Behandlung chronisch inflammatorischer Erkrankungen mit Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichts zu sein. Die hier vorgestellten Daten könnten die Basis sein für neue, gezielte Interventionsstrategien bei der Behandlung dieser Erkrankungen.

5 Zusammenfassung

Ciclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK506) sind potente Immunsuppressiva. Trotz fehlender struktureller Verwandtschaft ähneln sich ihre Wirkungsmechanismen: Beide hemmen die Phosphatase Calcineurin und blockieren die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT und dessen Translokation in den Nukleus. Weil T-Zellen Calcineurin nur in geringen Mengen exprimieren, sind sie für eine Hemmung dieses Enzyms besonders anfällig. Calcineurinantagonisten blockieren daher effizient die T-Zell-Aktivierung und bewirken neben einer Suppression von IL-2 eine Inhibition der Transkription zahlreicher Th1- und Th2-Zytokine.

Aufgrund ihrer immunsuppressiven Wirkung finden Calcineurinantagonisten breiten Einsatz in der Transplantationsmedizin und bei der Behandlung chronisch entzündlicher oder autoimmun bedingter Erkrankungen, u.a. auch bei inflammatorischen Hauterkrankungen wie der atopischen Dermatitis oder der Psoriasis.

In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass Calcineurinantagonisten die IFN- γ -Produktion aktivierter humaner Lymphozyten induzieren können. Dieser Effekt ist bei therapeutischen Konzentrationen in einem CsA-Dosisbereich von 100ng/ml bis 1ng/ml nachweisbar. Hierfür ist eine Kooperation dreier unterschiedlicher Signalwege erforderlich: eine Aktivierung über den TCR und eine Kostimulation über CD28 ebenso wie die Präsenz von IL-12. Eine Stimulation mit Allergenen in Kombination mit IL-12 und CsA bei entsprechend sensibilisierten Patienten führte zu ähnlichen Resultaten. Andere Zytokine wie IL-23, IL-18, IL-2 oder das Th2-verwandte Zytokin IL-4 waren nicht fähig, die calcineurinantagonisten-abhängige IFN- γ -Induktion zu unterstützen. Über die entscheidende Bedeutung von IL-12 für die Induktion des IFN- γ in Gegenwart von CsA wurde bisher nicht berichtet.

Weiterhin wird hier erstmals berichtet, dass der beschriebene Effekt der Calcineurinantagonisten mit einer protrahiert gesteigerten c-fos-Expression und einer erhöhten DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 assoziiert ist, nicht aber mit einer vermehrten Expression des Transkriptionsfaktors ERM oder einer gesteigerten DNA-Bindungsaktivität von T-bet. Dies schließt eine Beteiligung von T-bet bei der IFN- γ -Induktion nicht aus. Die IL-12 getriggerte Aktivierung des Transkriptionsfaktors könnte eine entscheidende Rolle bei der Öffnung des IFN- γ -Locus spielen und somit den Zugang weiterer Transkriptionsfaktoren zu diesem ermöglicht haben.

Auf der Grundlage dieser Beobachtungen können folgende Hypothesen aufgestellt werden: Eine T-Zell-Aktivierung über den TCR führt über eine Freisetzung von Calcium zur

Aktivierung von Calcineurin. Calcineurin dephosphoryliert NFAT und ermöglicht damit dessen Translokation in den Nukleus.

Ein TCR-Signal führt zudem zu einer Aktivierung der MAPK-Kaskaden. Daraus resultiert die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Elk-1, welcher in den Nukleus eindringt und dort die Synthese von Fos heraufreguliert. Eine Aktivierung des CsA-unsensitiven CD28-Signalweges führt ebenfalls zur Aktivierung einer MAPK-Kaskade, an deren Ende die Aktivierung von Jun im Zellkern steht. Heterodimere aus Fos und Jun bilden schließlich den Transkriptionsfaktor AP-1.

Die AP-1-Aktivität ergibt sich zusätzlich aus einer Desinhibition von Elk-1 infolge der reduzierten Calcineurinaktivität durch CsA. Eine Bindung an CD28 führt zudem zu einer Inhibition der GSK3, einer NFAT-Nuklear-Export-Kinase, resultierend in einem verminderten nukleären Export und damit Akkumulation von NFAT im Zellkern.

Für eine optimale Transkriptionsaktivierung ist eine kooperative Bindung von NFAT mit anderen Transkriptionsfaktoren an die DNA erforderlich, u.a. agiert NFAT dabei synergetisch mit AP-1-Proteinen.

Bei der Transkription des IFN- γ -Gens scheint Fos eine entscheidende Rolle im NFAT:AP-1(Fos/Jun)-DNA-Komplex einzunehmen, wenn der IFN- γ -Locus zuvor über IL-12 und T-bet geöffnet und gegenregulatorische Th2-Signalwege wie die Aktivierung von GATA3 blockiert wurden. In der Gegenwart eines AP-1-Überschusses reichen relativ geringe Mengen an NFAT aus, um zu einer vermehrten Anhäufung der IFN- γ -mRNA, welche u.a. auch auf einer erhöhten Stabilität der mRNA durch eine IL-12 und CD28-Signalgebung basiert, und folglich zu einer Steigerung der Proteinsekretion zu führen.

Da die Öffnung des IFN- γ -Locus, die Anhäufung von NFAT im Kern infolge des verminderten Exports aus dem Nukleus und die Zunahme der IFN- γ -mRNA-Stabilität einige Zeit benötigen, könnte dies die Zeitverzögerung erklären, mit welcher der Anstieg der IFN- γ -Produktion eintritt.

Die präsentierten Daten könnten erklären, dass konkomitierende Infektionen, welche mit einer vermehrten IL-12- und T-Zell-Aktivierung einhergehen, unter einer Therapie mit Calcineurinantagonisten die Aktivität der zugrundeliegenden Erkrankung wie Autoimmunerkrankungen oder GvHD deutlich erhöhen.

Unter Umständen können die hier dargestellten Ergebnisse auch dazu beitragen, ein Ansprechen von Patienten auf eine Therapie mit CsA bereits vor Therapiebeginn vorherzusagen.

6 Literaturverzeichnis

- 1 **Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H.** Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 1976; 6: 468
- 2 **Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Ochiai T.** FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a streptomyces. *J antibiot* 1987; 40: 1256
- 3 **Schreiber SL, Crabtree GR.** The mechanism of action of cyclosporin A and FK506: *Immunol Today* 1992; 13: 136
- 4 **Mrowietz U.** Ciclosporin und immunmodulierende Macrolactame. *Pharmakologie*: 489-490
- 5 **Reynolds NJ, Al-Daraji WI.** Calcineurin inhibitors and sirolimus: mechanisms of action and applications in dermatology. *Clinical and Experimental Dermatology* 2002; 27: 555
- 6 **Ho S, Clipse N, Timmermann L, Northrop J, Graef I, Fiorentino D, Nourse J, Crabtree GR.** The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 80: 40
- 7 **Crabtree GR.** Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca^{2+} , calcineurin and NF-AT. *Cell* 1999; 96: 611
- 8 **Handschumacher RE, Harding MW, Rice J et al.** Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 1984; 226: 544
- 9 **Liu J, Farmer JD Jr., Lane WS et al.** Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506-complexes. *Cell* 1991; 66: 807
- 10 **Loh C, Shaw KT-Y, Carew J, Viola JPB, Luo C, Perrino BA, Rao A.** Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *J Biol Chem* 1995; 271: 10884
- 11 **Shibasaki F, Price ER, Milan D, McKeon F.** Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. *Nature* 1996; 382: 370
- 12 **Timmerman LA, Clipse NA, Ho SN, Northrop JP, Crabtree GR.** Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca^{2+} signals and immunosuppression. *Nature* 1996; 383: 837
- 13 **Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M.** *Immunologie*, 9. Auflage 2001, Spektrum Verlag
- 14 **Matsuda S, Moriguchi T, Koyasu S et al.** T lymphocyte activation signals for interleukin-2 production involve activation of MKK6-p38 und MKK7-SAPK/JNK signaling pathways sensitive to cyclosporin A. *J Biol Chem* 1998; 273: 12378
- 15 **Matsuda S, Shibasaki F, Takehana K et al.** Two distinct action mechanisms of immunophilin-ligand complexes for the blockade of T cell activation. *EMBO Rep* 2000; 1:428
- 16 **Metcalfe S, Alexander D, Turner J.** FK506 and cyclosporin each block antigen-induced T cell receptor signalling that is dependent on CD4 co-receptor and operates in the absence of detectable cytoplasmic calcium fluxes. *Transpl Int* 1994; 7: 549
- 17 **Metcalfe S, Alexander D, Turner J.** FK506 and cyclosporin A each inhibit antigen-specific signaling in the T cell line 171 in the absence of a calcium signal. *Cell Immunol* 1994; 158: 46
- 18 **Aramburu J, Rao A, Klee C.** Calcineurin: regulation and function. *Curr Top Cell Regul* 2000; 36: 237

- 19 **Sugimoto T, Stewart S, Guan KL.** The calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin is the major Elk-1 phosphatase. *J Biol Chem* 1997; 272: 29415
- 20 **Sugimoto T, Stewart S, Han M, Guan KL.** The kinase suppressor of Ras (KSR) modulates growth factor and Ras signaling by uncoupling Elk-1 phosphorylation from MAP kinase activation. *EMBO J* 1998; 17: 1717
- 21 **Marienfeld R, Neumann M, Chuvpilo S, Escher C, Kneitz B, Avots A, Schimpl A, Serfling E.** Cyclosporin A interferes with the inducible degradation of NF- κ B inhibitors, but not with the processing of p105/NF- κ B1 in T cells. *Eur J Immunol* 1997; 27: 1601
- 22 **Trushin SA, Pennington KN, Algeciras-Schimmich A, Paya CV.** Protein kinase C and calcineurin synergize to activate I κ B kinase and NF- κ B in T lymphocytes. *J Biol Chem* 1999; 274: 22923
- 23 **Shaywitz AJ, Greenberg ME.** CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 821
- 24 **Werlen G, Jacinto E, Xia Y, Karin M.** Calcineurin preferentially synergizes with PKC-theta to activate JNK and IL-2 promoter in T lymphocytes. *EMBO J* 1998; 17: 3101
- 25 **Chen CY, Del Gatto-Konczak F, Wu Z, Karin M.** Stabilization of interleukin-2 mRNA by the c-Jun NH₂-terminal kinase pathway. *Science* 1998; 280: 1945
- 26 **Ming XF, Kaiser M, Moroni C.** c-jun N-terminal kinase is involved in AUUUA-mediated interleukin-3 mRNA turnover in mast cells. *EMBO J* 1998; 17: 6039
- 27 **Levenson JD, Ness SA.** Point mutations in v-Myb disrupt a cyclophilin-catalyzed negative regulatory mechanism. *Mol Cell* 1998; 1: 203
- 28 **Shiohara T, Sagawa Y, Nagashima M.** An unexpected increase in circulating IFN- γ by CyclosporinA in atopic patients: a discrepancy between in vitro and in vivo events. *Acta Derm Venerol* 1994; 74: 20
- 29 **Shevach EM.** The effects of cyclosporin A on the immunesystem. *Annu Rev Immunol* 1985; 3: 397
- 30 **Shiohara T, Imanishi K, Sagawa Y, Nagashima M.** Differential effects of cyclosporine and etretinate on serum cytokine levels in patients with psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 1992; 27: 568
- 31 **Boguniewicz M, Jaffe HS, Izu A, Sullivan MJ, York D, Geha RS et al.** Recombinant gamma interferon in treatment of patients with atopic dermatitis and elevated IgE levels. *Am J Med* 1990; 88: 365
- 32 **Hanifin JM, Schneider LC, Leung DYM et al.** Recombinant interferon gamma therapy for atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 1993; 28: 189
- 33 **Rafiq K, Kasran A, Peng X, Warmerdam PAM, Coorevits L, Ceuppens JL, Van Gool SW.** Cyclosporin A increases IFN- γ production by T cells when co-stimulated through CD28. *J Eur Immunol* 1998; 28: 1481
- 34 **Kubo M, Kincaid RL, Ransom JT.** Activation of the interleukin-4 gene is controlled by the unique calcineurin-dependent transcriptional factor NF(P). *J Biol Chem* 1994; 269: 19441
- 35 **Yssel H, De Waal Malefyt R, Roncarolo MG, Abrams JS, Lahesmaa R, Spits H, De Vries JE.** IL-10 is produced by subsets of human CD4⁺ T cell clones and peripheral blood T cells. *J Immunol* 1992; 149: 2378
- 36 **Zheng XX, Strom TB, Steele AW.** Quantitative comparison of rapamycin and cyclosporine effects on cytokine gene expression studied by reverse transcriptase-competitive polymerase chain reaction. *Transplantation* 1994; 58: 87

- 37 **Tadmori W, Zhang M, Beavis AJ, Sullivan LM, Narula SK.** Suppression of the allogeneic response by human IL-10: a critical role for suppression of a synergy between IL-2 und TNF-alpha. *Cytokine* 1994; 6: 462
- 38 **Grunig G, Correy DB, Leach MW, Seymour BW, Kurup VP, Rennick DM.** Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine produktion and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Exp Med* 1997; 185: 1089
- 39 **Tanaka T, Hu-Li J, Seder RA, Fazekas de St. Groth B, Paul WE.** Interleukin 4 suppresses interleukin 2 and interferon gamma production by naive T cells stimulated by accessory cell-dependent receptor engagement. *Proc Natl Aced Sci USA* 1993; 90: 5914
- 40 **Takeshita S, Gage JR, Kishimoto T, Vredevoe DL, Martínez-Maza O.** Differential regulation of IL-6 gene transcription and expression by IL-4 and IL-10 in human monocytic cell lines. *J Immunol* 1996; 156: 2591
- 41 **Schandené L, Alonso-Vega C, Willems F, Gérard C, Delvaux A, Velu T, Devos R, de Boer M, Goldman M.** B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. *J Immunol* 1994; 152: 4368
- 42 **van der Pouw Kraan TC, Boeijs LC, Troon JT, Rutschmann SK, Wijdenes J, Aarden LA.** Human IL-13 production is negetively influenced by CD3 engagement. Enhancement of IL-13 production by cyclosporin A. *J Immunol* 1996; 156: 1818
- 43 **Li B, Sehajpal PK, Khanna A, Vlassara H, Cerami A, Stenzel KH, Suthanthiran M.** Differential regulation of transforming groth factor beta and interleukin 2 genes in human T cells: demonstration by usage of novel competitor DNA constructs in the quantitative polymerase chain reaction. *J Exp Med* 1991; 174: 1259
- 44 **Pacocha SE, Oriente A, Huang S-K, Essayan DM.** Regulation of antigen-induced human T-lymphocyte responses by calcineurin antagonists. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 828
- 45 **Batiuk TD, Pazderka F, Enns J, De Castro L, Halloran PF.** Cyclosporine inhibition of calcineurin activity in human leukocytes in vivo is rapidly reversible. *J Clin Invest* 1995; 96: 1254
- 46 **Batiuk TD, Pazderka F, Enns J, De Castro L, Halloran PF.** Cyclosporine inhibition of leukocyte calcineurin is much less in whole blood than in culture medium. *Transplantation* 1996; 61: 158
- 47 **Briscoe DM, Henault LE, Geehan C, Alexander SI, Lichtman AH.** Human endothelial cell costimulation of T cell IFN-gamma production. *J Immunol* 1997; 159: 3247
- 48 **Iacono A, Dauber J, Keenan R, Spichty K, Cai J, Grgurich W et al.** Interleukin-6 and interferon-gamma gene expression in lung transplant recipients with refractory acute cellular rejection: Implications for monotoring and inhibition by treatment with aerosolized cyclosporine. *Transplantation* 1997; 64: 263
- 49 **Pazderka F, Enns J, Batiuk TD, Halloran PF.** The functional consequences of partial calcineurin inhibition in human peripheral blood mononuclear leucocytes. *Transpl Immunol* 1996; 4: 23
- 50 **Dumont FJ, Staruch MJ, Fischer P, DaSilva C, Camacho R.** Inhibition of the T cell activation by pharmacologic disruption of the MEK1/ERK MAP kinase or Calcineurin signaling pathways results in differential modulation of cytokine production. *J Immunol* 1998; 160: 2579
- 51 **Seger R, Krebs EG.** The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 1995; 9: 726
- 52 **Rao A, Luo C, Hogan PG.** Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 707
- 53 **Stoddard BLZ, Flick K.E.** Calcineurin-immunosuppressor complexes. *Curr Opin Struct Biol.* 1996; 6: 770

- 54 **McCaffrey PG, Luo C, Kerppola TK, Jain J, Badalian TM, Ho AM, Burgeon E, Lane WS, Lambert JN, Curran T, Verdine GL, Rao A, Hogan PG.** Isolation of the cyclosporin-sensitive T cell transcription factor NFATp. *Science* 1993; 262: 750
- 55 **Northrop JP, Ho SN, Chen L, Thomas DJ, Timmermann LA, Nolan GP, Admon A, Grabtree GR.** NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature* 1994; 369: 497
- 56 **Hoey T, Sun YL, Williamson K, Xu X.** Isolation of two new members of the NF-AT gene family and functional characterization of the NF-AT proteins. *Immunity* 1995; 2: 461
- 57 **Masuda ES, Naito Y, Tokumitsu H, Campbell D, Saito F, Hannum C, Arai K, Arai N.** NFATx, a novel member of the nuclear factor of activated T cells family that is expressed predominantly in the thymus. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2697
- 58 **López-Rodríguez C, Aramburu J, Rakeman AS, Hogan PG, Rao A.** NFAT5, a constitutively nuclear nFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7214
- 59 **Miyakawa H, Woo SK, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM.** Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2538
- 60 **Chen L, Glover JNM, Hogan PG, Rao A, Harrison SC.** Structure of the DNA-binding domains of NFAT, Fos and Jun bound to DNA. *Nature* 1998; 392: 42
- 61 **Jain J, Burgeon E, Badalian TM, Hogan PG, Rao A.** A similar DNA-binding motif in NFAT family proteins and the Rel homology region. *J Biol Chem* 1995; 270: 4138
- 62 **Nolan GP.** NF-AT-AP-1 and Rel-bZIP: hybrid vigor and binding under the influence. *Cell* 1994; 77: 795
- 63 **Zhou P, Sun LJ, Dotsch V, Wagner G, Verdine GL.** Solution structure of the core NFATC1/DNA complex. *Cell* 1998; 92: 687
- 64 **Aramburu J, Garcia-Cozar F, Raghavan A, Okamura H, Rao A, Hogan PG.** Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. *Mol Cell* 1998; 1: 6127
- 65 **Aramburu J, Yaffe MB, López-Rodríguez C, Chantley LC, Hogan PG, Rao A.** Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science* 1999; 285: 2129
- 66 **Zhu J, Shibasaki F, Price R, Guillemot JC, Yano T, Dotsch V, Wagner G, Ferrar P, McKeon.** Intermolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell* 1998; 93: 851
- 67 **Lyakh L, Gosh P, Rice NR.** Expression of NFAT-family proteins in normal human T cells. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 2475
- 68 **Macián F, López-Rodríguez C, Rao A.** Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* 2001; 20: 2476
- 69 **Ranger AM, Oukka M, Rengarajan J, Glimcher LH.** Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. *Immunity* 1998; 9: 627
- 70 **Peng SL, Gerth AJ, Ranger AN, Glimcher LH.** NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation. *Immunity* 2001; 14: 13
- 71 **Kiani A, Garcia-Cozar FJ, Habermann I, Laforsch S, Aebischer T, Ehninger G, Rao A.** Regulation of interferon-gamma gene expression by nuclear factor of activated T cells. *Blood* 2001; 98: 1480

- 72 **Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI.** Differential activation of transcription factors induced by Ca^{2+} response amplitude and duration. *Nature* 1997; 386: 855
- 73 **Negelscu PA, Shastri N, Cahalan MD.** Intracellular calcium dependence of gene expression in single T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2873
- 74 **Fierro L, Lund PE, Parekh AB.** Comparison of the activation of the Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} current ICRAC to InsP3 in Jurkat T-lymphocytes, pulmonary artery endothelia and RBL-1 cells. *Pflügers Arch* 2000; 440: 580
- 75 **Luo C, Shaw KTY, Raghavan A, Aramburu J, Garcia-Cozar F, Perrino BA, Hogan PG, Rao A.** Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 8907
- 76 **Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS.** Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 1998; 392: 933
- 77 **Li WH, Llopis J, Whitney M, Zlokarnik G, Tsien RY.** Cell-permeant caged InsP3 ester shows that Ca^{2+} spike frequency can optimize gene expression. *Nature* 1998; 392: 936
- 78 **Le Deist F, Hivroz C, Partiseti M, Thomas C, Buc HA, Oleastro M, Belohradsky B, Choquet D, Fischer A.** A primary T-cell immunodeficiency associated with defective transmembrane calcium influx. *Blood* 1995; 85: 1053
- 79 **Park J, Yaseen NR, Hogan PG, Rao A, Sharma S.** Phosphorylation of the transcription factor NFATp inhibits its DNA binding activity in cyclosporin A-treated human B and T cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 20653
- 80 **Shaw KTY, Ho AM, Raghavan A, Kim J, Jain J, Park J, Sharma S, Rao A, Hogan PG.** Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of the transcription factor NFATp in stimulated immune cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11205
- 81 **Beals CR, Clipstone NA, Ho SN, Crabtree GR.** Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction. *Genes Dev* 1997; 11: 824
- 82 **Garcia-Rodríguez C, Rao A.** Nuclear factor of activated T cells (NFAT)-dependent transactivation regulated by the coactivators p300/CREB-binding protein (CBP). *J Exp Med* 1998; 187: 2031
- 83 **Avots A, Buttmann M, Chuvpilo S, Escher C, Smola U, Bannister AJ, Rapp UR, Kouzarides T, Serfling E.** CBP/p300 integrates Raf/Rac-signaling pathways in the transcriptional induction of NF-ATc during T cell activation. *Immunity* 1999; 10: 515
- 84 **Lee DU, Avni O, Chen L, Rao A.** A distal enhancer in the IFN- γ locus revealed by genome sequence comparison. *J Biol Chem*. 2004; 279:4802
- 85 **Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang XK, Fathman CG, Glimcher LH.** A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000; 100: 655
- 86 **Kinoshita S, Su L, Amano M, Timmermann LA, Kaneshima H, Nolan GP.** The T cell activation factor NF-ATc positively regulates HIV-1 replication and gene expression in T cells. *Immunity* 1997; 6: 235
- 87 **Macián F, Rao A.** Reciprocal modulatory interaction between human immunodeficiency virus type 1 Tat and transcription factor NFAT1. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 3645
- 88 **McCaffrey PG, Goldfeld AE, Rao A.** The role of NFATp in cyclosporin A-sensitive tumor necrosis factor- α gene transcription. *J Biol Chem* 1994; 269: 30445
- 89 **Irani DN, Lin KI, Griffin DE.** Brain-derived gangliosides regulate the cytokine production and proliferation of activated T cells. *J Immunol* 1996; 157: 4333

- 90 **Musaro A, McCullagh KJ, Naya FJ, Olsen EN, Rosenthal N.** IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature* 1999; 400: 581
- 91 **Molkentin JD, Lu J-R, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olsen EN.** A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 1998; 93: 215
- 92 **Zhang DH, Cohn L, Ray P, Bottomly K, Ray A.** Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th1 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J Biol Chem* 1997; 272: 21597
- 93 **Zhang DH, Yang L, Cohn L, Parkyn L, Homer R, Ray P, Ray A.** Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3. *Immunity* 1999; 11: 473
- 94 **Sica A, Tan T-H, Rice N, Kretschmar M, Gosh P, Young HA.** The c-rel protooncogene product c-Rel but not NF-kappa B binds to the intronic region of the human interferon-gamma gene at a site related to an interferon-stimulable response element. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1740
- 95 **Sica A, Dorman L, Viggiano V, Cippitelli M, Gosh P, Rice N, Young HA.** Interaction of NF-kB and NFAT with the interferon- γ promoter. *J Biological Chemistry* 1997; 48: 30412
- 96 **Matsuda I, Masuda ES, Tsuboi A, Behnam S, Arai N, Arai K-I.** Characterization of NF(P), the nuclear factor that interacts with the regulatory P sequence (5'-CGAAAATTTCC-3') of the human interleukin-4 gene: relationship to NF-kappa B and NF-AT. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199: 439
- 97 **Xu X, Sun YL, Hoey T.** Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science* 1996; 273: 794
- 98 **Kiani A, Rao A, Aramburu J.** Manipulating immune responses with immunosuppressive agents that target NFAT. *Immunity* 2000; 12: 359
- 99 **Loh C, Carew J, Kim J, Hogan PG, Rao A.** T-cell receptor stimulation elicits an early phase of activation and a later phase of deactivation of the transcription factor NFAT1. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 3945
- 100 **Kehlenbach RH, Dickmanns A, Gerace L.** Nucleocytoplasmic shuttling factors including Ran and CRM1 mediate nuclear export of NFAT in vitro. *J Cell Biol* 1998; 141: 863-874
- 101 **Zhu J, McKeon F.** NF-AT activation requires suppression of Crm1-dependent export by cyclosporin. *Nature* 1999; 398: 256
- 102 **Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, Crabtree GR.** Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* 1997; 28: 1930
- 103 **Graef IA, Mermelstein PG, Stankunas K, Neilson JR, Deisseroth K, Tsien RW, Crabtree GR.** L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons. *Nature* 1999; 401: 703
- 104 **Chow CW, Rincon M, Cavanagh J, Dickens M, Davis RJ.** Nuclear accumulation of NFAT opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science* 1997; 278: 1638
- 105 **Neilson J, Stankunas K, Crabtree GR.** Monitoring the duration of antigen-receptor occupancy by calcineurin/glycogen-synthase-kinase-3 control of NF-AT nuclear shuttling. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 346
- 106 **Agarwal S, Avni O, Rao A.** Cell-type-restricted binding of the transcription factor NFAT to a distal IL-4 enhancer in vivo. *Immunity* 2000; 12: 643
- 107 **Ho IC, Hodge MR, Rooney JW, Glimcher LH.** The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell* 1996; 85: 973

- 108 **Hodge MR, Chun HJ, Rengarajan J, Alt A, Lieberman R, Glimcher LH.** NF-AT-driven interleukin-4 transcription potentiated by NIP45. *Science* 1996; 274: 1903
- 109 **Castigli E, Pahwa R, Good RA, Geha RS, Chatila TA.** Molecular basis of a multiple lymphokine deficiency in a patient with severe combined immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4728
- 110 **Feske S, Müller JM, Graf D, Kroczeck RA, Dräger R, Niemeyer C, Baeuerle PA, Peter H-H, Schlesier M.** Severe combined immunodeficiency due to defective binding of the nuclear factor of activated T cells in T lymphocytes of two male siblings. *Eur J Immunol* 1996; 26: 2119
- 111 **Coyle AI, Gutierrez-Ramos J-C.** The expanding B7 superfamily: Increasing complexity in costimulatory signals regulation T cell function. *Nature Publishing Group* 2001
- 112 **Gomez del Arco P, Martinez-Martinez S, Maldonado JL, Ortega-Perez I, Redondo JM.** A role for the p38 MAP kinase pathway in the nuclear shuttling of NFATp. *J Biol Chem* 2000; 275: 13872
- 113 **Porter CM, Havens MA, Clipstone NA.** Identification of amino acid residues and protein kinases involved in the regulation of NFATc subcellular localization. *J Biol Chem* 2000; 275: 3543
- 114 **Chow CW, Davis RJ.** Integration of calcium and cyclic AMP signaling pathways by 14-3-3. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 702
- 115 **Chow CW, Dong C, Flavell RA, Davis RJ.** c-Jun NH(2)-terminal kinase inhibits targeting of the protein phosphatase calcineurin to NFATc1. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 5227
- 116 **Dong C, Yang DD, Wysk M, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Flavell RA.** Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. *Science* 1998; 282: 2092
- 117 **Dong C, Yang DD, Tournier C, Whitmarsh AJ, Xu J, Davis RJ, Flavell RA.** JNK is required for effector T-cell function but not for T-cell activation. *Nature* 2000 ; 405: 91
- 118 **Garcia-Rodríguez C, Rao A.** Requirement for integration of phorbol 12-myristate 13-acetate and calcium pathways is preserved in the transactivation domain of NFAT1. *Eur J Immunol* 2000; 30: 2432
- 119 **Okamura H, Aramburu J, Garcia-Rodríguez C, Viola JPB, Raghavan A, Tahiliani M, Zhan XL, Qin J, Hogan PG, Rao A.** Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol Cell* 2000; 6: 539
- 120 **Macián F, Garcia-Rodríguez C, Rao A.** Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun. *EMBO J* 2000; 19: 4783
- 121 **Wheelock EF.** Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phythemagglutinin. *Science* 1965; 149: 310
- 122 **Gupta SL.** Regulation of cellular gene expression by interferon-gamma: involvement of multiple pathways. *Int J Cell Cloning* 1990; 8: 92
- 123 **Steimle V, Siegrist CA, Mottet A, Lisowska-Grospierre B, Mach B.** Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 1994; 265: 106
- 124 **Bradley LM, Dalton DK, Croft M.** A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development. *J Immunol* 1996; 157: 1350
- 125 **Wenner CA, Guler ML, Macatonia SE, O'Garra A, Murphy KM.** Roles of IFN-gamma and IFN-alpha in IL-12-induced T helper cell-1 development. *J Immunol* 1996; 156: 1442
- 126 **Collart MA, Belin D, Vassalli JD, de Kossodo S, Vassalli P.** Gamma interferon enhances macrophage transcription of the tumor necrosis factor/cachectin, interleukin 1, and urokinase genes, which are controlled by short-lived repressors. *J Exp Med* 1986; 164: 2113

- 127 **Taya Y, Devos R, Tavernier J, Cheroutre H, Engler G, Fiers W.** Cloning and structure of the human immune interferon-gamma chromosomal gene. *EMBO J* 1982; 1: 953
- 128 **Gray PW, Goeddel DV.** Structure of the human immune interferon gene. *Nature* 1982; 198: 859
- 129 **Hardy KJ, Peterlin BM, Atchison RE, Stobo JD.** Regulation of expression of the human interferon gamma gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 8173
- 130 **Hardy KJ, Manger B, Newton M, Stobo JD.** Molecular events involved in regulating human interferon-gamma gene expression during T cell activation. *J Immunol* 1987; 138: 2353
- 131 **Cippitelli M, Sica A, Viggiano V, Ye J, Gosh P, Birrer MJ, Young HA.** Negative transcriptional regulation of the interferon-gamma promoter by glucocorticoids and dominant negative mutants of c-Jun. *J Biol Chem* 1995; 270: 12548
- 132 **Penix L, Weaver WM, Pang Y, Young HA, Wilson CB.** Two essential regulatory elements in human interferon gamma promoter confer activation specific expression in T cells. *J Exp Med* 1993; 178: 1483
- 133 **Ye J, Young HA, Zhang X, Castranova V, Vallyathau V, Shi X.** Regulation of a cell type-specific silencer in the human interleukin-3 gene promoter by the transcription factor YY1 and an AP2 sequence-recognizing factor. *J Biol Chem* 1999; 274: 26661
- 134 **Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, Trinchieri G.** Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 1989; 170: 827
- 135 **Chan SH, Perussia B, Gupta JW, Kobayashi M, Pospisil M, Young HA, Wolf SF, Young D, Clark SC, Trinchieri G.** Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J Exp Med* 1991; 173: 869
- 136 **Mehrotra PT, Grant AJ, Siegel JP.** Synergistic effects of IL-7 and IL-12 on human T cell activation. *J Immunol* 1995; 154: 5093
- 137 **Monteleone G, Parrello T, Luzzi F, Pallone F.** Response of human intestinal lamina propria T lymphocytes to interleukin 12: additive effects of interleukin 15 and 7. *Gut* 1998; 43: 620
- 138 **Weil D, Dautry F.** Induction of tumor necrosis factor-alpha and -beta and interferon-gamma mRNA by interleukin 2 in murine lymphocytic cell lines. *Oncogene Res* 1988; 3: 409
- 139 **Ye J, Ortaldo JR, Conlon K, Winkler-Pickett R, Young HA.** Cellular and molecular mechanisms of IFN-gamma production induced by IL-2 and IL-12 in human NK cell line. *J Leukoc Biol* 1995; 58: 225
- 140 **Young HA, Ortaldo JR.** One-signal requirement for interferon-gamma production by human large granular lymphocytes. *J Immunol* 1987; 139: 724
- 141 **Barbulescu K, Becker C, Schlaak JF, Schmitt E, Meyer zum Buschfelde KH, Neurath MF.** IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN- γ promoter in primary CD4⁺ T lymphocytes. *J Immunol* 1998; 160: 3642
- 142 **Chan SH, Kobayashi M, Santoli D, Perussia B, Trinchieri G.** Mechanisms of IFN-gamma induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12). Role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2. *J Immunol* 1992; 148: 92
- 143 **Young HA, Birchenall-Sparks M, Kovacs E, Dorman L, Ruscetti FW.** Characterization of interleukin 2 and phorbol myristate acetate augmentation of expression of transfected human interferon-gamma genomic DNA. *J Interferon Res* 1988; 8: 527

- 144 **Nagy E, Buhlmann JE, Henics T, Waugh M, Rigby WF.** Selective modulation of IFN-gamma mRNA stability by IL-12/NKSF. *Cell Immunol* 1994; 159: 140
- 145 **Hodge D, Martinez A, Julias JG, Taylor LS, Young HA.** Regulation of nuclear gamma interferon gene expression by interleukin 12 (IL-12) and IL-2 represents a novel form of posttranscriptional control. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 1742
- 146 **Trinchieri G.** Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 251
- 147 **Hsieh CS, Macatonia SE, O'Garra A, Murphy KM.** Pathogen-induced Th1 phenotype development in CD4⁺ alpha beta-TCR transgenic T cells is macrophage dependent. *Int Immunol* 1993; 5: 371
- 148 **Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A.** Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺ T cells. *J Immunol* 1995; 154: 5071
- 149 **Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni M-P, Maggi E, Trinchieri G, Romagnani S.** Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* 1993; 177: 1199
- 150 **Hsieh C, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM.** Listeria induced Th1 development in $\alpha\beta$ -TCR transgenic CD4⁺ T cells occurs through macrophage production of IL-12. *Science* 1993; 260: 547
- 151 **Wolf SF, Temple PA, Kobayashi M, Young D, Dicig M, Lowe L, Dziabo R, Fitz L, Ferenz C, Hewick RM, Kelleher K, Chan SH, Trinchieri G, Perussia B.** Cloning of cDNA for natural killer cell stimulation factor, a heterodimeric cytokine with multiple biological effects on T and natural killer cells. *J Immunol* 1991; 146: 3074
- 152 **Wu C, Warriar R, Wang X, Presky DH, Gately MK.** Regulation of interleukin-12 receptor beta 1 chain expression and interleukin-12 binding by human peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Immunol* 1997; 27: 147
- 153 **Rogge L/N, Barberis-Maino L, Biffi M, Passini N, Presky DH, Gubler U, Sinigaglia F.** Selective expression of interleukin-12 receptor component β 2 on human T helper 1 cells. *J Exp Med* 1997; 185: 825
- 154 **Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM.** Regulation of the interleukin (IL)-12R β 2 subunit expression. *J Exp Med* 1997; 185: 817
- 155 **van Rietschoten JGI, Smits HH, van de Wetering D, Westland R, Verweij CL, den Hartog MT, Wierenga EA.** Silencer activity of NFATc2 in the interleukin-12 receptor β 2 proximal promoter in human T helper cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 34509
- 156 **Zheng W, Flavell RA.** The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997; 89: 587
- 157 **Grogan JL, Mohrs M, Harmon B, Lacy DA, Sedat JW, Locksley RM.** Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity* 2001; 14: 205
- 158 **Ouyang W, Ranganath SH, Weindel K, Bhattacharya D, Murphy TL, Sha WC, Murphy KM.** Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity* 1998; 9: 745
- 159 **Jacobson NG, Szabo SJ, Weber-Nordt RM, Zhong Z, Schreiber RD, Darnell JE Jr., Murphy KM.** Interleukin 12 signalling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (stat)3 and (stat)4. *J Exp Med* 1995; 181: 1755

- 160 **Thierfelder WE, van Deursen JM, Yamamoto K, Tripp RA, Sarawar SR, Carson RT, Sangster MY, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld GC, Ihle JN.** Requirement of STAT4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature (London)* 1996; 382: 171
- 161 **Bacon CM, Petricoin EF 3rd, Ortaldo JR, Rees RC, Lerner AC, Johnston JA, O'Shea JJ.** Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7307
- 162 **Kaplan MH, Sun YL, Hoey T, Grusby MJ.** Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 1996; 382: 174
- 163 **Ouyang W, Jacobson NG, Bhattacharya D, Gorham JD, Fenoglio D, Sha WC, Murphy TL, Murphy KM.** The Ets transcription factor ERM is Th1-specific and induced by IL-12 through a Stat4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 3888
- 164 **Kubin M, Kamoun M, Trinchieri G.** Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells. *J Exp Med* 1994; 180: 211
- 165 **Crepieux P, Coll J, Stehelin D.** The Ets family of proteins: weak modulators of gene expression in quest for transcriptional partners. *Crit Rev Oncog* 1994; 5: 615
- 166 **Bassuk AG, Leiden JM.** The role of Ets transcription factors in the development and function of the mammalian immune system. *Adv Immunol* 1997; 64: 65
- 167 **Janknecht R, Monte D, Baert JL, de Launoit Y.** The ETS-related transcription factor ERM is a nuclear target of signaling cascades involving MAPK and PKA. *Oncogene* 1996; 13: 1745
- 168 **Laget MP, Defosse PA, Albagli O, Baert JL, Dewitte F, Stehelin D, de Launoit Y.** Two functionally distinct domains responsible for transactivation by the Ets family member ERM. *Oncogene* 1996; 12: 1325
- 169 **Nakae K, Nakajima K, Inazawa J, Kitaoka T, Hirano T.** ERM, a PEA3 subfamily of Ets transcription factors, can cooperate with c-Jun. *J Biol Chem* 1995; 270: 23795
- 170 **Ushio S, Namba M, Takanori O, Hattori K, Nakuda Y, Akita K, Tanabe F, Konishi K, Micallef M, Fujii M, Torigoe K, Tanimoto T, Fukuda S, Ikeda M, Okamura H, Kurimoto M.** Cloning of the cDNA for human IFN- γ -inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J Immunol* 1996; 156: 4274
- 171 **Okamura H, Tsutsui T, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Harttori K, Akita K, Namba M, Tanabe F, Konishi K, Fukuda S, Kurimoto M.** Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells. *Nature* 1995; 378: 88
- 172 **Robinson D, Shibuya K, Mui A, Zonin F, Murphy E, Sana T, Hartley SP, Menon S, Kastelein R, Bazan F, Ogarra A.** IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NF κ B. *Immunity* 1997; 7: 571
- 173 **Kohno K, Kataoka J, Ohtsuki T, Suemoto Y, Okamoto I, Usui M, Ikeda M, Kurimoto M.** IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of the Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. *J Immunol* 1997; 158: 1541
- 174 **Okamura H, Kashiwamura S, Tsutsui H, Yoshimoto T, Nakanishi K.** Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 259
- 175 **Tsuji-Takayama K, Aizawa Y, Okamoto I, Kojima H, Koide K, Takeuchi M, Ikegami H, Ohta T, Kurimoto M.** Interleukin-18 induces interferon-gamma production through NF- κ B and NFAT activation in murine T helper type I cells. *Cell Immunol* 1999; 196: 41
- 176 **Yang J, Murphy TL, Ouyang W, Murphy KM.** Induction of interferon-gamma production in Th1 CD4+ T cells: evidence for two distinct pathways for promoter activation. *Eur J Immunol* 1999; 29: 548

- 177 **Hunter CA.** New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 521
- 178 **Pucetti P, Belladonna ML, Grohmann U.** Effects of IL-12 and IL-23 on antigen-presenting cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Crit Rev Immunol* 2002; 22: 373
- 179 **Novak TJ, Rothenberg EV.** cAMP inhibits induction of interleukin 2 but not of interleukin 4 in T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9353
- 180 **van der Pouw-Kraan TC, Kooten CV, Rensink I, Aarden L.** Interleukin (IL)-4 production by human T cells: differential regulation of IL-4 vs IL-2 production. *Eur J Immunol* 1992; 1992: 1237
- 181 **Kubo M, Kincaid RL, Webb DR, Ransom JT.** The Ca^{2+} /calmodulin-activated, phosphoprotein phosphatase calcineurin is sufficient for positive transcriptional regulation of the mouse IL-4 gene. *Int Immunol* 1994; 6: 179
- 182 **Casolaro V, Georas SN, Song Z, Zubkoff D, Abdulkadir SA, Thanos D, Ono SJ.** Inhibition of NF-AT-dependent transcription by NF- κ B: implications for differential gene expression in T helper cell subsets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11623
- 183 **Paliogianni F, Boumpas DT.** Prostaglandin E2 inhibits the nuclear transcription of the human interleukin 2, but not the IL-4, gene in human T cells by targeting transcription factors AP-1 und NF-AT. *Cell Immunol* 1996; 171: 95
- 184 **Tamir A, Granot Y, Isakov N.** Inhibition of T lymphocyte activation by cAMP is associated with down-regulation of two parallel mitogen-activated protein kinase pathways, the extracellular signal-related kinase and c-jun N-terminal kinase. *J Immunol* 1996; 157: 1514
- 185 **Zheng W, Flavell RA.** The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997; 89: 587
- 186 **Batiuk TD, Pazderka F, Halloran PF.** Calcineurin activity is only partially inhibited in leukocytes of cyclosporine-treated patients. *Transplantation* 1995; 59: 1400
- 187 **Ebner S, Ratzinger G, Krosbacher B, Schmuth M, Weiss A, Reider D, Kroczeck A, Herold M, Heufler C, Fritsch P, Romani N.** Production of IL-12 by human monocyte-derived dendritic cells is optimal when the stimulus is given at the onset of maturation, and is further enhanced by IL-4. *J Immunol* 2001; 166: 633
- 188 **Chang CC, Wright A, Punnonen J.** Monocyte-derived CD1a⁺ and CD1a⁻ dendritic cell subsets differ in their cytokine production profiles, susceptibilities to transfection, and capacities to direct Th cell differentiation. *J Immunol* 2000; 165: 3584
- 189 **Troussard AA, Tan C, Yoganathan TN, Dedhar S.** Cell-extracellular matrix interactions stimulate the AP-1 transcription factor in an integrin-linked kinase- and glycogen synthase kinase 3-dependent manner. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 7420
- 190 **Diehn M, Alizadeh AA, Rando OJ, Liu CL, Stankunas K, Botstein D, Crabtree GR, Brown PO.** Genomic expression programs and integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 11796
- 191 **Janknecht R.** Regulation of the c-fos promoter. *Immunobiology* 1995; 193: 137
- 192 **Zinck R, Hipkind RA, Pingoud V, Nordheim A.** c-fos transcriptional activation and repression correlate temporally with the phosphorylation status of TCF. *EMBO J* 1993; 12: 2377
- 193 **Tian J, Karin M.** Stimulation of Elk1 transcriptional activity by mitogen-activated protein kinases is negatively regulated by protein phosphatase 2B (calcineurin). *J Biol Chem* 1999; 274: 15173
- 194 **Boulougouris G, McLeod JD, Patel YI, Ellwood CN, Walker LS, Sansom DM.** IL-2-independent activation and proliferation in human T cells induced by CD28. *J Immunol* 1999; 163: 1809

- 195 **de Launoit Y, Audette M, Pelczar H, Plaza S, Baert JL.** The transcription of the intercellular adhesion molecule-1 is regulated by Ets transcription factors. *Oncogene* 1998; 16: 2065
- 196 **Redford TW, Yi AK, Ward CT, Krieg AM.** Cyclosporin A enhances IL-12 production by CpG motifs in bacterial DNA and synthetic oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 1998; 161: 3930
- 197 **Cho JY, Grigura V, Murphy TL, Murphy K.** Identification of cooperative monomeric Brachyury sites conferring T-bet responsiveness to the proximal IFN-gamma promoter. *Int Immunol* 2003; 15: 1149
- 198 **Walker W, Aste-Amezaga M, Kastelein RA, Trinchieri G, Hunter CA.** IL-18 and CD28 use distinct molecular mechanisms to enhance NK cell production of IL-12-induced IFN-gamma. *J Immunol* 1999; 162: 5894
- 199 **Mullen AC, High FA, Hutchins AS, Lee HW, Villarino AV, Livingston DM, Kung AL, Cereb N, Yao TP, Yang SY, Reiner SL.** Role of T-bet in commitment TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 2001; 292: 1907
- 200 **Mullen AC, Hutchins AS, High FA, Lee HW, Sykes KJ, Chodosh LA, Reiner SL.** Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable T(H)1 gene induction. *Nat Immunol* 2002; 3: 652
- 201 **Murphy KM, Reiner SL.** The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 933

7 Danksagung

Meiner Doktormutter, Prof. Dr. Miriam Wittmann, danke ich für die Überlassung des sehr interessanten Themas, die gewährte hervorragende Unterstützung und fachliche Betreuung über den gesamten Verlauf der Studie.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Thomas Werfel für seine stets konstruktive Kritik und Beratung.

Ich möchte mich sehr herzlich bei allen wissenschaftlichen Mitarbeiter der Hautklinik Linden Hannover für die gute Arbeitsatmosphäre und freundliche Zusammenarbeit bedanken. In diesem Zusammenhang gilt mein besonderer Dank Manuela Bruder für ihre wertvolle Unterstützung.

Bei meinen Mitdoktoranden Herrn Kai Wille und Stefan Janssen bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und die gemeinsame Freude an der Bewältigung der Aufgaben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Freund Benjamin Seeböhm für dessen Geduld und fortwährende Unterstützung.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Killig
Vorname: Claudia
Geburtsdatum/-ort: 28.11.1979, Delmenhorst
Anschrift: Holteistraße 7, 30175 Hannover
Familienstand: ledig
Eltern: Mutter: Kum sil Killig, geb. Chon
Vater: Helmut Killig
Geschwister: Michael Killig
Nils Killig

Schulbildung:

1986 – 1990: Käthe-Kollwitz-Grundschule, Delmenhorst
1990 – 1992: Orientierungsstufe, Delmenhorst
1992 – 1999: Gymnasium an der Willmsstraße, Delmenhorst
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

10/1999 – Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Hochschule
05/2006: Hannover
09/2001: Ärztliche Vorprüfung (Note: gut)
08/2002: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: gut)
03/2005: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: gut)
04/05-03/05: Praktisches Jahr:
Chirurgie: Medizinische Hochschule Hannover und Royal Melbourne
Hospital, Australien
Dermatologie: Hautklinik Linden, Medizinische Hochschule Hannover
Innere Medizin: Robert-Koch-Krankenhaus, Gehrden
05/2006: Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: gut)

Auslandsaufenthalte während des Studiums:

Famulaturen:

03 – 04/2004: Pädiatrie, Universitätskrankenhaus Prag, Tschechien

Praktisches Jahr:

05– 08/2005: Herz-Thorax-Chirurgie, Royal Melbourne Hospital, Australien
Plastische Chirurgie, Royal Melbourne Hospital, Australien

Nebenberufliche Tätigkeiten während des Studiums:

10/01: wissenschaftliche Hilfskraft im Zentrum Biochemie der Medizinischen
Hochschule Hannover
03/03-05/06: In der Facharztpraxis für Kardiologie Dr. Steenken, Hannover.

Berufliche Tätigkeit:

06/06-08/2006: Assistenzärztin in der Abteilung für Dermatologie und Venerologie des Universitätsklinikums Magdeburg
seit 08/2006: Assistenzärztin in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Medizinischen Hochschule Hannover

Dissertation:

„Einfluss von IL-12 auf die durch Calcineurinantagonisten induzierte IFN γ -Produktion aktivierter humaner Lymphozyten“

Experimentelle Studie bei Prof. Dr. med. Miriam Wittmann, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Medizinischen Hochschule Hannover

Publikationen:**Vortrag und zugehöriges Abstract:**

„Calcineurinantagonisten induzieren die IFN- γ -Produktion humaner Lymphozyten bei TCR-Stimulation in Gegenwart von IL-12“, 16. Mainzer Allergie-Workshop 2004

Killig C, Bruder M, Stünkel T, Werfel T, Wittmann M. Calcineurinantagonisten induzieren die IFN γ Produktion humaner Lymphozyten bei TCR-Stimulation in Gegenwart von IL-12. Allergo J 2004, 13:41

publizierte Abstracts:

Wittmann M, Killig C, Bruder M, Kapp A, Werfel T. Calcineurin antagonists induce IFN γ in the presence of TCR stimulation and IL-12 in human lymphocytes. Immunobiology 2004, 209:356

Wittmann M, Killig C, Bruder M, Werfel T. Calcineurin antagonists induce IFN γ in the presence of TCR stimulation and IL-12 in human lymphocytes. Clin Invest Med 2004, 27: abstract 1892

Originalpublikation:

Wittmann M, Killig C, Bruder M, Gutzmer R, Werfel T: Critical involvement of IL-12 in IFN- γ induction by calcineurin antagonists in activated human lymphocytes. Journal of Leukocyte Biology 2006, 80:75

Hannover, 05.04.2007

Claudia Killig

9 Erklärung nach §2 Abs. 2 Nrn. 5 und 6

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Einfluss von IL-12 auf die durch Calcineurinantagonisten induzierte IFN γ -Produktion aktivierter humaner Lymphozyten“ in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Betreuung von Prof. Dr. Miriam Wittmann ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner anderen in- und ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Ergebnisse der Dissertation wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Vortrag und zugehöriges Abstract:

„Calcineurinantagonisten induzieren die IFN- γ -Produktion humaner Lymphozyten bei TCR-Stimulation in Gegenwart von IL-12“, 16. Mainzer Allergie-Workshop 2004

Killig C, Bruder M, Stünkel T, Werfel T, Wittmann M. Calcineurinantagonisten induzieren die IFN γ Produktion humaner Lymphozyten bei TCR-Stimulation in Gegenwart von IL-12. Allergo J 2004, 13:41

publizierte Abstracts:

Wittmann M, Killig C, Bruder M, Kapp A, Werfel T. Calcineurin antagonists induce IFN γ in the presence of TCR stimulation and IL-12 in human lymphocytes. Immunobiology 2004, 209:356

Wittmann M, Killig C, Bruder M, Werfel T. Calcineurin antagonists induce IFN γ in the presence of TCR stimulation and IL-12 in human lymphocytes. Clin Invest Med 2004, 27: abstract 1892

Originalpublikation:

Wittmann M, Killig C, Bruder M, Gutzmer R, Werfel T. Critical involvement of IL-12 in IFN- γ induction by calcineurin antagonists in activated human lymphocytes. Journal of Leukocyte Biology 2006, 80:75

Hannover, den 05.04.2007