

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. G. Steinbeck

Einfluss von Immunsuppressiva auf die Endothelfunktion und
Interaktion von Dendritischen Zellen mit Endothelzellen

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von Anja Trapp
aus München
2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. M. Weis

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Wank
Prof. Dr. B. Walzog

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 11.01.2006

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. HINTERGRUND DER HERZTRANSPLANTATION	6
1.2. IMMUNOLOGISCHE REAKTIONEN UND ABSTOBUNG	6
1.2.1. Das Endothel.....	8
1.2.1.1. Oxidativer Stress, Apoptose, Proliferation und metabolische Aktivität bei Endothelzellen.....	10
1.2.1.2. Stickstoffmonoxyd (NO) und Endothelin-1 (ET-1)	10
1.2.1.3. Adhäsion und Transmigration von Leukozyten an und durch das Endothel	12
1.2.2. Immunologie	14
1.2.2.1. Die Dendritischen Zellen	14
1.2.2.2. Die T-Lymphozyten Aktivierung.....	19
1.2.3. Immunsuppressiva.....	21
1.2.3.1. Methylprednisolon	21
1.2.3.2. Mycophenolat Mofetil.....	22
1.2.3.3. Cyclosporin A	22
1.2.3.4. Tacrolimus.....	23
1.2.3.5. Rapamycin.....	23
1.3. HYPOTHESE, ZIELSETZUNG UND AUFGABENSTELLUNG	24
2. Material und Methoden	25
2.1. GERÄTE	25
2.2. DIE IMMUNSUPPRESSIVEN SUBSTANZEN	25
2.2.1. Konzentrationen und Lösung der Immunsuppressiva	25
2.3. IMMUNSUPPRESSIVA UND ENDOTHELFUNKTION	26
2.3.1. Kultivierung und Passage der Zelllinie humaner mikrovaskulärer Endothelzellen (HMEC-1)	26
2.3.2. Oxidativer Stress (in weißen Platten).....	28
2.3.3. Apoptose (in weißen Platten)	29
2.3.4. Metabolische Aktivität (in transparenten Platten)	30
2.3.5. Proliferation (in transparenten Platten)	31
2.3.6. Endothelin-1 (ET-1)	31
2.3.7. NO (in schwarzen Platten)	32
2.3.8. Proteinbestimmung (in transparenten Platten)	33
2.3.9. Auswertung und Statistik	34
2.4. IMMUNSUPPRESSIVA UND ADHÄSION VON DENDRITISCHEN ZELLEN (MURIN)	34
2.4.1. Kultivierung und Passage der Zelllinien muriner aortaler Endothelzellen und muriner Dendritischer Zellen:	34
2.4.2. mEC und NO.....	35
2.4.3. Adhäsionsassay von mDC an mEC (weiße Platten)	35
2.4.4. Viabilität der mDC (transparente Platten)	38
2.5. IMMUNSUPPRESSIVA UND GENEXPRESSION VON ADHÄSIONSMOLEKÜLEN UND EXTRAZELLULÄREN MATRIXPROTEINEN BEI MURINEN DENDRITISCHEN ZELLEN	39
2.5.1. RNA Isolierung aus unstimulierten und stimulierten mDC	39
2.5.2. Genexpressionsanalyse der murinen DCs in Hinblick auf Adhäsionsmoleküle und extrazelluläre Matrixproteine (GEArray)	41
2.5.3. Semiquantitative PCR von mDC cDNA aus RNA zur Evaluierung des GEArray....	43

2.6. IMMUNSUPPRESSIVA UND GENEXPRESSION VON ADHÄSIONSMOLEKÜLEN UND EXTRAZELLULÄREN MATRIXPROTEINEN BEI HUMANEN MYELOIDEN DENDRITISCHEN ZELLEN	47
2.6.1. Gewinnung humaner myeloider DC aus Vollblut.....	47
2.6.2. Überprüfung der humanen myeloiden DCs mittels FACS-Analyse	49
2.6.3. RNA Isolierung aus unstimulierten und stimulierten humanen, myeloiden DC	50
2.6.4. Genexpressionsanalyse der humanen, myeloiden DCs in Hinblick auf.....	51
Adhäsionsmoleküle und extrazelluläre Martixproteine (GEArray)	51
2.6.5. Semiquantitative PCR von myeloiden humanen DC cDNA aus RNA zur.....	51
Evaluierung des GEArray	51
2.7. STATISTIK	52
3. Ergebnisse.....	53
3.1. IMMUNSUPPRESSIVA UND ENDOTHELFUNKTION	53
3.1.1. Oxidativer Stress (n=6)	53
3.1.2. Apoptose (n=6).....	55
3.1.3. Metabolische Aktivität (n=6)	56
3.1.4. Endothelzell- Proliferation (n=6)	57
3.1.5. NO Produktion (n=6)	58
3.1.6. Endothelin-1 (n=6)	59
3.1.7. Kumulativer Index der endothelialen Funktion (Cumulative endothelial function index CEFI)	60
3.2. IMMUNSUPPRESSIVA UND ADHÄSION VON DENDRITISCHEN ZELLEN (MURIN)	61
3.2.1. mECs und NO (n = 5)	61
3.2.2. Adhäsionsassay von mDCs an mECs.....	62
3.2.3. Viabilität der mDCs (n = 5)	65
3.3. IMMUNSUPPRESSIVA UND GENEXPESSION VON ADHÄSIONSMOLEKÜLEN UND EXTRAZELLULÄREN MATRIXPROTEINEN BEI MURINEN DENDRITISCHEN ZELLEN	66
3.3.1. RNA Isolierung aus unstimulierten und stimulierten mDCs (n = 3)	66
3.3.2. Genexpressionsanalyse (GEArray) der murinen DCs in Hinblick auf Adhäsions.....	66
moleküle und extrazelluläre Martixproteine (n =3)	66
3.3.3. Semiquantitative PCR von mDC cDNA aus RNA zur Evaluierung des GEArray....	73
3.4. IMMUNSUPPRESSIVA UND GENEXPESSION VON ADHÄSIONSMOLEKÜLEN UND EXTRAZELLULÄREN MATRIXPROTEINEN BEI HUMANEN MYELOIDEN DENDRITISCHEN ZELLEN	74
3.4.1. Überprüfung der humanen myeloiden DCs (hDCs) aus Vollblut mittels FACS-Analyse	74
3.4.2. RNA Isolierung aus unstimulierten und stimulierten humanen, myeloiden DCs (n = 1).....	76
3.4.3. Genexpressionsanalyse (GEArray) der humanen, myeloiden DCs in Hinblick auf Adhäsionsmoleküle und extrazelluläre Martixproteine (n = 1)	76
3.4.4. Semiquantitative PCR von myeloiden humanen DC cDNA aus RNA zur Evaluierung des GEArray	81
4. Diskussion	82
4.1. IMMUNSUPPRESSIVA UND ENDOTHELFUNKTION	82
4.1.1. Immunsuppressiva und oxidativer Stress, Apoptose und Proliferation	83
4.1.2. Immunsuppressiva und NO und ET-1.....	85
4.1.3. Immunsuppressiva und die Integration aller untersuchten Funktionen (CEFI)	86

4.2. IMMUNSUPPRESSIVA UND DENDRITISCHEN ZELLEN.....	87
4.2.1. DC-Adhärenz an das Endothel.....	88
4.2.1.1. Immunsuppressive Endothelstimulation (murin) und DC (murin) Adhärenz....	89
4.2.1.2. Immunsuppressive DC Stimulation (murin) und Adhärenz an das Endothel (murin).....	89
4.2.1.3. Immunsuppressive DC Stimulation (murin) und Adhärenz an das immunsuppressiv stimulierte Endothel (murin) mit und ohne immunsuppressive Stimulation während der Kokultivierung.....	90
4.2.2. DC Aktivierung.....	91
4.2.2.1. Genexpressionsanalyse von murinen myeloiden, immaturren DCs.....	91
4.2.2.2. Genexpressionsanalyse von humanen myeloiden, immaturren DCs.....	94
Zusammenfassung	95
Abbildungsverzeichnis	98
Tabellenverzeichnis	99
Abkürzungsverzeichnis.....	100
Literaturverzeichnis.....	101

1. Einleitung

1.1. HINTERGRUND DER HERZTRANSPLANTATION

Die Prävalenz der chronischen Herzinsuffizienz in den westlichen Industrieländern beträgt zwischen 0,4 und 2 %. Entsprechend leiden zur Zeit in Deutschland über 800 000 Patienten an einer Herzerkrankung im Endstadium mit ca. 100 000 Neuerkrankungen jährlich (Scheld HH, 2001). Als ultimative Therapie der terminalen Herzinsuffizienz gilt bei entsprechender Indikation die Herztransplantation. Auf Grund der beschränkten Verfügbarkeit der Spenderorgane können nur ca. 25 % der potentiellen Patienten bei denen eine Transplantation indiziert wäre, tatsächlich durch Transplantation therapiert werden. Die Prognose der herztransplantierten Patienten hat sich in den letzten 25 Jahren deutlich verbessert. Als Folge verbesserter operativer Methoden, immunsuppressiver Therapie und postoperativer Behandlung von Infektionen ist die Überlebensrate transplantierte Patienten auf 75-85 % nach einem, 70-80 % nach 5 und über 60 % nach 10 Jahren deutlich gestiegen (Trulock *et al.*, 2004).

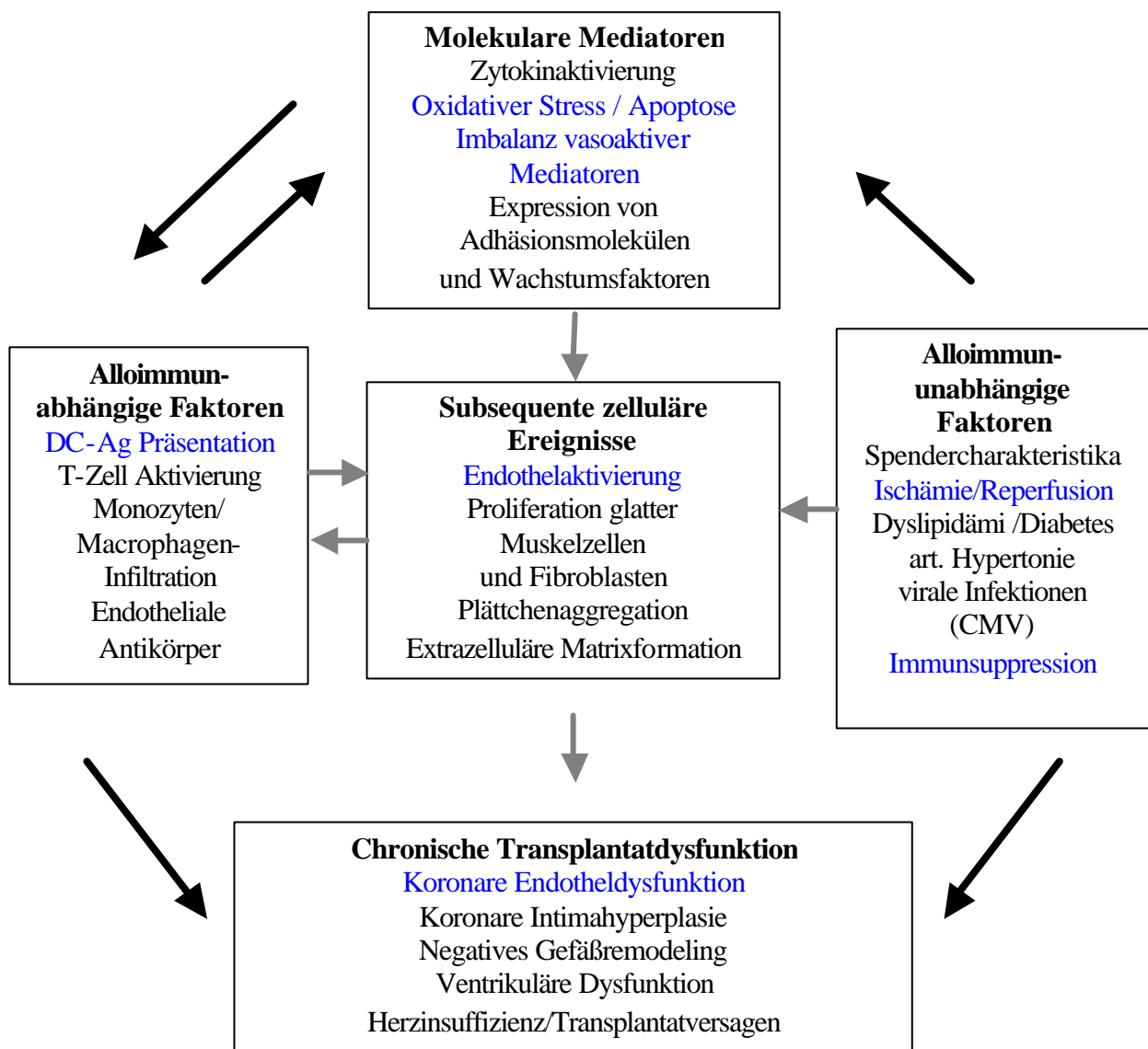
Obwohl die akute Abstoßung durch optimierte immunsuppressive Therapie verringert werden konnte (ca. 50 % der Patienten zeigen im ersten postoperativen Jahr keine Abstoßungsreaktionen), wird die Langzeitprognose durch die Entwicklung einer chronischen Abstoßung, genannt Transplantatvaskulopathie, eingeschränkt. Im Rahmen der Transplantatvaskulopathie kommt es zu einer beschleunigten Koronar-Arteriosklerose im transplantierten Herzen. Die Transplantatvaskulopathie gilt als eine der häufigsten Ursachen eines Transplantatversagens im Langzeitverlauf (Hollenberg *et al.*, 2001).

1.2. IMMUNOLOGISCHE REAKTIONEN UND ABSTOßUNG

Neben der Qualität des Spenderorgans, abhängig u.a. von Alter, Gesundheit des Spenders und der Ischämiedauer bis zur Transplantation, ist die adaptive Immunantwort in Form der Abstoßung das größte Hindernis für eine erfolgreiche Transplantation. Über eine möglichst perfekte Übereinstimmung der Blutgruppe und Testung präformierter Antikörper des Empfängers wird versucht, dieses Problem zu minimieren. Trotzdem ist immer eine immunsuppressive Therapie zur Verhinderung der Abstoßung des Organs notwendig. Die Abstoßungsreaktionen werden in hyperakute, akute und chronische Abstoßung aufgrund des zeitlichen Auftretens und der Pathologie unterteilt. Die akute Abstoßung wird vorwiegend

über das zelluläre, adaptive Immunsystem, primär über die T-Lymphozyten vermittelt. Die genaue Entstehung der chronischen Transplantatvaskulopathie hingegen ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt; offensichtlich sind jedoch neben alloimmun-abhängigen auch alloimmun-unabhängige Risikofaktoren relevant (Moien-Afshari *et al.*, 2003) (siehe Abbildung 1).

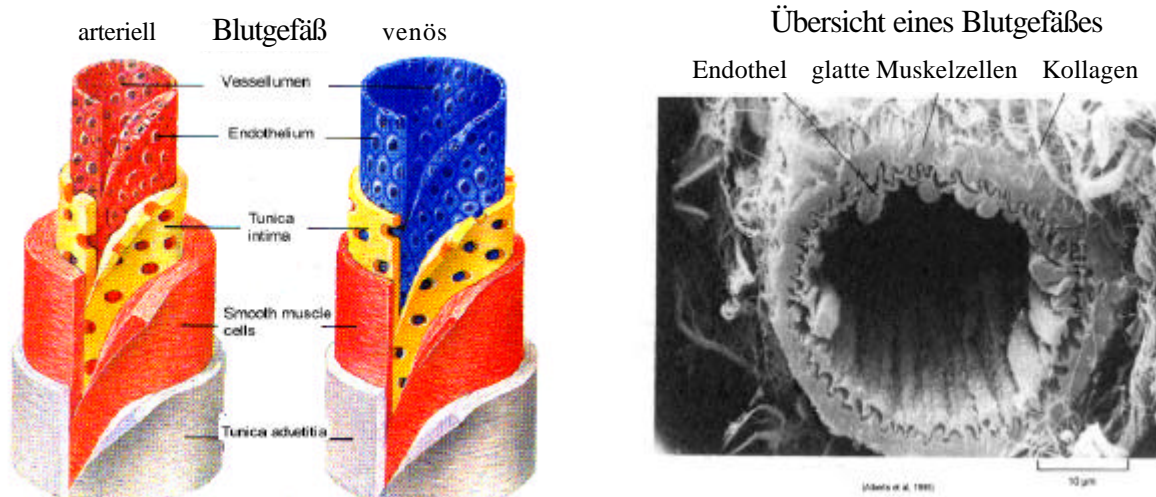
Abbildung 1: Schema zur Entstehung der Transplantatvaskulopathie mit beteiligten Faktorengruppen (Weis *et al.*, 2000)



1.2.1. Das Endothel

Die einzellige Schicht der Endothelzellen, genannt Endothel, bildet die innerste Schicht des gesamten Gefäßsystems (siehe Abbildung 2).

Abbildungen 2: Gefäßaufbau (Fajardo, 1989)



Das Endothel fungiert nicht nur als physische Barriere zwischen Blut und Gewebe, sondern steuert aktiv über Abgabe von Faktoren und Mediatoren die Hämostase (Becker *et al.*, 2000). Dies beinhaltet die Regulation von Gefäßtonus, Wachstums- und Remodelingprozessen, sowie anti-thrombogene und anti-inflammatorische Faktoren. Dadurch werden auch Adhäsion von Zellen an das Endothel und Permeabilität mit folgender Transmigration beeinflusst (siehe Tabelle 1). In vivo sind die Eigenschaften der Endothelzellen (ECs) durch das jeweilige Milieu auf jedes Organ angepasst. Daher zeichnet sich das Endothel durch eine relativ hohe Plastizität mit sensibler Reaktion auf Änderungen des Milieus aus (Cines *et al.*, 1998).

Tabelle 1: Endothelfunktion (Verma *et al.*, 2002)

Funktion	Mediatoren
vasodilatierend	NO, Prostazyklin, Endothel stammernder Wachstumsfaktor (EDGF), Bradikinin, Adrenomedullin, C-natriuretisches Peptid
vasokonstriktorisch	ET-1, Angiotensin II, Thromboxan A ₂ , ROIs, Prostaglandin H ₂
anti-proliferativ	NO, Prostazyklin, Transforming Wachstumsfaktor –β, Heparinsulfat
proliferativ	ET-1, Angiotensin II, ROIs, Thrombozyten stammender Wachstumsfaktor (PDGF), Basis Fibroblasten Wachstumsfaktor (bFGF), insulin-like Wachstumsfaktor, Interleukine (IL)
anti-thrombogen	NO, Prostazyklin, Plasminogen Aktivator, Protein C, Gewebe Faktor Inhibitor, von Willebrand Faktor (vWF)
pro-thrombogen	ET-1, ROIs, Plasminogen Aktivator Inhibitor-1, Thromboxan A ₂ , Fibrinogen, Gewebefaktor
inflammatorisch	Zelluläre Adhäsionsmoleküle (P- und E-Selektin, ICAM, VCAM), Chemokine, Nukleärer Faktor ?-B (NF ?-B)
Permeabilität	Rezeptor für fortgeschrittene Glycosylierungsendprodukte (RAGE)
Angiogenese	Vaskulärer Wachstumsfaktor (VEGF)

NO= Stickstoffmonoxyd; ET-1= Endothelin-1; ROIs= reactive oxygen intermediates (= reaktive Sauerstoff-zwischenprodukte); P-und E- Selektin= platelet- (=Thrombozyten) und endotheliales Selektin, ICAM= inter-zelluläres Adhäsionsmolekül; VCAM= vaskulär-zelluläres Adhäsionsmolekül

Das Endothel bietet die größte Kontaktfläche zwischen transplantiertem Organ und dem Immunsystem, vor allem den im Blut zirkulierenden Immunzellen. Durch Expression von MHC- und Adhäsions- Molekülen, Freisetzung von Faktoren und Mediatoren ist das Endothel direkt an der Aktivierung und / oder Einwanderung von Immunzellen in das parenchymale Gewebe beteiligt (Valujskikh *et al.*, 2003). Durch oxidativen Stress und Signale inflammatorischer Zellen (T- Zellen, Monozyten/ Makrophagen, Dendritische Zellen), sowohl über Zytokine als auch Kontakt abhängig (z.B. über CD40L), wird die normale Funktion des Endothels durch veränderte Genexpression modifiziert (= Endothelaktivierung). Dies wirkt sich unter anderem in einer verstärkten Rekrutierung von Immunzellen, einer geänderten Vasomotorik und intravaskulären Koagulation aus und kann wiederum zu einer starken Schädigung des Endothels führen. Somit ist das Endothel das Hauptziel der Immunantwort und eine Endotheldysfunktion nach Herztransplantation gilt daher als frühzeitiger Marker für eine chronische Abstoßungsreaktion (Hollenberg *et al.*, 2001; Weis *et al.*, 1997).

1.2.1.1. Oxidativer Stress, Apoptose, Proliferation und metabolische Aktivität bei Endothelzellen

Wie oben erwähnt ist ein intaktes, voll funktionsfähiges Endothel Voraussetzung für eine lange Überlebensdauer des transplantierten Organs. Da das Spenderorgan einer Ischämie/Reoxigenierung ausgesetzt ist, besteht die Gefahr einer Schädigung des Endothels durch den erhöhten oxidativen Stress. Im normalen Endothelzell-Metabolismus wird ständig eine kleine Menge von „reactive oxygen species“ (ROS) durch die oxidative Phosphorylierung während des Elektronentransports über die mitochondriale Membran freigesetzt (Superoxyd Leck), welche normalerweise sofort über Antioxidantien (siehe unten, bei induzierten Schutzmechanismen) inaktiviert werden. Durch die fehlende Versorgung mit Sauerstoff während einer Hypoxie bzw. Ischämie/ Reoxigenierung werden jedoch ROS durch die Aktivierung der Xanthin Oxidase in Anwesenheit von Xanthin generiert. Xanthin entsteht durch den Abbau von ATP in Abwesenheit von Sauerstoff (= anaerobe Energiegewinnung). Glutathion, Hitzeschockproteine, Superoxid Dismutase und Hämoxigenase sind induzierbare Schutzmechanismen, um die Zelle vor oxidativen Stress zu schützen. Reicht dieser Schutz nicht aus, sind Lipidperoxidation, Proteindegradation, -schädigung und Zerstörung der DNA die Folge, was zum schnellen Zelltod führt (Pohlman T H, 2000).

Vermehrter oxidativer Stress führt zu einer gesteigerten Apoptose der Endothelzellen (Ferrari *et al.*, 2004), die durch Endothelzellproliferation kompensiert werden muß, um die Hämostase nicht zu gefährden. Sowohl verstärkte Proliferation als auch die Synthese der protektiven Mechanismen steigern die metabolische Aktivität des Endothels, wobei durch das mitochondriale Superoxid-Leck weitere „reactive oxygen intermediates“ (ROI) entstehen. Durch vermehrten oxidativen Stress wird über eine redox-sensitive NF- κ -B Aktivierung auch die Expression von Adhäsionsmolekülen erhöht (Jiang *et al.*, 2004).

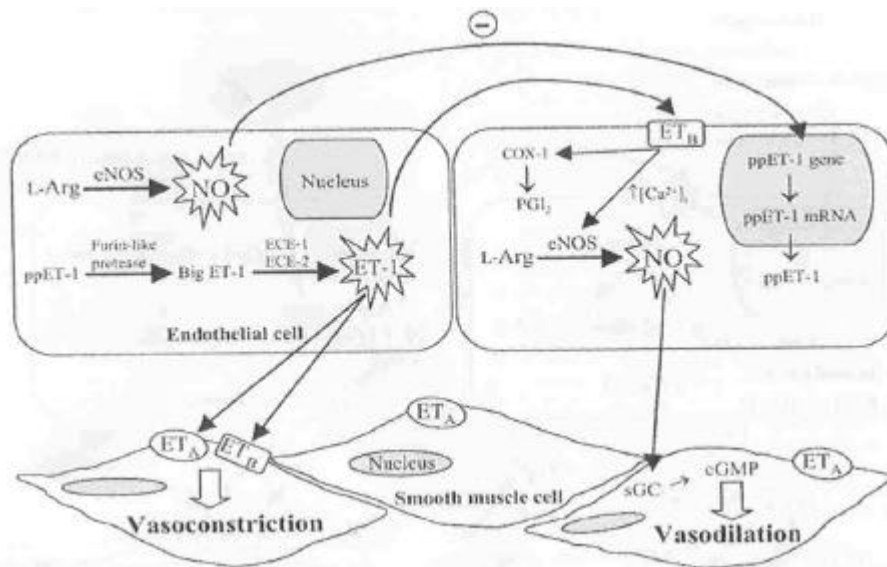
1.2.1.2. Stickstoffmonoxyd (NO) und Endothelin-1 (ET-1)

Die beiden stärksten Autakoide des Endothels sind die beiden Gegenspieler NO und ET-1. Das kurzlebige Radikal NO wird durch die NO-Synthasen (NOS) aus Arginin synthetisiert, diffundiert durch die Zellmembranen in glatte Muskelzellen und führt über Guanylatzyklase Bindung mit anschließender cGMP Freisetzung zu einer Ca²⁺ gesteuerten Relaxation (= Gefäßdilatation). Es gibt drei verschiedene Isoformen der NOS: die neuronale NOS (nNOS) und endotheliale NOS (eNOS), beide Calcium-abhängig, werden konstitutiv exprimiert, während die Calcium-unabhängige induzierbare NOS (iNOS) durch Inflammation und

Zytokine aktiviert wird (Alonso D, 2003). Neben dem vasodilatierenden Effekt besitzt NO einen anti-inflammatorischen Effekt, indem es die Adhäsion von Zellen an das Endothel verringert (Blantz *et al.*, 2002).

Die drei Isoformen des Endothelin, ET-1 (v.a. im Endothel), ET-2 (v.a. in der Niere) und ET-3 (v.a. im Gehirn) bestehen jeweils aus 21 Aminosäuren. Die Hauptform im kardiovaskulären System ist ET-1 und wird in den Endothelzellen durch Spaltung aus Präpro-Endothelin zu Big-Endothelin und anschließender proteolytischer Spaltung (durch das Endothelin Converting Enzym = ECE) des Big-ETs synthetisiert. Die Wirkung des ET-1 wird über die Bindung an verschiedene Rezeptoren vermittelt. Es existieren drei verschieden G-Protein gekoppelte ET-Rezeptoren: im Gefäßsystem befinden sich die Rezeptoren ET_A (glatte Muskelzellen) und ET_B (Endothel), während in der Hypophyse vor allem ET_C-Rezeptoren vorhanden sind. ET_A zeigt eine höhere Affinität zu ET-1 (ET-1 >> ET-3) während ET_B die gleiche Affinität für ET-1 und ET-3 aufweist (Goraca, 2002). Die Bindung von ET-1 an die Rezeptoren ET_A und ET_B auf glatten Muskelzellen führt zu einer Vasokonstriktion, zu einem gesteigerten Wachstum der glatten Muskelzellen und zu einer verstärkten Zelladhäsion. Eine Bindung an endotheliale ET_B – Rezeptoren hat im Gegensatz eine Stimulation der NO- und Prostacyclin- Freisetzung zur Folge, inhibiert die ECE-1 Synthese und schützt das Endothel vor Apoptose (Alonso D, 2003). Somit kommt den endothelialen ET_B – Rezeptoren in der Lunge auch die wichtige Aufgabe der Clearance des ET-1 aus dem Blut zu. Neben dem vasokonstringierenden Effekt, besitzt ET-1 eine für Immunzellen adhäsionsfördernde Wirkung (Li *et al.*, 2003).

Abbildung 3: Wechselwirkung von NO und ET-1 (Alonso D, 2003)



1.2.1.3. Adhäsion und Transmigration von Leukozyten an und durch das Endothel

Eine Endothelaktivierung führt über die erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und diversen Mediatoren zur Adhäsion und Transmigration von Leukozyten. Die Adhäsion wird über verschiedene Adhäsionsmoleküle vermittelt (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Adhäsionsmoleküle, die an Adhäsion und Transmigration von Leukozyten beteiligt sind nach Walzog (Walgog *et al.*, 2000)

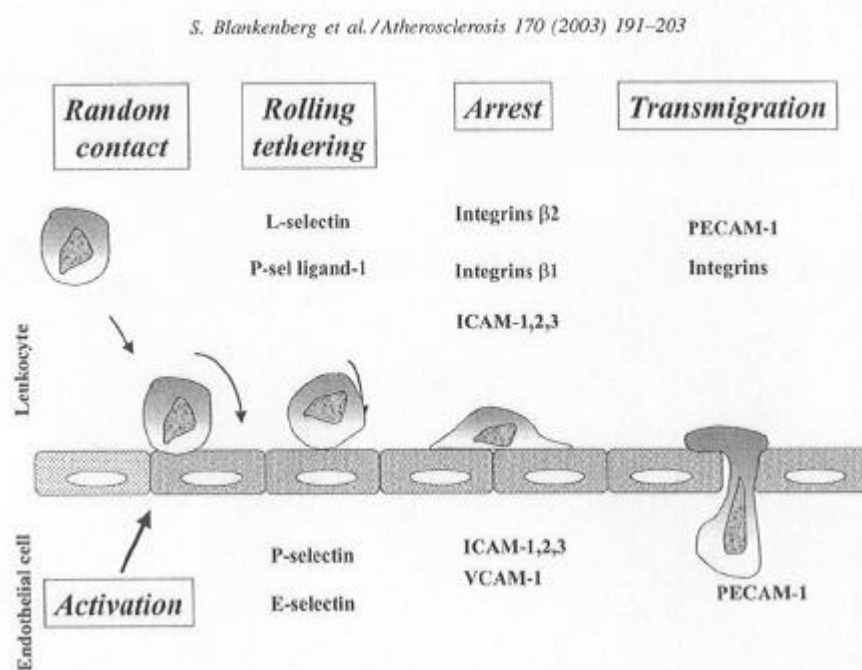
Adhäsionsmoleküle	Synonyme	Hauptvorkommen	Hauptliganden
Selektine			
L-Selektin	CD62L	Leukozyten	DC34, Glycam-1, MAdCam-1, PSGL-1
P-Selektin	CD62P	Endothelzellen, Thrombozyten	PSGL-1
E-Selektin	CD62E	Endothelzellen	ESL-1, PSGL-1
Integrine			
β_1 - Integrin			
α_4/β_1	CD49d / CD29, VLA-4	Lymphozyten, Monozyten	VCAM-1, Fibronectin
β_2 - Integrine			
α_L/β_2	CD11a / CD18, LFA-1	Leukozyten	ICAM-1, -2, -3
α_M/β_2	CD11b / CD18, Mac-1	Neutrophile, Monozyten	ICAM-1, Fibrinogen, C3bi, Faktor X
α_X/β_2	CD11c / CD18, gp150/95	Neutrophile, Monozyten	ICAM-1, Fibrinogen, C3bi
α_D/β_2	CD11d / CD18	Lymphozyten	VCAM-1, ICAM-3
β_3 - Integrine			
α_V/β_3	CD51 / CD 61	Leukozyten	Vitronectin, CD31
β_7 - Integrine			
α_4/β_7	CD49d / β_7	Lymphozyten	VCAM-1, MAdCam-1
α_E/β_7	CD103 / β_7	Lymphozyten	E-Cadherin
Immunglobuline			
ICAM-1	CD54	Endothelzellen	LFA-1, gp150/95
ICAM-2	CD102	Endothelzellen	LFA-1, (Mac-1)
ICAM-3	CD50	Leukozyten	LFA-1, α_D/β_2
VCAM-1	CD106	Endothelzellen	α_4/β_1 , α_4/β_7
PECAM-1	CD31	Neutrophile, Monozyten, Thrombozyten, Endothelzellen	CD 31, α_V/β_3
Andere			
CD44		Leukozyten	Hyaluronan
VAP-1		Endothelzellen	?

AM= Adhäsionsmolekül ICAM= interzelluläres AM; PECAM=Thrombozyten-/Endothel -Zell AM; VCAM= vaskulär-zelluläres AM, LFA= Leukozyten Funktionsassoziiertes Antigen; ESL=E-Selektin Ligand; PSGL= P-Selektin Glykoprotein Ligand,

Einige dieser Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1 werden konstitutiv, bei Endothelaktivierung jedoch verstärkt exprimiert, während z. B. die E- und P- Selektin Expression des Endothels ausschließlich die Folge von Stimulation bzw. Aktivierung ist. Das L-Selektin der Leukozyten wird im Gegensatz dazu konstitutiv exprimiert. Die Integrine der Leukozyten besitzen mehrere Konformationszustände. Integrine auf der Oberfläche von „ruhenden“, nicht aktivierten Leukozyten zeigen nur geringe Affinität zu ihren Liganden, während die Konformationsänderung durch Zellaktivierung zu einer höheren Affinität führt.

Die Adhäsion und Transmigration kann in mehrere Abschnitte unterteilt werden. Die Hauptabschnitte umfassen den ersten zufälligen Kontakt mit Aktivierung (unterstützt durch chemoattraktive, entzündliche Mediatoren), das Rollen und „Ankern“, gefolgt von der Anhaftung der Leukozyten an das Endothel und der anschließenden Migration aus dem Lumen in das extravasale Gewebe. An den entsprechenden Phasen sind verschiedene Adhäsionsmoleküle beteiligt. So erscheinen die Selektine mit ihren Liganden vor allem für das Rollen verantwortlich, welches in einer deutlichen Abnahme der Geschwindigkeit resultiert. Dies ist notwendig, um eine Anhaftung über Integrine und ICAM, VCAM-1 Interaktion zu gewährleisten. Erst danach kann eine PECAM-1 und Integrin-vermittelte Einwanderung in den extravasalen Raum erfolgen (siehe Abbildung 4).

Abbildung 4: Schematische Leukozyten-Endothel Interaktion (Blankenberg *et al.*, 2003)



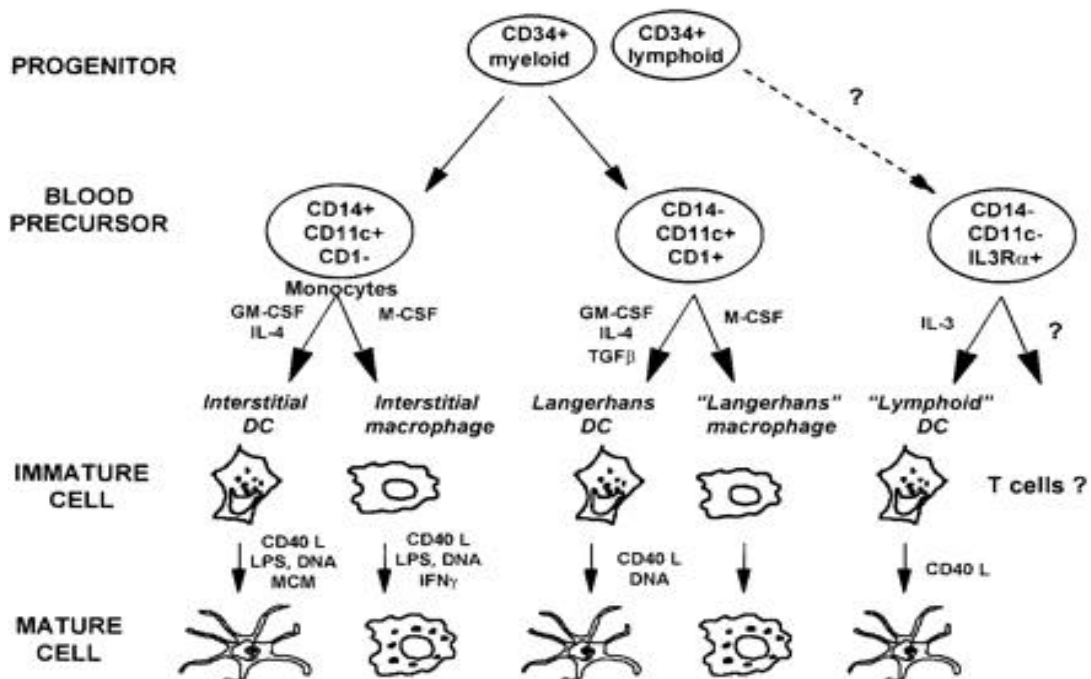
Die in das extravasale Gewebe eingewanderten Leukozyten sezernieren Zytokine (z. B. IL-1 und MCP-1 = CCL-2) oder ROS, was zu einer Verstärkung der Endothelaktivierung führt, weitere Leukozyten anlockt und durch die erhöhte Permeabilität des Endothels die Transmigration erleichtert (Muller, 2003).

1.2.2. Immunologie

1.2.2.1. Die Dendritischen Zellen

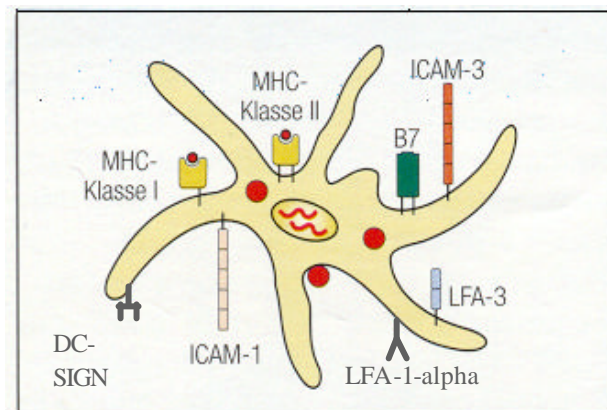
B-Lymphozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen (DC) sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen, die T-Lymphozyten aktivieren können. DCs gelten als die relevantesten Antigen-präsentierenden Zellen, da sie auch B-Lymphozyten und somit den gesamten zellulären Anteil des adaptiven Immunsystems in Gang setzen können. Da die DCs sowohl frühe, angeborene als auch lang andauernde erworbene Immunantworten kontrollieren und damit auch an der Selbsttoleranz des Körpers beteiligt sind, gelten sie als Schlüsselregulatoren der Immunreaktion (Granucci *et al.*, 2004). DCs entwickeln sich aus vielen verschiedenen Vorläuferzellen. Die DCs können in mindestens drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden: plasmazytoide DC (aus lymphoiden Vorläufern abstammend), Langerhanszellen (vorwiegend in der Haut) und interstitielle DC (beide aus myeloiden Vorläufern abstammend, Abbildung 5).

Abbildung 5: Entwicklung von DCs aus verschiedenen Vorläufern (Banchereau *et al.*, 2000)



Die DCs bzw. ihre Vorläufer befinden sich entweder als „stationäre“ Zellen im Gewebe oder zirkulieren im Blut und monitoren ständig ihre Umgebung. Unreife (immature) DCs und ihre Vorläufer reagieren sehr empfindlich auf ihre Mikroumgebung, vor allem Zytokine (Woltman *et al.*, 2003) und inflammatorische Produkte. Da die DCs vorwiegend vom Endothel nicht-lymphatischer Gewebe mit deren konstitutiv oder inflammatorisch exprimierten Liganden angezogen werden (siehe Abbildung 6 und „Adhäsion und Transmigration von Lymphozyten an das Endothel“), spielt in diesem Zusammenhang die Interaktion des DC spezifischen Adhäsionsmoleküls DC-SIGN mit dem endothelialen ICAM-2 eine wichtige Rolle (van Kooyk *et al.*, 2002).

Abbildung 6: Die Dendritische Zelle und ihre wichtigsten Adhäsions- und kostimulatorischen Moleküle (nach Vorlage von (Janeway CA, 1995))



Im immaturren Stadium besitzen die DCs die höchste Fähigkeit Antigene über Makropinozytose, rezeptor-gebundene Endozytose und Phagozytose aufzunehmen. Die aufgenommenen Antigene können über zwei verschiedene Wege in Peptide prozessiert werden. Das Antigen wird entweder über den endosomal, lysosomalen Weg verarbeitet und die Peptide werden anschließend an MHC-2 Moleküle gebunden. Exogene Antigene können im Zytosol freigesetzt und über nicht-lysosomale Proteasen zu Peptiden prozessiert werden. Diese Peptide werden zum endoplasmatischen Retikulum transportiert und dort an MHC-1 Moleküle gebunden. Die MHC-Peptid Komplexe werden an die Zelloberfläche transportiert und der Umgebung präsentiert. Im Laufe der Reifung der DCs nimmt die Kapazität Antigene aufzunehmen immer mehr ab, während die Fähigkeit zur T-Zell Aktivierung u.a. durch gesteigerte Expression von kostimulatorischen Molekülen stetig steigt. Gleichzeitig wandern DCs mit fortschreitender Reifung in die lymphatischen Organe, vorwiegend Lymphknoten und Milz (siehe Abbildungen 7 und 8). Dies ist eine Folge der geänderten Expressierung von

Rezeptoren und Liganden, die vor allem auf lymphatische Organe anspricht (Hackstein *et al.*, 2004).

Abbildung 7: DC Migration, Antigenaufnahme und T-Zellaktivierung (van Kooyk *et al.*, 2002)

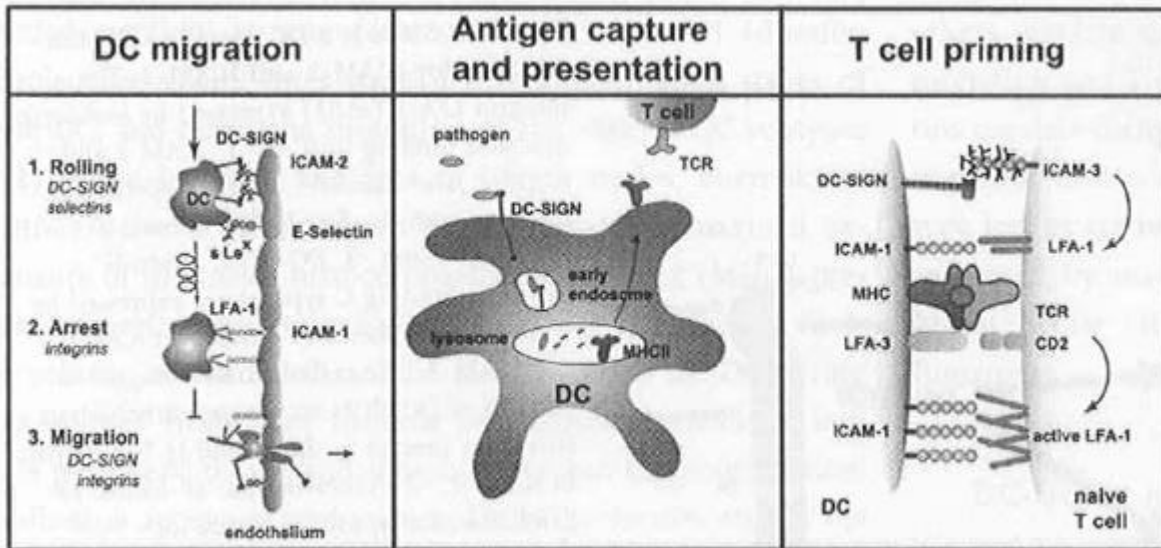
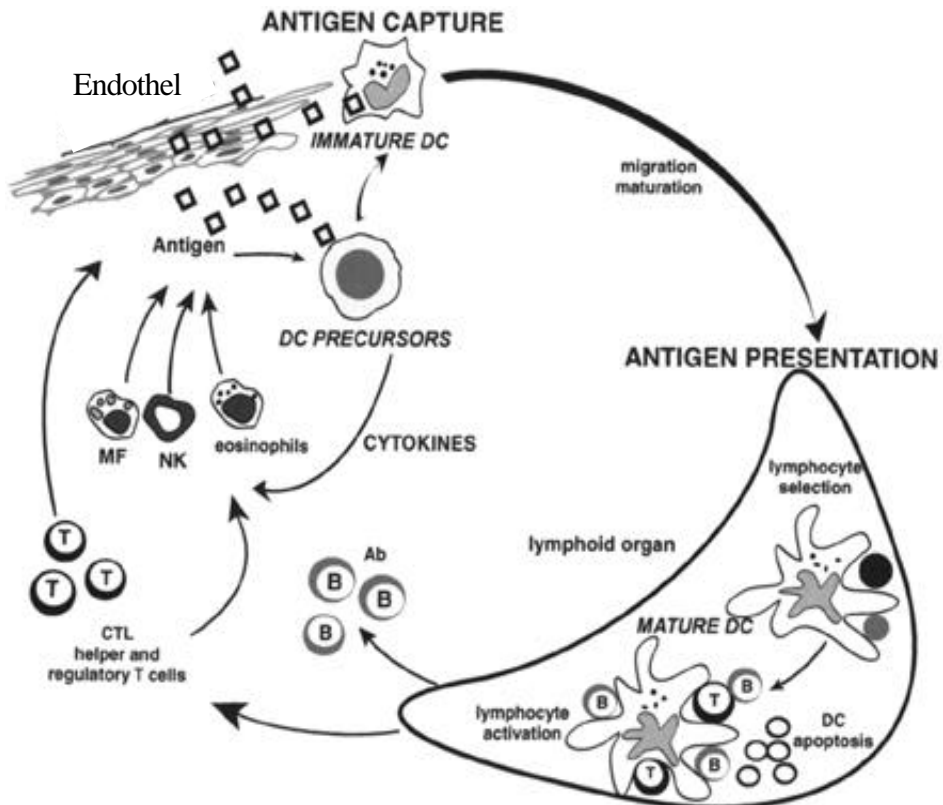
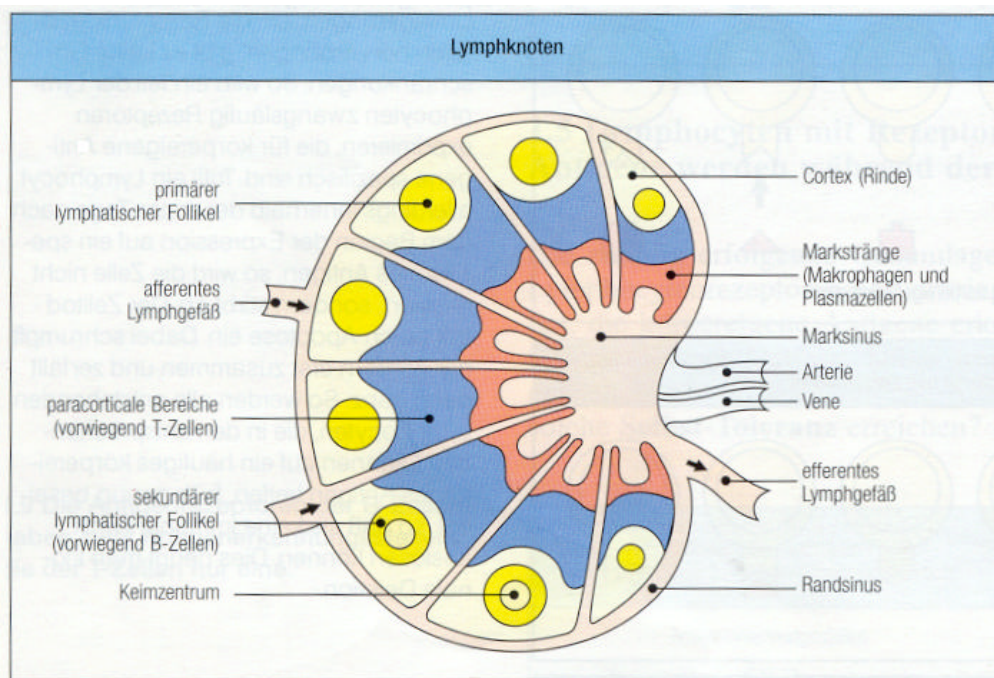


Abbildung 8: Vom DC Vorläufer zum murenen DC (Banchereau *et al.*, 2000)



In den T- Zell Regionen (siehe Abbildung 9) der Lymphknoten werden die naiven T-Lymphozyten über Zytokine zu den DCs gelockt, um eine maximale Darbietung des MHC-Antigen Komplexes an das T-Zell Rezeptor Repertoire zu erreichen. Auch die B-Lymphozyten in den sekundär lymphatischen Follikeln (siehe Abbildung 9) können durch den MHC-Antigen Komplex der DCs aktiviert werden. Im Lymphknoten sterben dann letztendlich die DCs durch Apoptose ab (siehe Abbildung 8).

Abbildung 9: Aufbau eines Lymphknotens mit Bereichen der naiven T- und B- Lymphozyten (Janeway CA, 1995)



Die Funktion und Lebensdauer der reifen (maturen) DCs hängen stark mit dem Verlauf ihrer Reifung und der Art des Stimulus zusammen (Granucci *et al.*, 2004), jedoch besteht auch eine starke Prägung durch den jeweiligen DC-Vorläufer. So aktivieren beispielsweise plasmazytoide DC vor allem T-2 Helferzellen (=Th2), während die myeloiden DC vermehrt T-1 Helferzellen aktivieren (= Th1), (siehe Abbildung 10 und 11); je nach Aktivierung kommt es somit zu unterschiedlichen Immunantworten.

Abbildung 10: Der Unterschied zwischen myeloiden und lymphoiden DCs
(Gluckman *et al.*, 2002)

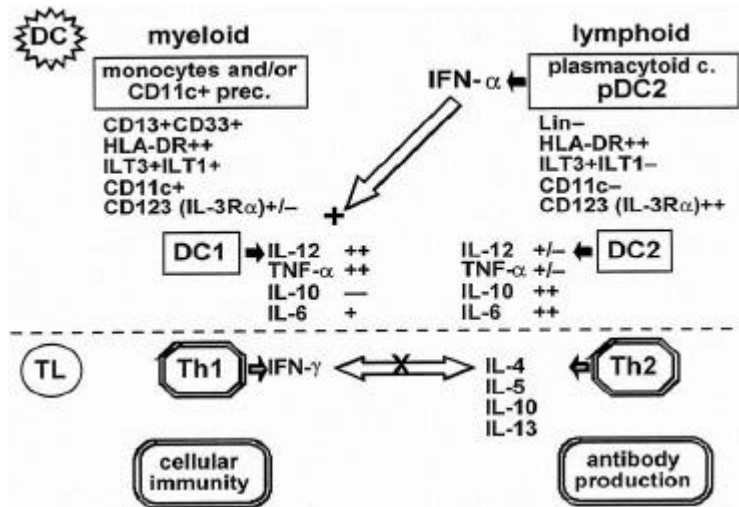
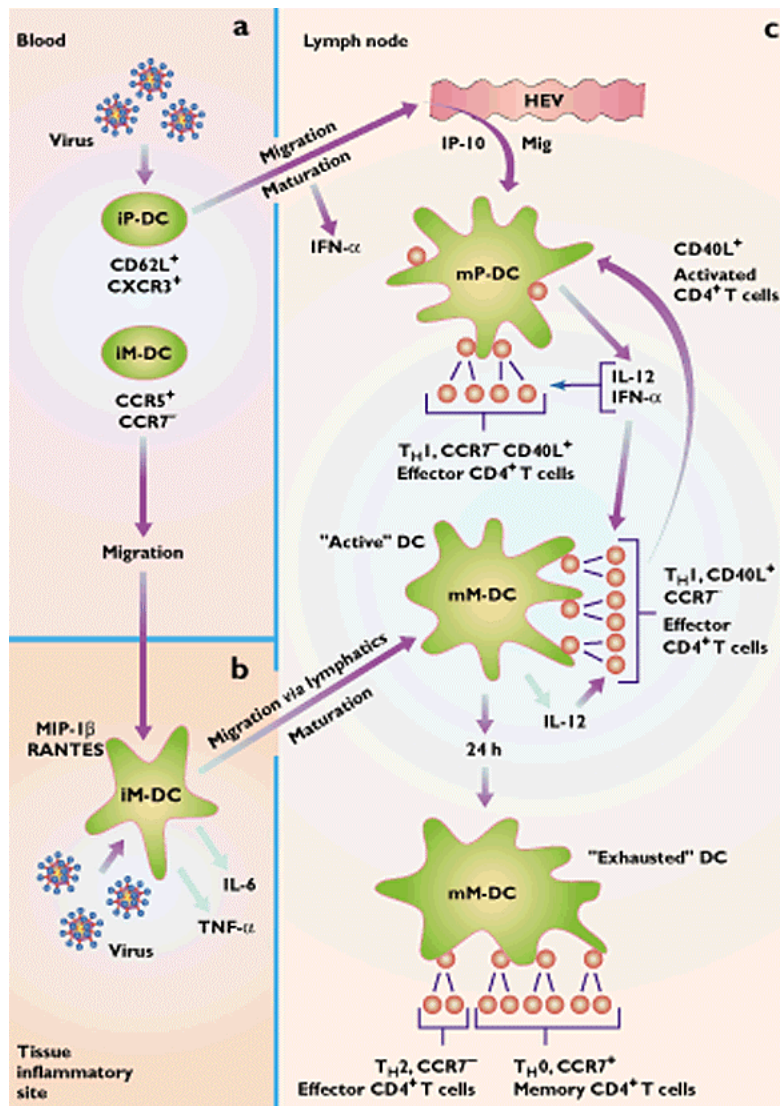


Abbildung 11: Plasmazytoide und myeloide DC und ihre T-Zell Aktivierung

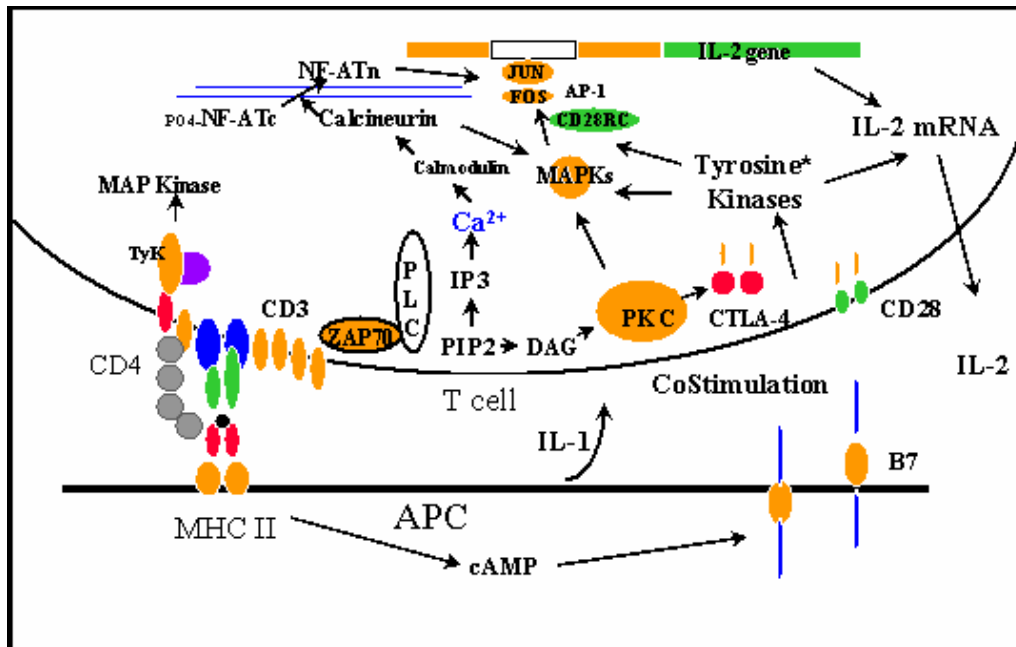
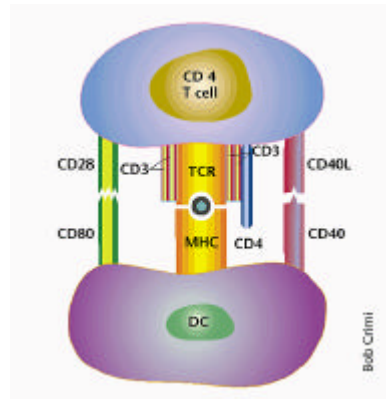


1.2.2.2. Die T-Lymphozyten Aktivierung

Jeder T-Lymphozyt erzeugt durch Umlagerung seiner Rezeptorgene einen einzigen, spezifischen Rezeptortyp (= Monospezifität). Durch die kombinatorische Diversität werden von der gesamten T-Lymphozyten-Population jedoch über 10^6 unterschiedliche Rezeptoren exprimiert. Da hierbei auch Rezeptoren für körpereigene Antigene exprimiert werden, sterben T-Lymphozyten, die während ihrer Entwicklung mit dem entsprechenden Antigen in Berührung kommen, durch Apoptose ab. Durch diese klonale Deletion wird die zentrale Selbsttoleranz erreicht. Die Voraussetzungen zur T-Zellaktivierung stellen einen weiteren Schutzmechanismus zum Erhalt der Selbsttoleranz dar. So kann die Aktivierung eines naiven T-Lymphozyten nur durch die Präsentation des spezifischen Antigens auf dem MHC-Komplex der antigenpräsentierenden Zelle mit einem zusätzlichen kostimulierenden Signal erfolgen. Ein Antigenkontakt ohne kostimulierendes Signal führt zu einer irreversiblen Inaktivierung des T-Lymphozyten. Dieser Effekt kann auch durch eine stark erhöhte MHC-Antigenkomplexdichte desselben Antigens auf der Antigen-präsentierenden Zelle erreicht werden. Zudem existieren Suppressor T-Lymphozyten, die Toleranz erzeugen. Weiterhin können die T-Lymphozyten in zwei verschiedene Subtypen eingeteilt werden: die CD4 positiven T-Zellen (= T-Helferzellen) werden durch den MHC-2- Antigenkomplex aktiviert, während die CD8 positiven T-Zellen (= zytotoxische T-Zellen) Kontakt zu einem MHC-1- Antigenkomplex benötigen (Janeway CA, 1995).

Bei erfolgreicher Aktivierung eines T-Lymphozyten laufen folgende Prozesse ab (siehe Abbildungen 12): Die Bindung des MHC-Antigen-Komplexes an den T- Zell Rezeptor setzt verschiedene Signalkaskaden in Gang, welche die Transkriptionsfaktoren NF-AT (über Calcineurin) und AP-1 aktivieren, was wiederum zu einer Expression von IL-2 RNA führt. Die zusätzlichen kostimulierenden Signale führen zu einer Stabilisierung der IL-2 RNA, wodurch die Haltbarkeit und damit Ablesbarkeit der RNA enorm gesteigert wird. Nach Expression des IL-2 Proteins bindet dieses an den IL-2 T-Zell-Autorezeptor, der über eine weitere Signalkaskade auf den Zellzyklus wirkt und die Proliferation der entsprechenden T- Zelle in Gang setzt.

Abbildungen 12: T-Zell Aktivierung von C.M. Yuan und Bob Crimi

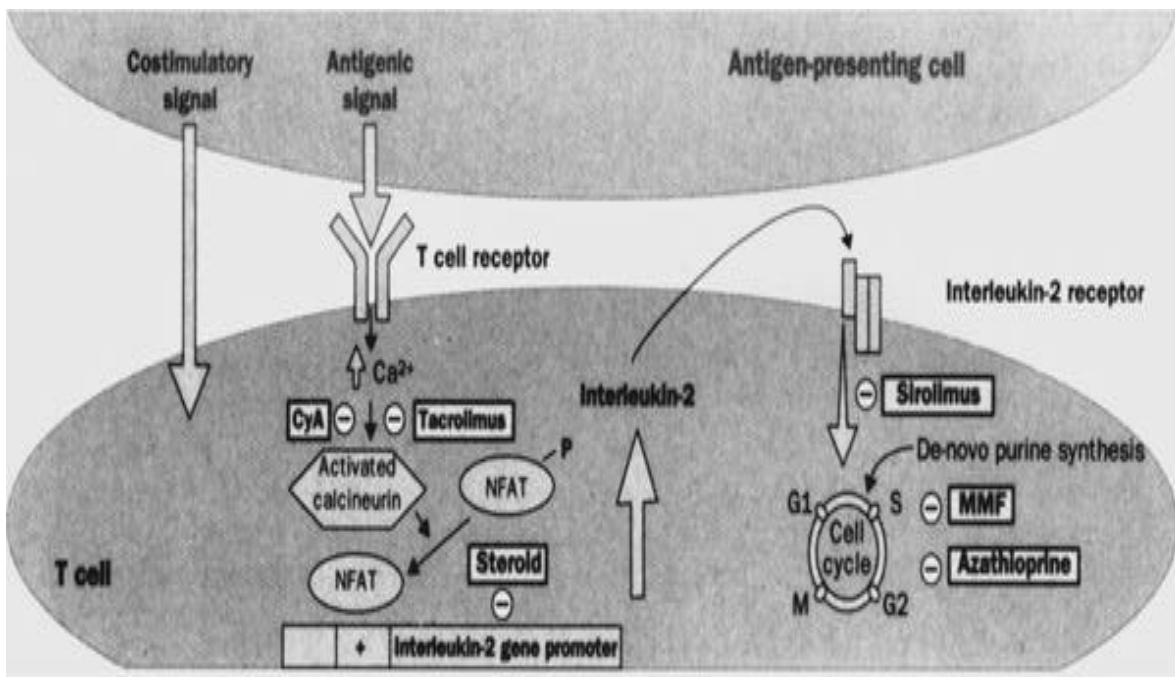


1.2.3. Immunsuppressiva

Damit das transplantierte Organ nicht durch die oben geschilderten Immunreaktionen zerstört wird, ist es notwendig, direkt nach der Transplantation mit der Immunsuppression, die diese Immunantworten unterdrückt, zu beginnen. Diese Therapie muss meist lebenslang fortgeführt werden.

Die klinisch relevanten Immunsuppressiva haben unterschiedliche Wirkungsweisen, welche letztlich stets eine Hemmung der klonalen Expansion der T-Lymphozyten bzw. der Effektorzellen bewirken (siehe Abbildung 13). Die verschiedenen Substanzen können in aktivierungshemmende Substanzen, zytotoxische Substanzen und Antikörper unterteilt werden. Meist werden für eine optimale Therapie geeignete Kombinationen der Immunsuppressiva eingesetzt.

Abbildung 13: Hemmung der T-Zell Aktivierung durch Immunsuppressiva (Costanzo, 2001)



1.2.3.1. Methylprednisolon

Dieses aktivierungshemmende Glukokortikoid bindet an den spezifischen zytosolischen Rezeptor. Der Komplex hemmt verschiedene Transkriptionsfaktoren wie z.B. Nucleus factor κ B (NF κ B) und ändert die mRNA Synthese von 50-100 Proteinen, unter anderem der Zytokine Interleukin-1 und -2 (siehe Abbildungen 12 und 13 oben) und hat damit eine starke Wirkung auf zelluläre Immunreaktionen. Leider treten hier (dosisabhängig) vor allem nach

längerfristiger Medikation erhebliche Nebenwirkungen wie gestörte Glukosetoleranz, Bluthochdruck und Niereninsuffizienz auf. Einige dieser Nebenwirkungen gelten als Risikofaktoren für Arteriosklerose und begünstigen daher eine Entwicklung dieser Herzerkrankung (Czock *et al.*, 2005; Forth W, 2004).

1.2.3.2. Mycophenolat Mofetil

Die zytotoxische Substanz Mycophenolat Mofetil bzw. deren aktiver Metabolit Mycophenolsäure hemmt über die Inosinmonophosphat-Dehydrogenase die de-novo- Purinbiosynthese, wodurch die Proliferation gehemmt wird. Andere Zellen verfügen über die Möglichkeit Purine in ihren Stoffwechsel einzuschleusen und besitzen dadurch eine geringere Empfindlichkeit als Lymphozyten. Somit besteht bei Mycophenolat Mofetil eine gewisse Selektivität auf T – und B – Lymphozyten. Weiterhin unterdrückt Mycophenolat Mofetil die humorale Antwort der B - Lymphozyten. Häufige Nebenwirkungen sind hier Übelkeit, Durchfall und Erbrechen, wobei Mycophenolat Mofetil auch zu allgemeiner Knochenmarksdepression mit Anämien und Leukopenien führen kann. Diese Substanz kann nicht als alleinige Therapie, sondern nur in Kombination mit anderen Immunsuppressiva verwendet werden (Forth W, 2004).

1.2.3.3. Cyclosporin A

Das wasserunlösliche, zyklische Decapeptid aus dem Bodenpilz *Tolypocladium inflatum* wird zusammen mit Tacrolimus als Calcineurinhemmer bezeichnet. Die Bindung von Cyclosporin an das Immunophilin Cyclophilin führt zur Bildung eines Komplexes, der wiederum an die Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin bindet. Damit wird die Aktivierung der Phosphatase durch erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} Spiegel als Folge einer T-Rezeptor –Ligand Bindung blockiert. Zytosolische Komponenten des Nucleus factor activated T-cells (NF-AT) können nicht mehr dephosphoryliert werden und dies wiederum führt zu einer Unterbrechung der Signalkaskade über Verhinderung der Transkription der Gene von NF-AT, unter anderem IL-2 und CD40L. Da auch andere Zelltypen Immunophiline besitzen, besteht eine der Nebenwirkungen des Cyclosporin in starker Toxizität vor allem auf die Nieren, aber auch auf andere Organe. Weiterhin können Hautveränderungen und Lymphome, sowie neurologische Symptomatik wie Krämpfe und Tremor auftreten. Zudem können auch arteriosklerotische Risikofaktoren wie Hyperlipidämie und Bluthochdruck durch Cyclosporin A vermehrt ausgelöst werden (Keogh, 2004) .

1.2.3.4. Tacrolimus

Das nicht mit Cyclosporin verwandte Macrolid Antibiotikum wurde 1984 entdeckt und wird von *Streptomyces tsukabaensis* produziert. Der Wirkmechanismus entspricht weitgehend dem des Cyclosporin, wobei die Hemmung des Calcineurin durch den Substanz –FK binding protein 506 Komplex erfolgt. Tacrolimus ist ca. 50-100 fach potenter als Cyclosporin und zeigt ein ähnliches Nebenwirkungsprofil .

1.2.3.5. Rapamycin

Dieses Peptid, auch Sirolimus genannt, wurde 1975 erstmals aus einer Bodenprobe mit *Streptomyces hygroscopicus* isoliert und ähnelt chemisch dem Tacrolimus. Rapamycin bindet wie Tacrolimus an FK binding protein 506; damit konkurrieren die beiden Immunsuppressiva um dieselbe Bindungsstelle. Im Gegensatz zu Tacrolimus hemmt der Komplex nicht die Calcineurinaktivität, sondern inhibiert den „mammalian target of rapamycin (mTOR)“ Signalweg. Damit wird letztendlich auch die Phosphorylierung von p70S6K und PHAS-1 verhindert, die die Progression der G1 Phase des Zellzyklus unterstützt. Rapamycin wirkt im Gegensatz zu Cyclosporin und Tacrolimus nicht auf die IL-2 Synthese, sondern inhibiert den IL-2/IL-2 Rezeptor Signalweg. Eine weitere Wirkung von Rapamycin besteht in der Hemmung von TNF α , was die Proliferation und Migration von vaskulären glatten Muskelzellen inhibiert.

1.3. HYPOTHESE, ZIELSETZUNG UND AUFGABENSTELLUNG

Die Endothelaktivierung kann im Langzeitverlauf nach Herztransplantation zu einer Endotheldysfunktion mit folgender chronischer Transplantatabstoßung (Transplantatvaskulopathie) führen. Wie oben ausgeführt können verschiedene Faktoren zu einer Endothelaktivierung im Transplantat führen. Klinische Beobachtungen weisen auf einen Zusammenhang zwischen immunsuppressiver Therapie und Auftreten der Transplantatvaskulopathie hin.

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass Qualität und Quantität der Immunsuppressiva die Endothelzellfunktion maßgeblich beeinflussen.

Daher war es das Ziel dieser Arbeit, die Auswirkungen von Art und Dosis verschiedener Immunsuppressiva auf relevante Endothelzell-Eigenschaften unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen zu untersuchen. Die Hypoxie/Reoxigenierung wurde gewählt, um den zusätzlichen Einfluss der Ischämie und Reperfusion auf das Wirkungsprofil der Substanzen zu integrieren.

Es erfolgten Untersuchungen zum Einfluß von Immunsuppressiva auf endothelialen oxidativen Stress, Endothelzellapoptose, Endothelzellproliferation, NO- Produktion und ET-1 Freisetzung. Da mit einer Endothelzellaktivierung meist eine erhöhte Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen einher geht, sollte weiterhin die Beeinflussung der Endothelzell- und Dendritischen Zell -Interaktion in Form von Adhäsion durch immunsuppressive Stimulation untersucht werden. Abschließend sollte eine Charakterisierung der Dendritischen Zell-Aktivierung unter immunsuppressivem Einfluss durchgeführt werden.

2. Material und Methoden

2.1. GERÄTE

Barnstaed NANOpure UV ultrapure water system
BDK Laminar Air flow Werkbank (Nr.57.3)
Bosch Automatik Kühlschrank
Eppendorf Centrifuge 5804 mit Ausschwingrotor
FACScan, Becton Dickinson
Heraeus Hybridisierungssofen
Hettich Zentrifuge Mikro 22R
Hypoxia/Tissue culture incubator, Billups-Rothenberg Inc. Del Mar California
Kendro HFU/HFC -80°C Kühlschrank
Messer Griessheim Flüssigstickstoffcontainer
Nunc Inkubator Serie 300
Tecan Genios Fluoreszenzreader, Photometer, Chemilumineszenzreader Kombigerät
Kisker MiniRocker MR-1
VWR Wasserbad mit Badgefäß und Einhängethermostat
Zeiss Axiovert 200 Fluoreszenzmikroskop
Invitrogen Elektrophoresekammer Haricon 58
Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700
BioRad Power PAC 300 bzw. 3000 für Elektrophorese
BioRad Gel Doc 2000 mit Quantity One Software 4.1.1
BioRad Fluor-S MultiImager

Wichtige Verbrauchsmaterialien:

Falcon T225 Zellkulturflaschen (35 3138)
Falcon T75 Zellkulturflaschen (35 3136)
Falcon T25 Zellkulturflaschen (35 3108)
Falcon Petrischalen (35 1029)
Falcon transparente 96-well Platten (35 3072)
Corning Costar weisse 96-well Platten (3917)
Corning Costar schwarze 96-well Platten (3916)
Falcon 15 ml Röhrchen (35 2096)
Falcon 50 ml Röhrchen (35 2070)
Nalgene Nunc Lab-Tek II Chamber Slide System 4 well glass slide (154526)
Nalgene Nunc Lab-Tek II Chambered 1.2 Coverglass System 4 chamber (155382)
Sartorius Minisart Plus Spritzenaufsatzfilter 0,2 µm (17823)
Nalgene Nunc CryoTube vials (363401)

2.2. DIE IMMUNSUPPRESSIVEN SUBSTANZEN

2.2.1. Konzentrationen und Lösung der Immunsuppressiva

Die Substanzen 6α-Methylprednisolon (MP; Sigma Taufkirchen; M-0639), Mycophenolsäure (MMF; Sigma Taufkirchen; M-3536) und Rapamycin (Rapa; Sigma Taufkirchen; R-0395) wurden vor jedem Versuch, aufgrund der begrenzten Haltbarkeit (Datenblatt der

Substanzen), frisch in Methanol vorgelöst und anschließend in Vollmedium auf die entsprechenden Konzentrationen eingestellt. Der Endkonzentration des Methanols betrug < 1,5 ‰. Cyclosporin A (CS; Novartis Nürnberg; Infusionslösungskonzentrat Sandimmun) und Tacrolimus (Tac; Fujisawa München, Infusionslösungskonzentrat Prograf) wurden direkt aus den Infusionslösungskonzentraten (für die Anwendung am Menschen) in Vollmedium auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnt. Beide Infusionskonzentrate enthalten Ethanol, welcher in den Endkonzentrationen mit < 1 ‰ vorlag.

Die Immunsuppressiva wurden in zwei Konzentrationen eingesetzt, die der Dosierung [area under the curve, (Armstrong *et al.*, 2001)] in der Frühphase nach der Operation und der langfristigen Erhaltungsdosierung entsprechen (Scheld HH, 2001). Dem entsprechend ergaben sich Konzentrationen von 10 und 100 μM (= 3,745 und 37,45 $\mu\text{g/ml}$) für MP; 10 und 50 μM (= 3,203 und 16,015 $\mu\text{g/ml}$) für MMF; 0,5 und 1 $\mu\text{g/ml}$ für CS; 50 und 100 pM (= 45,71 und 91,42 pg/ml) für Rapa und 20 und 50 ng/ml für Tac.

Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle Versuche mit beiden Konzentrationen aller aufgeführten Immunsuppressiva durchgeführt.

2.3. IMMUNSUPPRESSIVA UND ENDOTHELFUNKTION

2.3.1. Kultivierung und Passage der Zelllinie humaner mikrovaskulärer Endothelzellen (HMEC-1)

Material:

Humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie (HMEC-1, NIH, Dept.of Microbiology, USA)

MCDB 131 ohne Phenolrot (cc pro Neustadt/W; FM-70-L)

Fötales Kälberserum FCS Clone (PAA Laboratories Deutschland, Cölbe; A-15-041)

Hydrocortisone (Sigma Taufkirchen; H-0888)

Epidermal Growth Factor EGF (Sigma Taufkirchen; E-9644)

L-Glutamine (Biochrome AG Berlin; K 0283)

PBS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} (Biochrom AG Berlin; L 1825)

Trypsin / EDTA in PBS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} (Biochrom AG Berlin, L 2143)

Trypanblau 0,5 % (Biochrom AG Berlin, L 6323)

Beschreibung der Zelllinie:

Für die Untersuchung der Endothelfunktion wurde die humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie HMEC-1 verwendet, welche typische Endothelzeleigenschaften erkennen lässt (u.a. konfluenter Monolayer mit Pflasterstein-Morphologie, Expression und Sekretion des von Willebrand Faktors und Aufnahme von acetyliertem LDL) und sich wie primäre mikrovaskuläre Endothelzellen verhält (Ades EW, 1992). Durch Transfektion mit dem

SV40A, large T antigen enthaltenden PBR-322 basierten Vektor wurden die humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen immortalisiert und exprimieren die für Endothelzellen typischen Oberflächenmoleküle wie CD31, CD36, ICAM-1 und CD44, nach Stimulation mit Interferon γ auch MHC II (Ades et al, 1992).

Kultivierung:

Die HMEC-1 wurden in phenolrotfreiem MCDB-131 mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 $\mu\text{g/ml}$ Hydrokortison und 10 ng/ml Epidermal Growth Factor bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert (Bonney A, 2001) und bis maximal zur 30. Passage für die Versuche verwendet. Drei mal die Woche wurde das Medium gewechselt, mindestens einmal die Woche wurden die Zellen 1: 4 bis 1: 6 passagiert. Frisch aufgetaute Zellen konnten frühestens nach 10 Tagen Kultivierung für die Versuche verwendet werden.

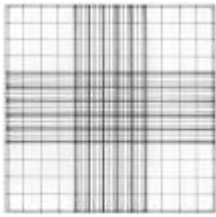
Passage der HMEC-1:

Der Überstand der Zellkulturflaschen wurde verworfen, die adhären Zellen am Flaschenboden mit 5 bis 10 ml PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Nach Inkubation bis zu 5 min. bei Raumtemperatur (Sichtkontrolle unter dem Mikroskop) und leichtes Klopfen an den Flaschenrand zum Ablösen der Zellen, wurde die Trypsinwirkung durch Zugabe von 5 ml Vollmedium abgestoppt. Das Trypsin/Medium-Gemisch wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt und anschließend für 5 min. bei 260 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Vollmedium resuspendiert und im gewünschten Verhältnis in neue Flaschen mit frischem Medium ausgesät.

Zellzählung mit Trypanblau:

25 μl der Zellsuspension wurden mit 25 μl Trypanblau gut gemischt, etwa 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die Neubauer Zählkammer aufgetragen (siehe Abbildung 14). Die vier äußeren Felder wurden jeweils auf „blaue“ (tote) und „weiße“ (lebende, intakte) Zellen ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Die toten Zellen erscheinen aufgrund einer Dysintegrität der Membran mit folgendem Trypanblau Einstrom blau, während das Trypanblau nicht in die intakten Zellen eindringen kann.

Abbildung 14: Die Neubauer Zählkammer



Der Mittelwert aus den vier Eckfeldern wurde mit dem Verdünnungsfaktor (Trypanblau) und dem Kammer-volumen (Fläche x Höhe) von 10.000 multipliziert, um die entsprechende Zellzahl pro ml zu erhalten.

Versuchsvorbereitung und Durchführung der Hypoxie bzw. Normoxie

Je 15.000 HMEC-1 in 100 μ l pro well wurden in transparente, weiße und schwarze 96-well Platten ausgesät und 20-24 h bei 37 °C / 5 % CO₂ bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit den entsprechenden Konzentrationen der Immunsuppressiva stimuliert; als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Die entsprechenden Platten wurden in die Hypoxiekammer gestellt, durch 15 min. N₂ Einleitung eine Hypoxie (~ 5% O₂ Gehalt) in der Hypoxiekammer erzeugt und für 16 h beibehalten. Die Versuchsdurchführung fand zu zwei Zeitpunkten statt: direkt nach der Hypoxie bzw. Normoxie und nach einer Reoxigenierung von weiteren 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Normoxieplatten wurden für dieselbe Zeitspanne bei 37 °C und 5 % CO₂ ohne Hypoxie kultiviert.

2.3.2. Oxidativer Stress (in weißen Platten)

Material:

CM- H₂DCFDA (Molecular Probes über MoBiTech Göttingen, C-6827)

Dimethyl Sulfoxide DMSO (Sigma Taufkirchen, D-8418)

Methanol (Merck Darmstadt, 1.06009.2500)

KOH (VWR international-Merck, Darmstadt, 159222)

Salzsäure 25% (Merck Darmstadt, 1000 332 2328816)

H₂O₂ (Merck Darmstadt, 1.08597.1000)

Bidestilliertes H₂O

MCDB 131 ohne Phenolrot (cc pro Neustadt/W; FM-70-L)

Fötales Kälberserum FCS Clone (PAA Laboratories Deutschland, Cölbe; A-15-041)

Zubereitung der DCFDA-Lösung:

- 50 μ g CM- H₂DCFDA (= 1 Röhrchen) + 50 μ l DMSO, vortexen und kurz anzentrifugieren
- + 50 μ l Methanol, vortexen und kurz anzentrifugieren
- + 25 μ l 2 M KOH, vortexen und 1-2 h bei 4°C inkubieren
- kurz anzentrifugieren und mit 2 N HCl den pH-Wert auf 7 einstellen.

Jedes Röhrchen wurde mit 50 μ M H₂O₂ auf Fluoreszenz getestet.

Prinzip des Testsystems:

CM-H₂DCFDA ist ein membrandurchgängiger Indikator für reaktive Sauerstoffverbindungen und nahezu nicht fluoreszierend. Durch Abspaltung der Acetatgruppen von intrazellulären Esterasen und Oxidation des DCFDA innerhalb der Zelle entsteht der Fluoreszenzfarbstoff, der quantitativ über die Fluoreszenz gemessen werden kann.

Durchführung:

Die frisch angesetzte DCFDA-Lösung wurde mit MCDB 131 + 1% FCS auf 25-30 µM eingestellt und für die gesamte Anzahl von benötigten wells hergestellt. Der Überstand der entsprechenden wells auf den weißen Platten wurde verworfen und einmalig mit je 200 µl MCDB 131 (ohne Phenolrot und ohne FCS) gewaschen. Nachdem je 100 µl des frisch zubereiteten DCFDA-Mediums auf die wells aufgetragen wurde, folgte eine Inkubation von 30 min. bei 37°C und 5% CO₂ und anschließend die Messung im Fluoreszenzreader bei 485 nm Exzitation und 535 nm Emission (Wang H, 1999).

2.3.3. Apoptose (in weißen Platten)

Material:

Vybrand Apoptosis Assay Kit 2# (Molecular Probes über MoBiTech Göttingen, V13241)

PBS w/o Ca²⁺, Mg²⁺ (Biochrom AG Berlin; L 1825)

Bidestilliertes H₂O

Zubereitung der benötigten Lösungen:

- 1 x Annexin binding buffer wurde mit dem 5 x Annexin binding buffer und der entsprechenden Menge bidestilliertem Wasser frisch angesetzt (1:5).
- Das Propidium Jodid wurde von der gelieferten Konzentration 1 mg/ml mit 1 x Annexin binding buffer auf 100 µg/ml verdünnt (1:10).

Prinzip des Testsystems:

In normalen Zellen befindet sich Phosphatidylserin nur innerhalb der nach innen gekehrten Schicht der Doppelmembran. Im frühen Stadium der Apoptose jedoch findet eine Verlagerung nach außen statt. Die Bindung von FITC-gekoppelten Annexin V an Phosphatidylserin wird in diesem Test zur Quantifizierung der Apoptose verwendet. Nachdem jedoch die Dysintegrität der Membran von nekrotischen Zellen auch einen Annexin Einstrom zur Folge hat (und damit ungewollterweise eine Färbung von „innen“), müssen gleichzeitig nekrotische Zellen über eine Propidiumjodid Färbung des Zellkerns (DNA) ausgeschlossen werden.

Durchführung:

Die Gesamtmenge für alle wells wurde mit je 5 µl Annexin und je 5 µl vorbereitete Propidiumjodid – Lösung (100µg/ml) auf je 100 µl 1 x Annexin binding buffer pro well hergestellt. Nachdem die entsprechenden wells auf der weißen Platte mit je 200 µl kaltem PBS gewaschen und anschließend je 100 µl der fertigen Mischung aufgetragen wurde, folgte eine Inkubation von 15 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln (da lichtempfindlich). Danach wurde der Überstand der wells entfernt, die wells mit je 200 µl 1 x Annexin binding buffer gewaschen und die leeren wells sofort für Annexin FITC bei 485 nm (Exzitation) und 535 nm (Emission) und für Propidiumjodid bei 535 nm (Exzitation) und 620 nm (Emission) im Fluoreszenzreader gemessen. Je Platte wurden als Negativkontrollen wells mit 1x Annexin binding buffer auf Zellen, ohne Zellen und fertige Mischung (mit Annexin-FITC und Propidiumjodid) ohne Zellen mitgeführt.

2.3.4. Metabolische Aktivität (in transparenten Platten)

Material:

Cell Proliferation Assay System, Premix WST-1 (TaKaRa über Mobitec Göttingen, MK400)

Prinzip des Testsystems:

WST-1 ist ein Tetrazolium Salz, dass durch mitochondriale Dehydrogenasen zu einem Formazan Farbstoff umgewandelt wird. Dieser Farbstoff ist wasserlöslich und kann photometrisch gemessen werden. Die mitochondrialen Dehydrogenasen sind jedoch nicht nur durch gesteigerten Energiebedarf während der G1 Phase des Zellzyklus für die Proteinsynthese erhöht, sondern bei jeglicher Proteinsynthese. Auch bei der Stressantwort findet als Kompensationsmechanismus eine gesteigerte Proteinsynthese, z.B. unter anderem von Hitzeschockproteinen statt, die zu einer Erhöhung der mitochondrialen Dehydrogenasen führt. Es sollte außerdem nicht vergessen werden, dass jede Zelle ihre Anzahl von Mitochondrien regulieren kann.

Durchführung:

Zum entsprechendem Zeitpunkt wurden mit einer Multipette je 10 µl /well des WST-1 Premix in die entsprechenden wells zugegeben und durch leichtes Klopfen an den Plattenrand verteilt. Nach einer Inkubation von 3 h bei 37°C und 5% CO₂ wurde bei 450 nm und 690 nm Referenz photometrisch gemessen.

2.3.5. Proliferation (in transparenten Platten)

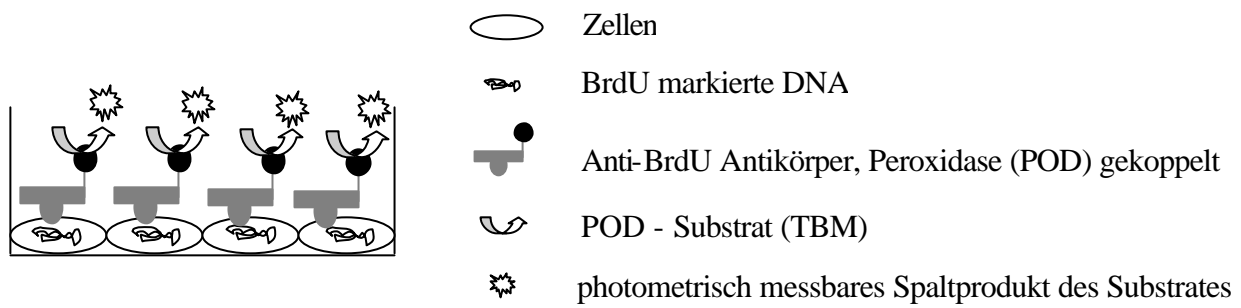
Material:

Cell Proliferation ELISA BrdU colorimetric (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, 1 647 229)

Prinzip des Testsystems:

Das Pyrimidinanalog BrdU wird von den Zellen aufgenommen und statt Thymidin in die proliferierende Zelle eingebaut. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen kann mittels BrdU –Antikörper der Einbau des BrdU, der nur bei Replikation erfolgt, markiert und über enzymatische Substratspaltung quantitativ sichtbar gemacht werden (Abbildung 15).

Abbildung 15: Das Prinzip des BrdU-ELISAs



Durchführung:

Das BrdU wurde nach 8h Reoxygenierung auf die mit Immunsuppressiva stimulierten Zellen gegeben und die Zellen für 16 h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Anschließend wurde nach Gebrauchsanweisung verfahren.

2.3.6. Endothelin-1 (ET-1)

Material:

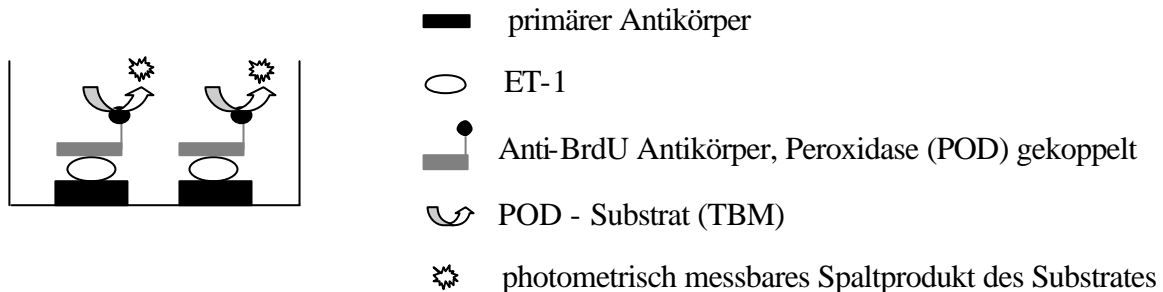
Human Endothelin-1 EIA (Assay Design über Biotrend Köln, 900-020)
Bidestilliertes H₂O

Prinzip des Testsystems:

Die Oberfläche der in dem Kit mitgelieferten wells ist mit einem spezifischen polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen ET-1 beschichtet. Nach Auftragen des Zellüberstandes oder des Zelllysates bindet ET-1 an diesen Antikörper. Der zweite, Enzym-gekoppelte monoklonale Antikörper gegen ET-1, diesmal aus der Maus, bindet an einem anderen Bereich des Proteins.

Über enzymatische Substratspaltung werden im Vergleich zum ET-1 Standard quantitative Aussagen über die ET-1 Menge der Probe möglich (Abbildung 16).

Abbildung 16: Das Prinzip des ET-1 ELISAs



Durchführung:

Der Überstand der entsprechenden wells wurde abgenommen und bei -80°C für den ET-1 EIA eingefroren. Für die Durchführung wurde genau nach Gebrauchsanweisung verfahren, wobei je $25\ \mu\text{l}$ der Probe in den EIA eingesetzt wurden.

2.3.7. NO (in schwarzen Platten)

Material:

DAF-2 DA (Alexis Deutschland GmbH Grünberg, 620-056-M001)

L-NAME (Alexis Deutschland GmbH Grünberg, 105-003-G005)

Krebs-Ringer-Phosphat Puffer:

120 mM NaCl (Merck Darmstadt, 1.06404.0500)

4,8 mM KCl (Merck Darmstadt, 1.04933.0500)

0,54 mM CaCl_2 Dihydrat (Merck Darmstadt, 142000)

1,2 mM MgSO_4 (Merck Darmstadt, 1.05886.0500)

11 mM D-Glucose (Sigma Taufkirchen, G-7528)

15,9 mM Na_2HPO_4 (Merck Darmstadt, 1.03095.0500)

Bidestilliertes H_2O

PH 7,2

Zubereitung der benötigten Lösungen:

Der Krebs-Ringer-Puffer wurde nach obigem Rezept hergestellt und anschließend steril filtriert (Kojima, 1998). Damit wurde jeweils frisch eine $10\ \mu\text{M}$ DAF-2 DA Lösung angesetzt (vor Licht geschützt).

Prinzip des Testsystems:

DAF-2 DA ist eine zellpermeable Substanz, die durch intrazelluläre Esterasen zu nicht permeablen DAF-2 hydrolysiert wird. DAF-2 reagiert mit NO und O₂ zu dem fluoreszierenden DAF-2 T, das quantitativ über einen Fluoreszenzreader gemessen werden kann. Dieses Testsystem misst die Gesamtmenge des intrazellulären NO und ist nicht zur Unterscheidung der Aktivität von eNOS oder iNOS geeignet.

Durchführung:

Die entsprechenden wells auf den schwarzen Platten wurden mit je 200 µl Krebs-Ringer-Puffer gewaschen, dann je 100 µl der frisch zubereiteten DAF-2 DA Lösung aufgetragen und für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert (Kojima et al, 1998). Nach Ablauf der Inkubation wurden die Platten sofort bei 485 nm Exzitation und 535 nm Emission gemessen. Als Kontrollen dienten je Platte DAF-2 DA mit L-NAME (Negativkontrolle; 1 mM Endkonzentration) auf Zellen und Krebs-Ringer-Puffer ohne DAF-2 DA auf Zellen.

2.3.8. Proteinbestimmung (in transparenten Platten)

Material:

BCA Proteinassay Kit (Pierce über Perbio Science Deutschland GmbH Bonn, 23221)

NaOH (Merck Darmstadt, 6498.0500)

Bidestilliertes H₂O

Prinzip des Testsystems:

Proteine in alkalischem Medium reduzieren Cu²⁺ zu Cu¹⁺. Bicinchoninsäure (BCA), Bestandteil einer der Kitkomponenten, führt sehr sensitiv und selektiv zu einer Chelatbildung von 2 BCA mit einem Cu¹⁺. Dieser violette, wasserlösliche Komplex kann bei 562 nm photometrisch gemessen werden.

Durchführung:

Je well wurden 50 µl 0,2 M NaOH aufgetragen, die Platten mit Parafilm versiegelt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die BCA Lösung wurde nach Gebrauchsanleitung aus den Bestandteilen A und B frisch angesetzt, je 200 µl auf die wells aufgetragen, 30 min. bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Platten photometrisch bei 560 nm und 690 nm Referenz gemessen.

2.3.9. Auswertung und Statistik

Die Rohdaten der Doppelwerte der einzelnen Messungen wurden gemittelt, dann auf den Proteingehalt bezogen und anschließend mit der unstimulierten Kontrolle verglichen. Die Signifikanz der prozentualen Änderung zur Kontrolle wurde mittels T-Test bzw. ANOVA berechnet.

2.4. IMMUNSUPPRESSIVA UND ADHÄSION VON DENDRITISCHEN ZELLEN (MURIN)

2.4.1. Kultivierung und Passage der Zelllinien muriner aortaler Endothelzellen und muriner Dendritischer Zellen:

Material:

Murine aortale Endothelzellen (ATCC über LGC Promochem Wesel; CRL-2279)
Murine Dendritische Zellen 2.4 (Dana Faber Cancer Institute, Boston; Dr. K.L. Rock)
DMEM high glucose, ohne Phenolrot (Invitrogen GmbH Karlsruhe, 21063-029)
Fötale Kälberserum FCS Clone (PAA Laboratories Deutschland, Cölbe; A-15-041)
PBS w/o Ca²⁺, Mg²⁺ (Biochrom AG Berlin; L 1825)
Trypsin / EDTA in PBS w/o Ca²⁺, Mg²⁺ (Biochrom AG Berlin, L 2143)
Trypanblau 0,5 % (Biochrom AG Berlin, L 6323)

Beschreibung der Zelllinie:

Die murine Endothelzelllinie (mEC) aus dem Mausstamm C57BL/6 ist ein durch SV40 Transformierung immortalisierter Endothelzellklon aus Langerhans-Inseln der Bauchspeicheldrüse und wurde auf die Aufnahme von acetyliertem LDL und Expression des von Willebrand Faktors und des VEGF Rezeptors überprüft. Die murine Dendritische Zelllinie (mDC) 2.4 wurde ebenfalls aus dem Mausstamm C57BL/6 aus Knochenmarkszellen generiert und retroviral über *myc* und *raf* immortalisiert (Lee, Kang et al. 2004). Die DC2.4 Zellen zeigen eine DC spezifische Morphologie, exprimieren MHC Klasse I und II Moleküle sowie kostimulatorische Moleküle B7-1 und B7-2. Weiterhin zeigen diese Zellen Oberflächenmoleküle wie ICAM und DEC-205, phagozytotische Aktivität und antigen präsentierende Kapazitäten (Lee *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 1997).

Kultivierung:

Die murinen Endothelzellen (mECs) und Dendritischen Zellen (mDCs) wurden in phenolrotfreiem DMEM mit 10 % FCS (Vollmedium) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und bis maximal zur zwanzigsten Passage für die Versuche verwendet. Dreimal die Woche wurde das Medium gewechselt. Die mEC wurden mindestens einmal die Woche 1: 4 bis 1: 6 passagiert, die mDC bis zu dreimal die Woche 1:10 bis 1:25 passagiert. Frisch aufgetaute Zellen wurden

frühestens nach 3 Tagen Kultivierung für die Versuche verwendet. Passage und Zellzählung wurden wie bei den HMEC-1 (siehe S. 26), jedoch mit phenolrotfreiem DMEM + 10 % FCS durchgeführt.

2.4.2. mEC und NO

Um einen Vergleich zu den HMEC-1 ziehen zu können, wurde bei den mEC eine Bestimmung des NO nach immunsuppressiver Stimulation unter normoxischen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden 13.500 mEC je well in je 100 µl Voll- DMEM ausgesät und 20-24 h bei 37 °C / 5 % CO₂ bis zur Konfluenz kultiviert. Die Stimulation und die Durchführung der NO Messungen entsprach der „Versuchsvorbereitung“ (S. 27) und den Durchführungen für NO (S. 31/32) mit DMEM als Medium.

2.4.3. Adhäsionsassay von mDC an mEC (weiße Platten)

Material

DMEM high glucose, ohne Phenolrot (Invitrogen GmbH Karlsruhe, 21063-029)

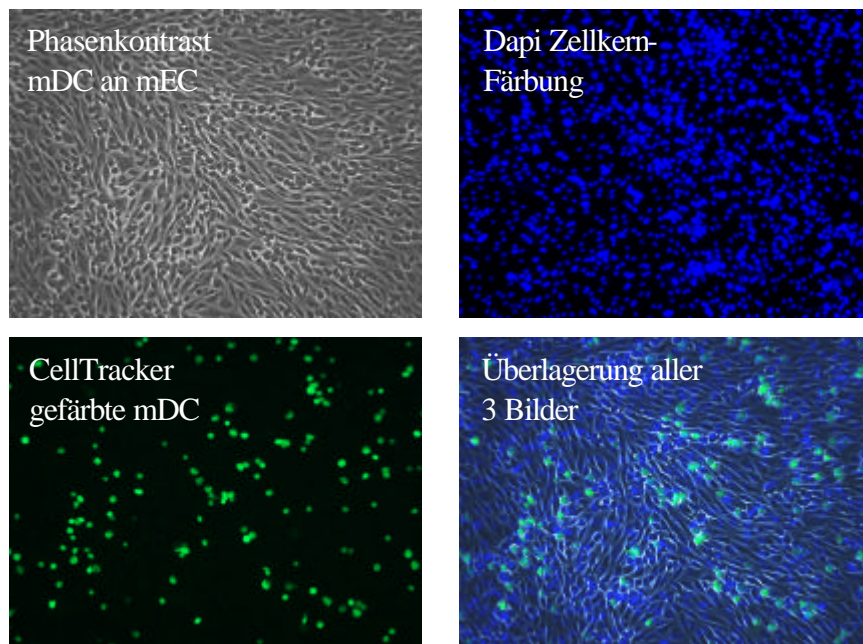
Fötale Kälberserum FCS Clone (PAA Laboratories Deutschland, Cölbe; A-15-041)

CellTracker Green CMFDA (Molecular Probes über MoBiTech Göttingen, C-2927)

Prinzip des Testsystems:

Die zellmembranpermeable Substanz CellTracker green (CMFDA) enthält eine Chloromethylgruppe, die mit Thiolen reagiert. Durch die Reaktion von CMFDA mit intrazellulären Esterasen und Glutathion-S-Transferase entstehen die grün fluoreszierenden Chloromethylderivate des Fluorescein Diacetat, die die Zelle nicht mehr verlassen können. Diese zytosolische Färbung der Zellen bleibt für mind. 72 h und mindestens vier Zellteilungen bestehen. Die Intensität der Färbung nimmt jedoch im Laufe der Zeit und mit jeder Zellteilung ab. Die Fluoreszenz kann bei 485 nm Exzitation und 535 nm Emission gemessen werden. Mit dieser Färbetechnik wurden die mDC angefärbt, um eine anschließende Quantifizierung der Adhäsion von mDC an mEC unter verschiedenen Stimulationen durchführen zu können (siehe Abbildung 17).

Abbildung 17: Endothelmonolayer mit adhären DCs



Durchführung:

Je 13.500 mECs pro well wurden in weiße Platten ausgesät (und in eine transparente Platte zur Sichtkontrolle) und, je nach Versuchsvorgabe, nach 3-4 h Kultivierung für 24 h mit Immunsuppressiva stimuliert (siehe oben „Kultivierung und Passage der Zelllinien muriner aortaler Endothelzellen und muriner Dendritischer Zellen“).

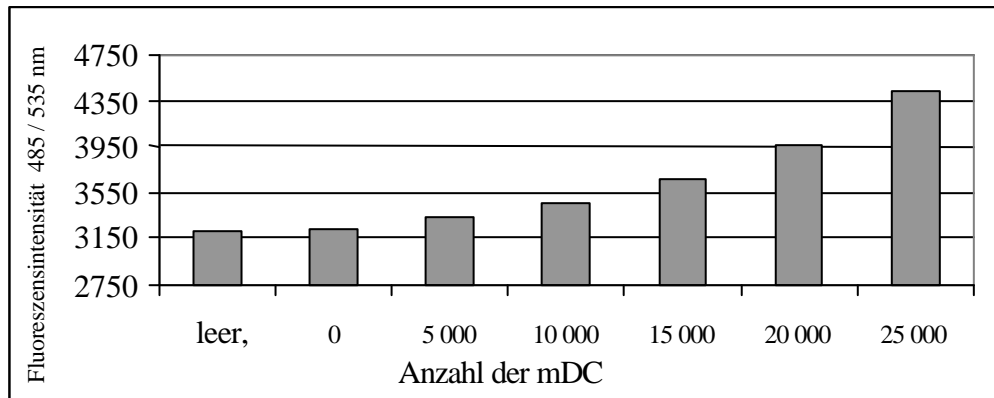
Die mDCs einer T75 Flasche wurden abtrypsiniert und einmal mit DMEM ohne Phenolrot gewaschen. Das Zellpellet wurde in ein 1,5 ml Eppendorf Röhrchen überführt und mit 1 ml 10-25 μ M (3-10 $\times 10^6$ Zellen) green CellTracker (CMFDA) in DMEM ohne Phenolrot (serumfrei!) resuspendiert. Dieser Ansatz wurde für 45 min. bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Für die Begasung der Zellen befanden sich Löcher in den Deckeln der Röhrchen. Nach der Inkubation wurden die Zellen für 5 min. bei 260 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Vollmedium resuspendiert und für weitere 30 min. bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 1 ml Vollmedium resuspendiert und auf die vorbereiteten T25 Flaschen verteilt und gegebenenfalls mit Immunsuppressiva stimuliert. Der zeitliche Ablauf wurde so angepasst, dass eine Stimulation der mECs ca. 30 min. nach der Stimulation der mDCs erfolgte, sodass jeweils eine Stimulationsdauer von 24 h erreicht wurde (mDCs müssen am nächsten Tag trypsiniert werden, Dauer ca. 30 min.). Nach 24 h Kultivierung, gegebenenfalls unter Stimulation, wurden die mDCs abtrypsiniert und mit Trypanblau gezählt (siehe S. 27). Die Zellzahl der

einzelnen Stimulationsansätze wurde auf 200,000 mDCs pro ml, jeweils ohne und mit Immunsuppressiva in Vollmedium eingestellt. Der Überstand der mEC-Platten wurde verworfen und je 100 µl der entsprechenden mDC Zellsuspension auf die entsprechenden wells mit mECs aufgetragen. Als Kontrollen dienten wells mit gegebenenfalls stimulierten mECs ohne mDCs und Vollmedium, beziehungsweise wells ausschließlich mit Medium ohne mECs. Sofort anschließend wurden die Platten auf einem Schüttler für 3 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Platten direkt bei 485 nm Exzitation und 535 nm Emission im Fluoreszenzreader gemessen, danach wurde der Überstand verworfen und die Platten nochmals im Fluoreszenzreader gemessen. Nun wurden die wells mittels einer Mehrkanalpipette mit 200 µl pro well DMEM ohne Phenolrot (serumfrei!) vorsichtig gewaschen. Nach jeder Waschung erfolgte eine Messung, insgesamt wurden 5 Waschungen durchgeführt. Der Adhäsionsassay wurde mit unstimulierten mDCs auf stimulierten mECs, stimulierten mDCs auf unstimulierten mECs ohne weitere Stimulation während der dreistündigen Kokultivierung, sowie mit stimulierten mDCs auf stimulierten mECs mit und ohne Stimulation während der Kokultivierung durchgeführt.

Auswertung und Statistik:

Die erste Messung direkt nach Beendigung der Kokultivierung diente zur Ermittlung der verschiedenen Färbungsintensitäten der mDCs, entstanden durch die immunsuppressive Stimulation (= Proliferation, siehe Prinzip des Testsystems). Eine Anpassung der Färbungsintensitäten wurde erreicht, indem ein Faktor vom Mittelwert der Vierfachwerte der verschiedenen Stimulationsansätze durch den Mittelwert der unstimulierten Kontrolle erhoben wurde. Die Mittelwerte der Messungen nach den Waschungen 3, 4 und 5 wurden durch diesen Faktor geteilt und danach auf die unstimulierte Kontrolle bezogen. Diese Nivellierung wird durch die Linearität der Färbungsintensitätsabnahme, als auch der Linearität der mDC Adhäsion im Verhältnis zur mDC Ausgangszellzahl ermöglicht (siehe Abbildung 18). Aus den 3 Messungen wurde der Mittelwert berechnet. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde durch T-Test ermittelt.

Abbildung 18: Verdünnungsreihe von mDCs an konfluenten mECs (nach 2 mal Waschen)



2.4.4. Viabilität der mDC (transparente Platten)

Material:

Cell Proliferation Reagent, Premix WST-1 (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, 1644807)

Prinzip des Testsystems:

Mittels WST-1 (siehe S. 29 unter „Metabolische Aktivität“) wurde zu Beginn und Ende der Kokultivierung die metabolischen Aktivität bestimmt und beide Werte miteinander verglichen. Diese beiden Zeitpunkte waren notwendig, um die veränderte metabolische Aktivität durch die Immunsuppressiva zu berücksichtigen.

Durchführung:

Je 20,000 unstimulierte und stimulierte mDCs pro well wurden in wells (ohne mECs) transparenter Platten gegeben. Zu Beginn und Ende der Kokultivierung des Adhäsionsassays wurden je 10 µl des cell proliferation reagent zugegeben und der Ansatz für 1,5 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die wells sofort bei 450 nm und 690 nm Referenz photometrisch gemessen.

Auswertung und Statistik:

Die Rohdaten der Vierfachwerte der einzelnen Messungen wurden gemittelt. Es wurde das Verhältnis zwischen Messung zu Ende der Kokultivierung und Messung zu Beginn der Kokultivierung errechnet. Dieses Verhältnisse wurden mit den Ergebnissen der unstimulierten Kontrolle verglichen und die jeweilige prozentuale Änderung zu dieser Kontrolle ermittelt. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels T-Test berechnet.

2.5. IMMUNSUPPRESSIVA UND GENEXPRESSION VON ADHÄSIONSMOLEKÜLEN UND EXTRAZELLULÄREN MATRIXPROTEINEN BEI MURINEN DENDRITISCHEN ZELLEN

2.5.1. RNA Isolierung aus unstimulierten und stimulierten mDCs

Material

RNA Isolierung:

Sodium Dodecyl Sulfate SDS (Sigma Taufkirchen, L-4390)

Chloroform (Merck Darmstadt, 1.02445.2500)

TRIzol[®] Reagent (Invitrogen GmbH Karlsruhe, 15596-026)

Phenol mit 0,1 M Citratpuffer (Sigma Taufkirchen, P-4682)

Chloroform / Isoamylalcohol 49:1 (Fluka über Sigma Taufkirchen, 25 668)

Ethanol absolut (Merck Darmstadt, 1.00986.1000)

2-Propanol (Merck Darmstadt, 9634.1000)

Ammoniumacetat (Merck Darmstadt, 1.01115.1000)

Agarose Gel und Elektrophoresepuffer:

SeaKem[®] LE Agarose (Chambrex über Biozym Scientific GmbH Hess Oldendorf, 40004)

1% in TBE-Puffer

Ethidiumbromid (Merck Darmstadt, 1.11608.0030)

6 x loading dye solution Auftragspuffer (Fermentas GmbH St. Leon-Rot, R0611)

TBE-Puffer:

89 mM Tris (Carl Roth GmbH & Co KG Karlsruhe, 4855.2)

89mM Borat (Carl Roth GmbH & Co KG Karlsruhe, 6943.1)

2 mM EDTA (Carl Roth GmbH & Co KG Karlsruhe, 8043.2)

in RNA H₂O pH 8,3 anschließend autoklaviert

Prinzip des Testsystems:

Trizol lysiert Zellen und Zellbestandteile, sorgt aber gleichzeitig für die Erhaltung der Integrität von RNA und DNA. Die Zugabe von Chloroform mit anschließender Zentrifugation führt zu einer Trennung von organischer und wässriger Phase. Die wässrige Phase beinhaltet die DNA und RNA. Nach Präzipitations- und Reinigungsschritten wird die DNA mit saurem Phenol/Chloroform gefällt. Weitere Präzipitations- und Aufreinigungsschritte führen zu relativ reiner RNA-Ausbeute. Zur Beurteilung wird die RNA auf ein Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel aufgetragen. Das in dem Agarosegel befindliche Ethidiumbromid interkaliert zwischen benachbarten Nukleotiden der RNA/DNA. Dies führt zu einer Konformationsänderung des Ethidiumbromid, welche unter UV- Licht sichtbar gemacht werden kann. Zusätzlich wird auch nicht interkaliertes Ethidiumbromid um die RNA/DNA durch die Eigenstrahlung der belichteten RNA/DNA angeregt und somit bei 254 nm unter UV-Licht sichtbar.

Durchführung:

Die mDCs wurden für 24 h mit Immunsuppressiva (siehe unten) in T25 Zellkulturflaschen stimuliert, eine Kontrolle unstimulierter Zellen wurde mitgeführt. Nach Ablauf der Stimulationsdauer wurde der Überstand der Flaschen gründlich abgenommen und verworfen. Je 1 ml TRIzol wurde auf jede Flasche gegeben und nach Spülen des Flaschenbodens in ein RNase freies 1,5 ml Röhrchen überführt. Nach 5 min. Inkubation bei Raumtemperatur wurden je 300 µl Chloroform zugeben, kurz gevortext und für 3 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde bei 10,600 g für 15 min. bei 4°C zentrifugiert. Die klare obere Phase wurde abgenommen und in je ein neues 1,5 ml Röhrchen (RNase frei) überführt. Nach Zugabe von 500 µl 100 % Isopropanol, kurzem vortexen und 10 min. Inkubation auf Eis wurde für 10 min. bei 4°C mit 10,600 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert und jedes Pellet mit 500 µl 75 % Ethanol gewaschen, gevortext und für 5 min. bei 4°C mit 6.800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die Pellets 5 min. bei Raumtemperatur getrocknet. Die Pellets wurden danach in je 400 µl RNase freiem Wasser aufgenommen und gelöst. Je 400 µl saures Phenol/Chloroform (1:1) wurde zugegeben, gevortext und für 15 min. bei 4°C mit 12.900 g zentrifugiert. Die obere Phase wurde in neue 1,5 ml Röhrchen überführt und je 300 µl Chloroform/Isoamylalkohol zugefügt, gevortext und für 15 min. bei 4°C mit 12.900 g zentrifugiert. Wiederum wurde die obere Phase in neue Röhrchen überführt und je 75 µl 10 M Ammoniumacetat und 750 µl absoluter Ethanol zugegeben, gevortext und für 15 min. bei 4°C mit 12.900 g zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes und 10 min. Trocknung der Pellets bei Raumtemperatur wurden die Pellets in je 75 µl RNase freiem Wasser gelöst und die optische Dichte bestimmt (260 nm für RNA und 280 nm für Verunreinigung durch freie Nukleotide und Proteine). Bei einem 260nm / 280 nm Verhältnis kleiner als 1,75 wurde nochmals aufgereinigt. Dazu wurde die Prozedur ab dem sauren Phenol/Chloroform wiederholt, jedoch dieser erste Schritt ausschließlich mit Chloroform durchführt (Phenol stört die Messung der optischen Dichte). Die Konzentration der RNA wurde berechnet durch: $RNA \text{ in } ng/\mu l = 260 \text{ nm} \times 40 \times \text{Verdünnung}$.

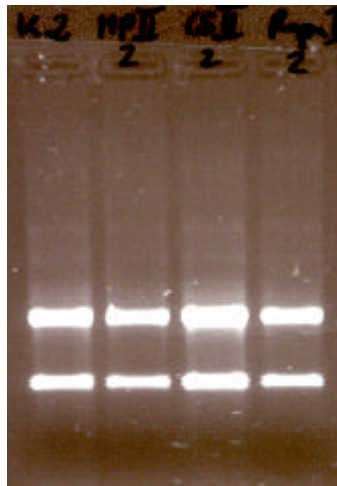
Stimulationskonzentrationen der Immunsuppressiva in diesen Versuchen:

MP (100 µM), CS (1 µg/ml) und Rapa (100 pg/ml) entsprechen der Dosierung in der Frühphase nach der Operation.

Überprüfung der RNA durch Gel-Elektrophorese:

0,4 g Agarose wurde mit 40 ml RNase freiem TBE-Puffer aufgekocht, nach dem Kochen 0,4 µl Ethidiumbromid zugegeben. Die flüssige Agarose-Ethidiumbromid-Mischung wurde in die RNase-freie Gelkammer gegossen und 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das fertige Gel wurde in die Elektrophoresekammer mit TBE Puffer gegeben (RNase frei). Je 500 ng RNA wurden mit Auftragspuffer versetzt, auf das Gel aufgetragen und bei 80 V für 1 h aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert. Nur Isolationen, wobei die 28S und 18S ribosomale RNA als scharfe Banden mit einem Verhältnis 2:1 sichtbar waren, wurden als qualitativ ausreichend akzeptiert.

Abbildung 19: Beispiel eines Gel-Fotos der S28 S18 rRNA



2.5.2. Genexpressionsanalyse der murinen DCs in Hinblick auf Adhäsionsmoleküle und extrazelluläre Matrixproteine (GEArray)

Material:

Reine GesamtRNA

GEArray Mouse Extracellular Matrix and Adhesion Molecule Q series, NonRadioactive Detection (SuperArray über Biomol Hamburg, MM-010N-12)

True Labeling-RT Kit (Superarray über Biomol Hamburg, L-02)

Biotin-16 dUTP (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, 1-093-070)

Sheared Salmon Sperm DNA (Invitrogen GmbH Karlsruhe, 15632-011)

Sodium Dodecyl Sulfate SDS (Sigma Taufkirchen, L-4390)

NaCl (Merck Darmstadt, 1.06404.0500)

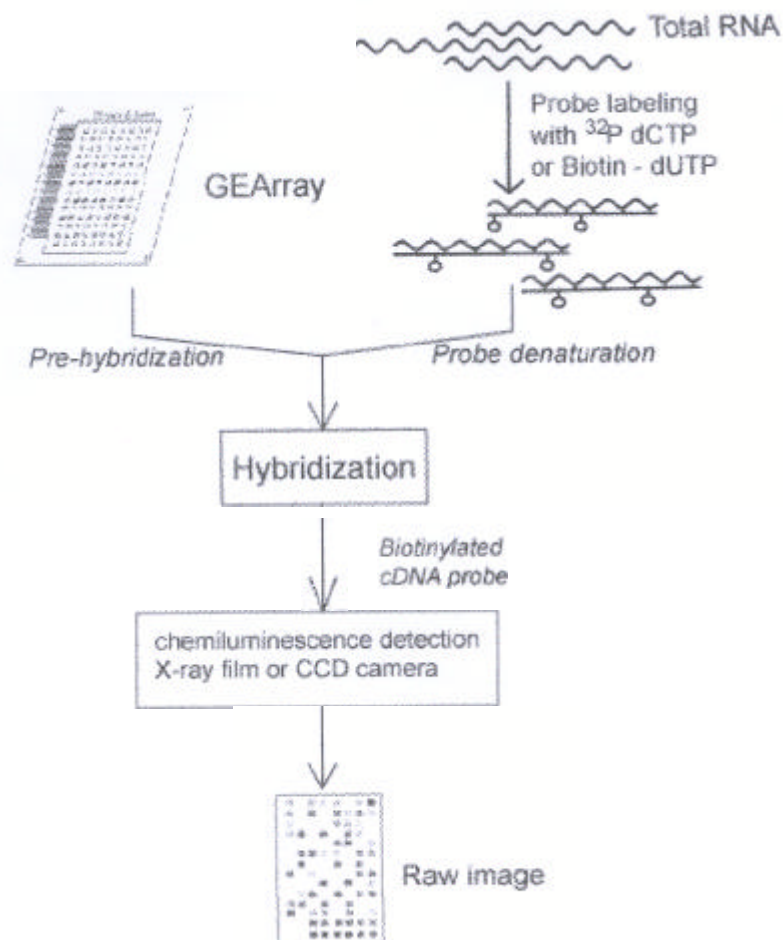
Sodium citrat tribasic dihydrate (Sigma Taufkirchen, S-4641)

Chemilumineszenzfilm X-Omat AR Film 13x18 cm (Kodak über Sigma Taufkirchen, F-5388)

Prinzip des Testverfahrens (siehe auch Abbildung 20):

Die reine Gesamt-RNA wird mittels biotinylierter dNTPs in markierte cDNA umgeschrieben und anschließend denaturiert. Nur der markierte Einzelstrang kann später detektiert werden. Sowohl der unmarkierte Strang der cDNA als auch geringe Mengen von DNA stören den Test nicht, da die membrangebundenen cDNA Fragmente im Überschuss vorhanden sind. Die Membranen mit den genspezifischen cDNA Fragmenten müssen vor der Hybridisierung mit denaturierter Lachssperma DNA abgesättigt werden. Während der Hybridisierung bindet die biotinylierte, denaturierte cDNA (= Einzelstrang, komplementär zur RNA) an die passenden genspezifischen cDNA Fragmente. Das Streptavidin-Alkalische Phosphatase Konjugat bindet mit dem Streptavidin an das Biotin der markierten cDNA und die alkalische Phosphatase spaltet das später zugefügte Substrat. Die entstehende Chemilumineszenz kann durch Belichtung eines Röntgenfilmes für 30 sek. bis 5 min. mit anschließender Entwicklung sichtbar gemacht werden. Die Positiv- und Negativkontrollen des Assays dienen zur Überprüfung und als Bezugsquelle (interne Kontrolle, house keeping gene).

Abbildung 20: Prinzip des GEArrays



Durchführung:

Die Durchführung erfolgte nach dem Benutzerhandbuch „GEArray Q and S Series KITS for chemiluminescent detection“ Option 2 TrueLabeling-RT Kit .

Bearbeitung, Auswertung und Statistik:

Die Röntgenfilme wurden mittels eines Scanners als Negativ in die Scananalyse Software eingespeist, bearbeitet und berechnet. Der Hintergrund wurde abgezogen und die Ergebnisse auf den Mittelwert der Positivkontrollen (house keeping genes) bezogen.

2.5.3. Semiquantitative PCR von mDC cDNA aus RNA zur Evaluierung des GEArray

Material:

DNase Verdau:

DNA-free Kit (Ambion Huntingdon UK, 1906)

Reverse Transkription zur cDNA Herstellung aus RNA:

10 mM dNTP Mix (Invitrogen GmbH Karlsruhe, 18427-013)

RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen GmbH Karlsruhe, 10777-019)

Random primers (Invitrogen, 48190-011)

SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, 18080-093)

PCR:

cDNA

10 mM dNTP Mix (Invitrogen GmbH Karlsruhe, 18427-013)

10 x PCR Rxn Buffer (Invitrogen GmbH Karlsruhe, Y02028)

50 mM MgCl₂ (Invitrogen GmbH Karlsruhe, Y02016)

Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen GmbH Karlsruhe, 10966-018)

RNA H₂O

SYBR Gold nucleic acid gel stain 10,000x (Molecular Probes über Invitrogen GmbH Karlsruhe, S-11494)

DNA-Gel:

Agarose Gel und Elektrophoresepuffer:

SeaKem[®] LE Agarose (Chambrex über Biozym Scientific GmbH Hess Oldendorf, 40004)

1% in TBE-Puffer

Ethidiumbromid (Merck Darmstadt, 1.11608.0030)

6 x loading dye solution Auftragspuffer (Fermentas GmbH St. Leon-Rot, R0611)

Primer:

- GAPDH

vorwärts 5'-GCGAGACCCCACTAACATC-3' Länge: 19 b Position: 298

rückwärts 5'-CATCATACTTGGCAGGTTTCT-3' Länge: 21 b Position: 821

Annealingtemperatur: 55°C

Produktlänge: 523 bp

- L-Selektin

vorwärts 5'-GGACTTACCATTATTCTGA-3' Länge: 19 b Position: 221
 rückwärts 5'-CARCATACTTGGCAGGTTTCT-3' Länge: 21 b Position: 474
 Annealingtemperatur: 50°C Produktlänge: 253 bp

- Integrin a 6

vorwärts 5'-CTCACAACCTCAAGAAAGAAAC-3' Länge: 21 b Position: 2809
 rückwärts 5'-GCTACAGTCTTTGAGGGAA-3' Länge: 19 b Position: 3148
 Annealingtemperatur: 54°C Produktlänge: 339 bp

- Integrin β 6

vorwärts 5'-CATCTCTCCTTTCTCCTACA-3' Länge: 20 b Position: 759
 rückwärts 5'-CTTCAGACCCTCACACTTC-3' Länge: 19 b Position: 1452
 Annealingtemperatur: 54 °C Produktlänge: 693 bp

- ECM-1 (Extracellular matrix protein 1)

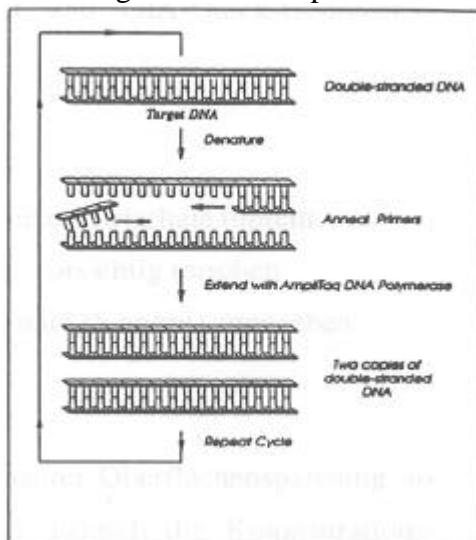
vorwärts 5'-GCCACGCAACCTCCCAGC-3' Länge: 18 b Position: 1140
 rückwärts 5'-CACAGCAGAGGGCAGGGT-3' Länge: 18 b Position: 1639
 Annealingtemperatur: 59°C Produktlänge: 499 bp

Prinzip des Testverfahrens:

PCR:

Die Polymerase Chain Reaction wird mit 25-35 Zyklen aus je drei Schritten durchgeführt.

Abbildung 21: Das Prinzip der PCR



- 1) Die Denaturierung, die bei einer Temperatur von 94°C zu einer Trennung des Doppelstranges führt.
- 2) Das Annealing, bei der die Primer durch die primerspezifischen Temperaturen an die Einzelstränge binden.
- 3) Die Extension, bei 72°C oder 74°C (polymerasespezifisch), wobei an den Primern der Einzelstrang zum Doppelstrang komplettiert wird.

Diese Prozedur führt zu einer Vervielfältigung der Vorlage.

Durchführung:

GAPDH - PCR der RNA:

Die RNA der stimulierten mDCs (siehe S. 38/39 „RNA Isolierung aus unstimulierten und stimulierten mDC“) wurde mittels GAPDH PCR auf DNA überprüft, da bei der semiquantitativen PCR auch geringste Mengen von DNA das Ergebnis verfälschen. Dazu wurde folgender Mastermix auf Eis hergestellt:

H ₂ O	216,15 µl
10 x PCR Rxn Buffer	27,50 µl
50 mM MgCl ₂	8,25 µl
10 mM dNTP Mix	5,50 µl
GAPDH Primer (20 mM, je vorwärts und rückwärts)	5,50 µl
Platinum Taq DNA Polymerase	1,10 µl

Es wurden 1 µl jeder RNA in je ein PCR Röhrchen pipettiert und 49 µl des fertigen Mastermixes zugegeben. Ein Röhrchen enthielt als „no template control“ RNase freies Wasser anstelle einer RNA. Die PCR wurde folgendermaßen durchgeführt:

2 min.: 94°C (= Denaturierung des Doppelstrangs, falls vorhanden)

30 sek. 94°C (siehe oben)

30 sec. 55°C Annealing Temperatur zur Anlagerung der Primer

1 min. 72°C Anlagerung der dNTPs durch die Taq Polymerase

} 30 Zyklen

5 min. 72°C

8°C ∞

Danach wurden je 5 µl pro PCR Produkt mit entsprechender Menge Auftragspuffer zur Überprüfung auf ein DNA Gel aufgetragen:

0,8 g bzw. 1,2 g Agarose wurde mit 80 bzw. 120 ml TBE-Puffer aufgeköcht und nach dem Kochen 1 µl Ethidiumbromid zugegeben. Diese flüssige Agarose-Ethidiumbromid-Mischung wurde in die Gelkammer gegossen und 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das fertige Gel wurde in die Elektrophoreskammer mit TBE Puffer gegeben. Je 15 µl des PCR-Ansatzes wurden mit Auftragspuffer versetzt, auf das Gel aufgetragen und die Proben bei 120 V für 1 h aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert. Zeigten sich außer bei der Positivkontrolle Banden auf dem Gel wurde ein DNase Verdau durchgeführt.

DNase Verdau:

Je 5 µg RNA wurden mit RNase freiem H₂O auf 7 µl aufgefüllt, dann 0,8 µl DNase 1 Puffer und 0,3 µl DNase 1 Enzym zugegeben. Anschließend wurde dieser Ansatz für 1 h bei 37°C im Thermoblock inkubiert und danach mit 0,8 µl DNase Inaktivierung für 2 min. bei Raumtemperatur inaktiviert. Nach Zentrifugation von 1 min. bei 10.000 g wurde der Überstand abgenommen und in ein frisches Röhrchen überführt. Eine Überprüfung des Verdau erfolgte über eine weitere GAPDH – PCR der RNA (siehe oben).

Umschreiben der RNA in cDNA:

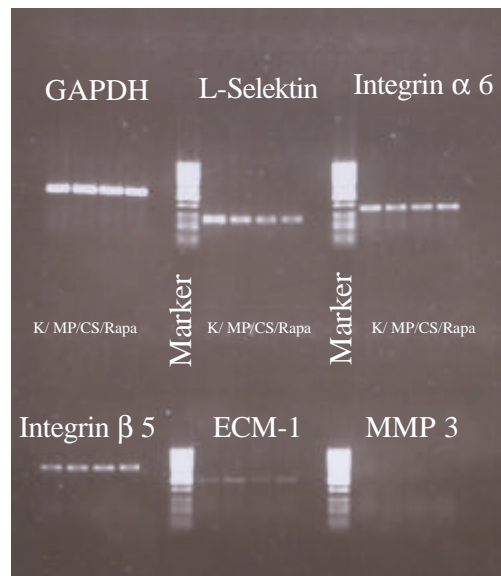
Nach erfolgreichem DNase Verdau wurde die RNA wie folgt in cDNA umgeschrieben:

5 µg verdauter RNA	}	5 min. bei 65°C, danach 5 min. bei 4°C
1 µl random primer		
1µl 10 mM dNTP mix		
steriles, RNase freies, destilliertes Wasser auf 13 µl		
Kurzes Anzentrifugieren der Proben,	}	vorsichtig mischen und 5 min. 25°C, dann 60 min. bei 50°C und 15 min. bei 70°C inkubieren
Zugabe von 4 µl First strand buffer		
1 µl 0,1 MDTT		
1 µl RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor		
1 µl SuperScript III RT		

PCR der umgeschriebenen cDNA:

Mit der gewonnenen cDNA als Vorlage wurden mit den oben genannten Primerpaaren eine PCR durchgeführt (siehe PCR der RNA) und die PCR Produkte auf ein DNA-Gel aufgetragen (siehe oben). Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel mit SYBR Gold 1: 10.000 in TBE Puffer für 30 min. bei Raumtemperatur unter Schaukeln im Dunkeln gefärbt und anschließend mit dem MultiImager aufgenommen.

Abbildung 22: Beispiel eines semiquantitativen PCR Gels



Auswertung und Statistik:

Die Bilder wurden mit der Gel Doc Software S-Fluor ausgewertet und mit Excel berechnet. Alle Werte wurden erst auf die entsprechenden GAPDH Werte bezogen, anschließend das prozentuale Verhältnis zur Kontrolle ermittelt.

2.6. IMMUNSUPPRESSIVA UND GENEXPRESSION VON ADHÄSIONSMOLEKÜLEN UND EXTRAZELLULÄREN MATRIXPROTEINEN BEI HUMANEN MYELOIDEN DENDRITISCHEN ZELLEN

2.6.1. Gewinnung humaner myeloider DCs aus Vollblut

Material:

Heparin-Natrium Braun 25.000 IE/5 ml (B. Braun Melsungen AG Melsungen, PZN 2540309)

Heparinisiertes Vollblut (0,5 IE / ml Blut)

Ficoll Paque Plus (Amersham Bioscience, Uppsala Sweden, 17-1440-02)

Very low endotoxin RPMI 1640 (Biochrom AG Berlin, F1415)

PBS w/o Ca²⁺, Mg²⁺ (Biochrom AG Berlin; L 1825)

Flebogamma 5% (Grifols Deutschland GmbH, Langen, PZN 0866018)

Very low endotoxin FCS (Seromed Biochrom KG Berlin, S0113 auf Anfrage Endotoxin getestet)

Dimethylsulfoxid DMSO (Sigma Taufkirchen, D8418)

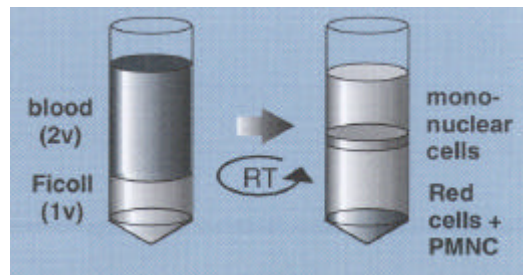
Humanes Interleukin 4, IL-4 (PeproTech EC Ltd. London, UK; 200-04)

Humaner granulocyte-macrophage colony stimulation factor GM-CSF (PeproTech EC Ltd. London, UK; 300-03)

Prinzip des Verfahrens:

Durch Ficoll werden aufgrund der unterschiedlichen Dichte der verschiedenen Blutzellen die mononukleären Zellen bei Zentrifugation separiert. Nach weiteren Waschschrritten können Monozyten /Makrophagen über die Adhäsion an Gammaglobulin beschichteten Platten aus den mononukleären Zellen aufgereinigt werden. Durch Zugabe der Zytokine IL-4 und GM-CSF können aus Monozyten / Makrophagen myeloide DCs generiert werden.

Abbildung 23: Ficoll Aufreinigung von PBMC aus heparinisierem Vollblut (Cochet *et al.*, 1998)



Durchführung:

Das heparinisierte Vollblut (0,5 IE Natrium-Heparin / ml Blut) wurde vorsichtig und langsam auf die gleiche Menge Ficoll in 50 ml Rörchen überschichtet und anschließend 25 min. bei 832 g ohne Bremse zentrifugiert. Danach wurde vorsichtig der Überstand über der gewünschten Zellfraktion abgenommen und entfernt. Die „Zellringe“ der einzelnen Rörchen wurden sorgfältig mit einer Pipette in ein frisches Rörchen überführt, anschließend mit unkomplettiertem RPMI bis 50 ml aufgefüllt und für 10 min. bei 583 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und das Zellpellet erneut zweimal mit je 50 ml unkomplettiertem RPMI gewaschen. Sofort anschließend wurde das Pellet wieder in ausreichender Menge komplettierten RPMI (RPMI + 10 % very low endotoxin FCS + 2 mM L-Glutamin) resuspendiert. Gegebenenfalls wurden die mononukleären Zellen mit 50 % very low endotoxin FCS und 10 % DMSO in komplettiertem RPMI langsam bei -80°C eingefroren.

Die entsprechende Menge Flebogamma 5 % wurde 1:3 mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} verdünnt und je 3 ml pro Petrischale aufgetragen und verteilt. Nach 15 bis 30 min. Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung abgenommen und je $5-7 \times 10^5$ Zellen pro Petrischale in 3 ml komplettierten RPMI ausgesät. Nach 3-4 Stunden Inkubation der Zellen bei $37^{\circ}\text{C} / 5\% \text{CO}_2$ wurde der Überstand mit nicht adhären Zellen entfernt und die Petrischalen 2 mal mit je 3-5 ml PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen. Danach wurden je 3 ml des Stimulationsmediums (komplettiertes RPMI mit 200 U/ml GM-CSF und 20 ng/ml IL-4) auf die Petri-

schalen aufgetragen; nach 3-5 Tagen Kultivierung der Zellen bei 37°C / 5 % CO₂ wurden die Zellen mit den jeweiligen Immunsuppressiva in komplettiertem Medium für 24 h stimuliert. Anschließend wurden ca. 4 x 10⁵ Zellen mittels FACS Analyse untersucht, aus den restlichen Zellen wurde die RNA gewonnen (siehe S. 38/39).

Stimulationskonzentrationen der Immunsuppressiva in diesen Versuchen:

MP (100 µM), CS (1 µg/ml) und Rapa (100 pg/ml) entsprechen der Dosierung in der Frühphase nach der Operation.

2.6.2. Überprüfung der humanen myeloiden DCs mittels FACS-Analyse

Material:

Gewonnene human myeloide DCs

PBS mit Ca²⁺, Mg²⁺ (Biochrom AG Berlin; L 1815)

Bovine serum albumine BSA (Sigma Taufkirchen, A-9647)

Maus anti-human CD14 PE konjugiert (MO2-RD1); (Beckman Coulter GmbH, Krefeld)

Maus anti-human CD11c PE konjugiert (Becton Dickinson, 347637)

Maus anti-human HLA-DR FITC konjugiert (Becton Dickinson GmbH Heidelberg, 347363)

Maus anti-human HLA-DR PE konjugiert (Becton Dickinson GmbH Heidelberg, 347367)

Maus anti-human CD1a PE (Becton Dickinson GmbH Heidelberg, 555806)

Isotyp Kontrolle IgG 2a FITC und IgG 1 PE (FastImmun, Beckton Dickinson GmbH Heidelberg, 340458)

Glutaraldehyde (Fluka Chemie AG Buchs, Schweiz; G00386)

Prinzip des Testverfahrens:

Die FACS Analyse (Fluorescent-Activated Cell Sorter) ermöglicht die Beurteilung von Zellen hinsichtlich ihrer Größe und Granulität. Bei Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern kann bei Verfügbarkeit des entsprechenden Kanals im FACS-Gerät auch die Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellen aufgrund ihrer Antikörperbindung detektiert werden. Zur Beurteilung des Antikörpers hinsichtlich einer Kreuzreaktivität wird hier stets eine Isotyp Kontrolle benötigt.

Die Wahl unserer Antikörper ergibt sich durch die veränderte Präsentation von Oberflächmolekülen während der DC Generierung aus Monozyten / Makrophagen. So zeigen Monozyten / Makrophagen positive Bindung von CD14, während die myeloiden DC CD14 negativ erscheinen. Gleichzeitig werden CD11c, CD1c und HLA-DR bei den myeloiden DC hochreguliert.

Durchführung:

Die Zellen wurden vorsichtig mit einem Zellschaber abgeschabt und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Das Röhrchen wurde mit kaltem PBS (mit Ca^{2+} und Mg^{2+}) + 1 % BSA auf 50 ml aufgefüllt und für 10 min. bei 583 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet nochmals mit PBS (mit Ca^{2+} und Mg^{2+}) + 1 % BSA gewaschen. Das Pellet wurde in PBS (mit Ca^{2+} und Mg^{2+}) + 1 % BSA resuspendiert und auf eine Zellzahl von ca. 1×10^5 pro 50 μl eingestellt. Die entsprechende Menge der Antikörper bzw. Isotypkontrollen (nach Gebrauchsanweisung) wurde zu den Zellen gegeben und mit PBS (mit Ca^{2+} und Mg^{2+}) + 1 % BSA auf je 100 μl aufgefüllt. Nach 45 min. Inkubation auf Eis wurde dreimal mit je 500 μl kaltem PBS (mit Ca^{2+} und Mg^{2+}) + 1 % BSA gewaschen und die Pellets in ca. 200 μl PBS (mit Ca^{2+} und Mg^{2+}) + 1 % BSA resuspendiert. Sofort anschließend wurden die Zellen im FACS Gerät analysiert.

2.6.3. RNA Isolierung aus unstimulierten und stimulierten humanen, myeloiden DCs

Material

RNA Isolierung:

Sodium Dodecyl Sulfate SDS (Sigma Taufkirchen, L-4390)

Chloroform (Merck Darmstadt, 1.02445.2500)

TRIzol[®] Reagent (Invitrogen GmbH Karlsruhe, 15596-026)

Ethanol absolut (Merck Darmstadt, 1.00986.1000)

2-Propanol (Merck Darmstadt, 9634.1000)

Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH Hilden, 74104)

Qiagen RNase-Free DNase Set (Qiagen GmbH Hilden, 79254)

Prinzip des Verfahrens:

RNA-Isolierung siehe „RNA Isolierung aus unstimulierten und stimulierten mDCs“. Der DNase Verdau und die Reinigung erfolgte zusätzlich über die Bindung der RNA an spezifische Säulchen. Die gebundene RNA kann behandelt, gereinigt und anschließend über RNase freies Wasser eluiert werden.

Durchführung und Überprüfung:

Die Durchführung und Überprüfung der RNA erfolgte wie unter „RNA Isolierung aus unstimulierten und stimulierten mDCs“. Anschließend folgte ein DNase Verdau und eine Reinigung der RNA nach dem Qiagen RNeasy Mini Handbook Juni 2001.

2.6.4. Genexpressionsanalyse der humanen, myeloiden DCs in Hinblick auf Adhäsionsmoleküle und extrazelluläre Matrixproteine (GEArray)

Material:

GEArray human Extracellular Matrix and Adhesion Molecule Q series, NonRadioactive Detection (SuperArray über Biomol Hamburg, HS-010N-12)

Restliches Material siehe S. 40

Testprinzip, Durchführung, Auswertung und Statistik:

Siehe „Genexpressionsanalyse der murinen DCs in Hinblick auf Adhäsionsmoleküle und extrazelluläre Matrixproteine“.

2.6.5. Semiquantitative PCR von myeloiden humanen DC cDNA aus RNA zur Evaluierung des GEArray

Material:

Siehe „Semiquantitative PCR von mDC cDNA aus RNA zur Evaluierung des GEArray“

Primer:

- GAPDH

vorwärts	5'-AGCCACATCGCTCAGACACC-3'	Länge: 20 b	Position: 5
rückwärts	5'-GTACTCAGCGCCAGCATCG-3'	Länge: 19 b	Position: 306
Annealingtemperatur: 60°C		Produktlänge: 301 bp	

- L-Selektin

vorwärts	5'-GGACTTACCATTATTCTGA-3'	Länge: 19 b	Position: 221
rückwärts	5'-CARCATACTTGCCAGGTTTCT-3'	Länge: 21 b	Position: 474
Annealingtemperatur: 50°C		Produktlänge: 253 bp	

- Integrin α X

vorwärts	5'-CGTCTACCACCAGCCCTTCC-3'	Länge: 20 b	Position: 357
rückwärts	5'-GCCGTGTATGTAAACCCTTGC-3'	Länge: 21 b	Position: 753
Annealingtemperatur: 50°C		Produktlänge: 396 bp	

- Integrin β 2

vorwärts	5'-GAAAACAACATCCAGCCCATTCTT-3'	Länge: 23 b	Position: 1009
rückwärts	5'-CTGGAAGGTGATCGGGACATTG-3'	Länge: 22 b	Position: 1307
Annealingtemperatur: 50°C		Produktlänge: 298 bp	

Testprinzip, Durchführung, Überprüfung, Auswertung und Statistik:

Siehe „Semiquantitative PCR von mDC cDNA aus RNA zur Evaluierung des GEArray“.

2.7. STATISTIK

Die einzelnen Signifikanztests sind ausführlich unter dem jeweiligen Methodenteil im Zusammenhang mit den Auswertungen beschrieben. Allgemein wurde die Signifikanz von prozentualen Änderungen zur Kontrolle bzw. Signifikanzen zwischen einzelnen Gruppen mittels T-Test bzw. ANOVA berechnet und bei einem Signifikanzniveau $p < 0,05$ angenommen. Alle in der Arbeit dargestellten Ergebnisse sind als arithmetischer Mittelwert mit den zugehörigen Standardfehlern des Mittelwertes angegeben ($MW \pm SEM$).

3. Ergebnisse

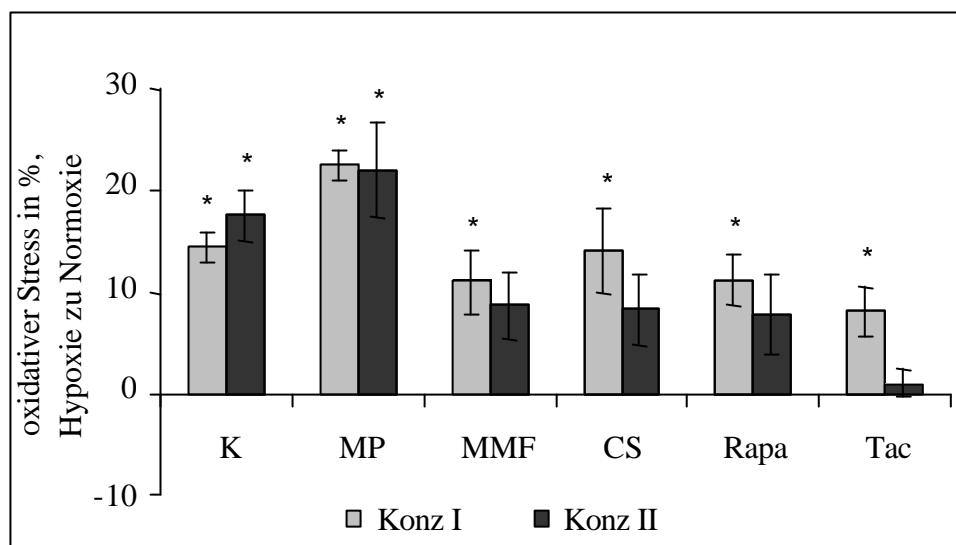
3.1. IMMUNSUPPRESSIVA UND ENDOTHELFUNKTION

Die Ergebnisse der beiden Zeitpunkte *unmittelbar nach Hypoxie bzw. Normoxie* (Zeitpunkt 0), sowie *nach weiteren 24 h Reoxigenierung* (Zeitpunkt 24 h) ergaben ähnliche Werte, jedoch mit einer verstärkten Ausprägung nach der Reoxigenierung. Deswegen werden im weiteren lediglich die Resultate des Zeitpunktes *nach 24 h Reoxigenierung* gezeigt.

3.1.1. Oxidativer Stress (n=6)

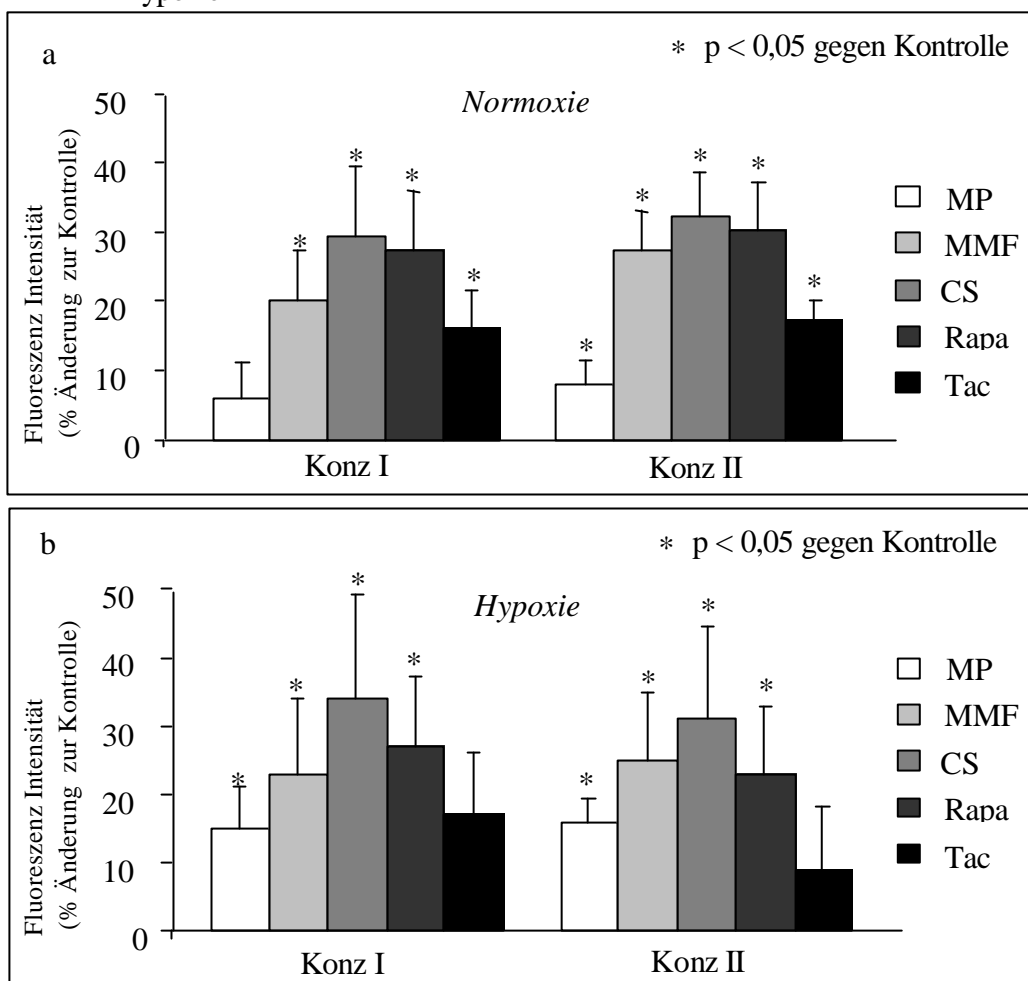
Die Stimulation von Endothelzellen mit Immunsuppressiva ergab bei beiden Konzentrationen unter normoxischen Bedingungen eine Steigerung des oxidativen Stresses (Abbildung 24), wobei die Lösungsmittel (der Immunsuppressiva) Methanol und Ethanol keinen Effekt auf den oxidativen Stress zeigten (Daten nicht gezeigt). Die Steigerung des oxidativen Stresses setzte sich als Summe aus den Einzeleffekten von Hypoxie und den Immunsuppressiva zusammen. Es fand kein potenzierender Effekt durch fortschreitende Lipidperoxidation mit weiterer Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen statt. Die Stimulation der HMEC-1 mit den hohen Dosen aller Immunsuppressiva zeigte eine leicht verringerte Erhöhung des oxidativen Stresses im Vergleich zu den niedrigen Dosen, wobei hier nur die Stimulation mit MP eine signifikante Änderung zur Normoxie zeigte. Die induzierte Hypoxie führte zu signifikanten Erhöhungen des oxidativen Stresses zwischen 8-23 % im Vergleich zur Normoxie (Abbildung 24).

Abbildung 24: Verhältnis des oxidativen Stresses der HMEC-1 von Hypoxie zu Normoxie nach immunsuppressiver Stimulation



Aufgrund des oxidativen Stress induzierenden Potentials können die Immunsuppressiva in zwei Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe, bestehend aus CS, MMF und Rapa, erhöht den oxidativen Stress unter normoxischen Bedingungen auf $20 \pm 7 \%$ bis $29 \pm 10 \%$ ($p < 0,019$) in der niedrigen und $27 \pm 6 \%$ bis $32 \pm 7 \%$ ($p < 0,004$) in der hohen Konzentration. Nach Hypoxie führten CS, MMF und Rapa zu einer Steigerung des oxidativen Stresses von $23 \pm 10 \%$ bis $34 \pm 15 \%$ ($p < 0,046$) in niedriger, und $23 \pm 10 \%$ bis $31 \pm 13 \%$ ($p < 0,033$) in hoher Konzentration (Abbildung 25 a und b). Die zweite Gruppe (MP und Tac) führte zu einer geringeren Steigerung des oxidativen Stresses von $6 \pm 5 \%$ bis $16 \pm 5 \%$ in niedrigen, und $8 \pm 3 \%$ bis $17 \pm 3 \%$ ($p < 0,027$) in hohen Konzentrationen unter Normoxie. Nach Hypoxie ergaben sich Zunahmen des oxidativen Stresses von $15 \pm 6 \%$ bis $17 \pm 9 \%$ in niedriger, und $9 \pm 3 \%$ bis $16 \pm 9 \%$ in hohen Konzentrationen. Tac zeigte einen geringeren, nicht signifikanten Anstieg des oxidativen Stresses in hoher Konzentration im Vergleich zur niedrigen Konzentration nach Hypoxie und beiden Konzentrationen bei Normoxie.

Abbildung 25: Immunsuppressive Induktion von oxidativem Stress unter Normoxie und Hypoxie

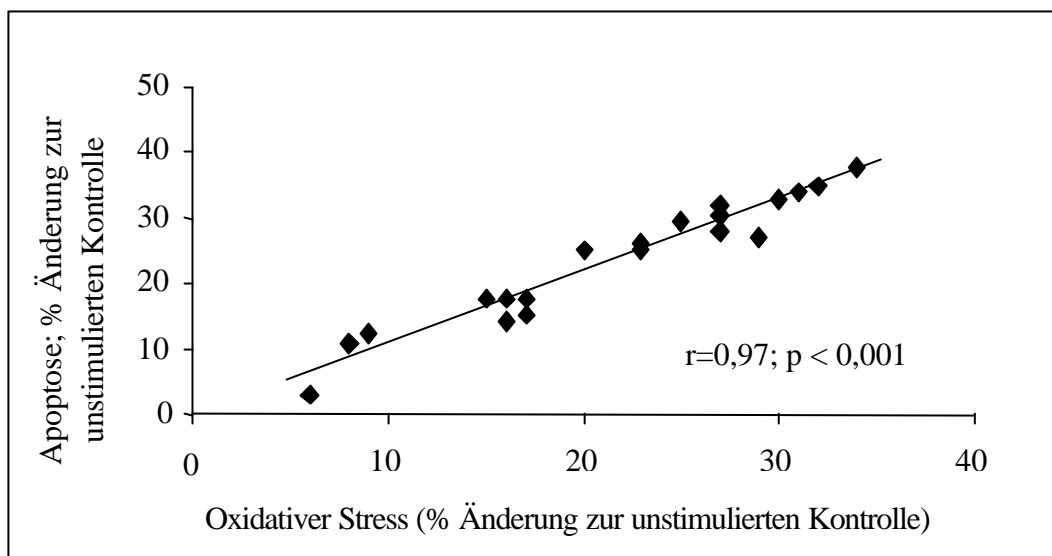


3.1.2. Apoptose (n=6)

HMEC-1 Stimulation mit Immunsuppressiva führte zu einem Anstieg des Annexin V- und Propidiumjodid – Signals. Aufgrund der langen Inkubationszeit von 16 h und 24 h Reoxigenierung erscheint die Apoptose als sekundäre Nekrose. Dies ist die Folge der fehlenden Phagozyten, die für den Abbau und die Aufnahme der apoptotischen Zellen und apoptotischen Körperchen sorgen. Durch Waschschrte während der experimentellen Durchführung werden tote Zellen, welche nicht mehr adhären sind, entfernt und ausschließlich die lebenden Zellen bleiben im well enthalten.

Der Apoptosezuwachs nach immunsuppressiver Stimulation war mit der Steigerung des oxidativen Stresses korreliert ($r = 0,97$; $p < 0,001$, Abbildung 3). CS, MMF und Rapa führten zu einem starken Anstieg der Apoptose von 26 ± 10 % bis 38 ± 16 % ($p < 0,05$) in niedriger und 24 ± 10 % bis 34 ± 14 % ($p < 0,04$) in hoher Konzentration nach Hypoxie. Bei Normoxie zeigten CS, MMF und Rapa erhöhte Apoptosesignale bei niedriger Konzentration von 25 ± 8 % bis 28 ± 10 % ($p < 0,02$) und bei hoher Konzentration von 32 ± 8 % bis 35 ± 9 % ($p < 0,01$). Eine geringere Steigerung der Apoptose zeigten MP und Tac im Vergleich zu CS, MMF und Rapa (nach Hypoxie: $18 \pm 6-9$ % [$p < 0,05$] in niedrigen, und 12 ± 4 % bis 17 ± 8 % [$p < 0,04$] in hohen Konzentrationen). Nach Normoxie induzierte MP keine signifikante Änderung der Apoptose, während Tac die Apoptose auf 2 ± 3 % in niedriger und 11 ± 3 % ($p < 0,05$) in hoher Konzentration erhöhte.

Abbildung 26: Die Korrelation von oxidativem Stress und Apoptose



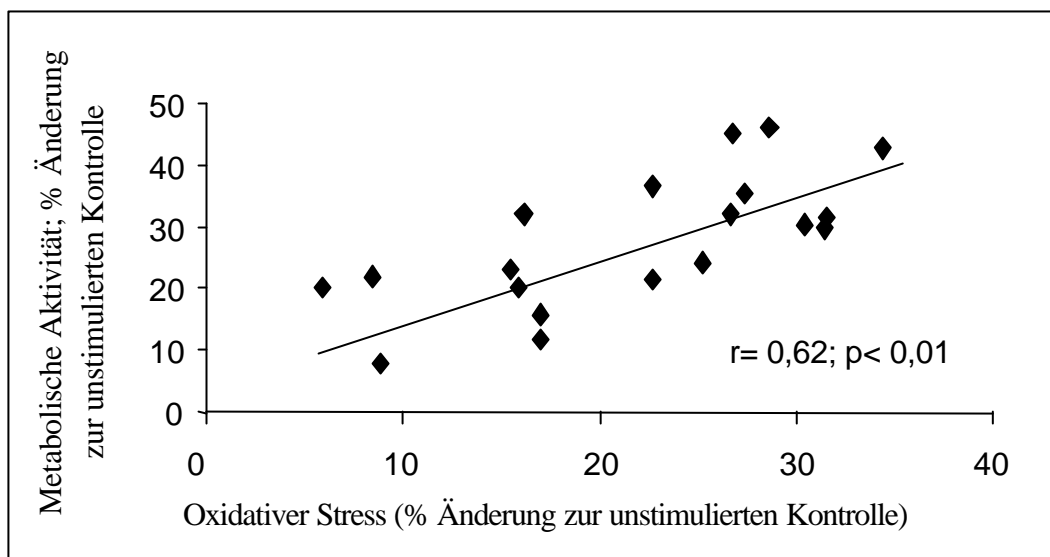
3.1.3. Metabolische Aktivität (n=6)

Die Zugabe von Immunsuppressiva zu den Endothelzellen erhöhte die metabolische Aktivität sowohl unter normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen. Die Induzierung der metabolischen Aktivität durch Immunsuppressiva korreliert mit der immunsuppressiven Induktion des oxidativen Stresses ($r = 0,62$; $p < 0,01$; Abbildung 4).

Dementsprechend lassen sich auch hier die Immunsuppressiva aufgrund ihrer Wirkung auf die metabolische Aktivität der HMEC-1 in zwei Gruppen einteilen: 1) CS, MMF und Rapa führten zu einem starken Zuwachs der metabolischen Aktivität, und 2) MP und Tac zeigten vergleichsweise einen geringeren Anstieg der metabolischen Aktivität.

Unter normoxischen Bedingungen wurde durch CS, MMF und Rapa die metabolische Aktivität auf 45 ± 11 % bis 50 ± 15 % ($p < 0,013$) in den niedrigen Konzentrationen erhöht im Vergleich zur den hohen Konzentrationen von 30 ± 9 % bis 32 ± 11 % ($p < 0,018$). Hypoxie verringerte die Steigerung im Vergleich zur Normoxie auf 35 ± 14 % bis 43 ± 20 % in den niedrigen und 21 ± 8 % bis 30 ± 12 % (stets $p < 0,04$) in den höheren Konzentrationen. MP und Tac zeigten bei Normoxie geringere Erhöhungen der metabolischen Aktivität von 20 ± 9 % ($p < 0,1$) in der niedrigen und 12 ± 3 % bis 22 ± 10 % in der hohen Konzentration. Nach Hypoxie zeigten sich zunehmende metabolisch Aktivitätswerte von 16 ± 13 % bis 23 ± 11 % (niedrige Konzentrationen) und 32 ± 9 % für MP bzw. 8 ± 4 % für Tac in der hohen Konzentration.

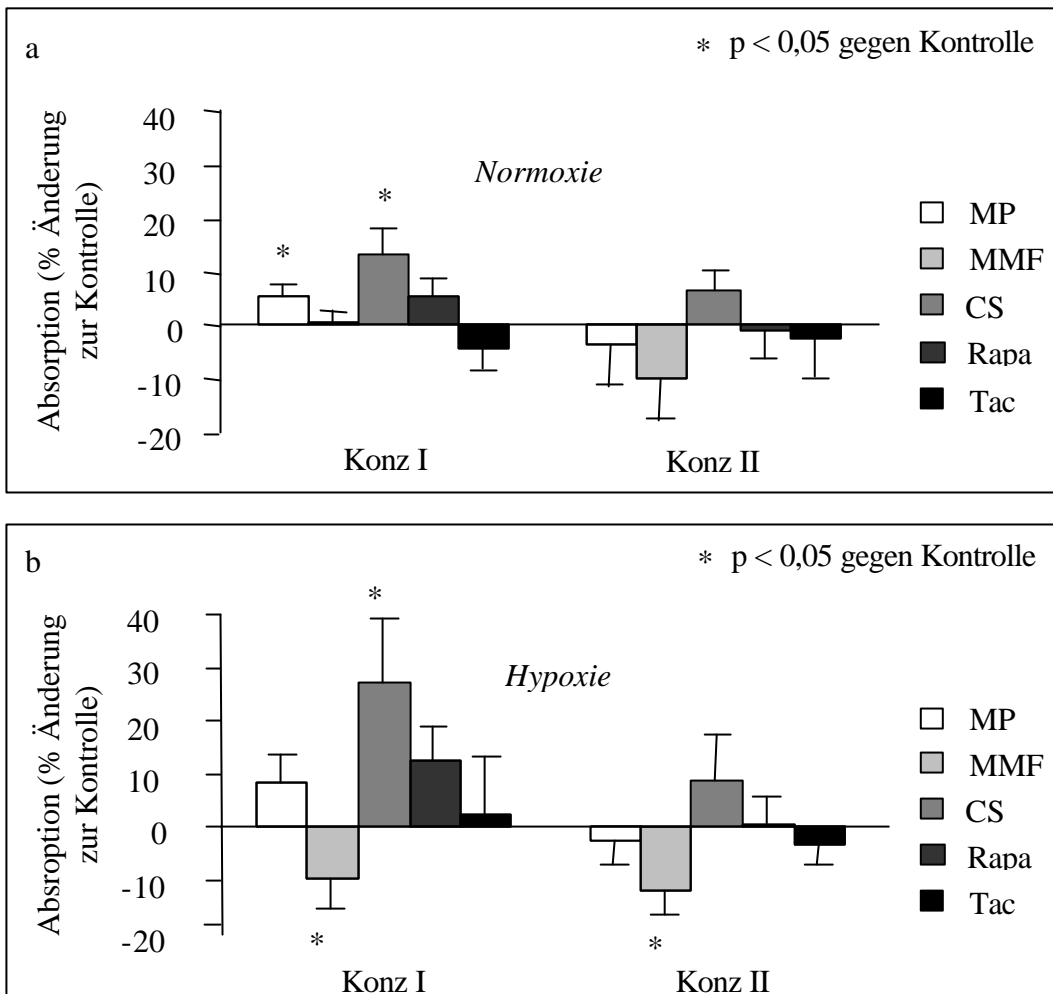
Abbildung 27: Die Korrelation von oxidativem Stress und metabolischer Aktivität



3.1.4. Endothelzell- Proliferation (n=6)

Die Stimulation mit CS in niedriger Konzentration erhöhte die Proliferation auf $14 \pm 5 \%$ ($p < 0,02$) unter normoxischen, und $27 \pm 12 \%$ ($p < 0,03$) unter hypoxischen Bedingungen, während die hohe Konzentration des CS keine signifikante Proliferationsänderung zeigte. Im Gegensatz dazu hemmte MMF die Proliferation, jedoch nur unter hypoxischen Konditionen (hohe Konzentration: $-10 \pm 6 \%$; $p < 0,05$; niedrige Konzentration: $-12 \pm 5 \%$; $p < 0,02$). Die Stimulation mit MMF unter Normoxie ergab eine nicht signifikante ($n < 1$) Reduktion der Proliferation um 10% ($\pm 7,9 \%$). Die niedrige Konzentration von MP steigerte hingegen die Proliferation bei Normoxie ($6 \pm 2 \%$; $p < 0,01$). Jedoch ergaben sich lediglich nicht signifikante Ergebnisse bei der hohen Konzentration von MP unter normoxischen Bedingungen und bei beiden Konzentration unter hypoxischen Bedingungen. Rapa und Tac zeigten generell keine signifikanten Änderungen der Proliferation (Abbildung 28).

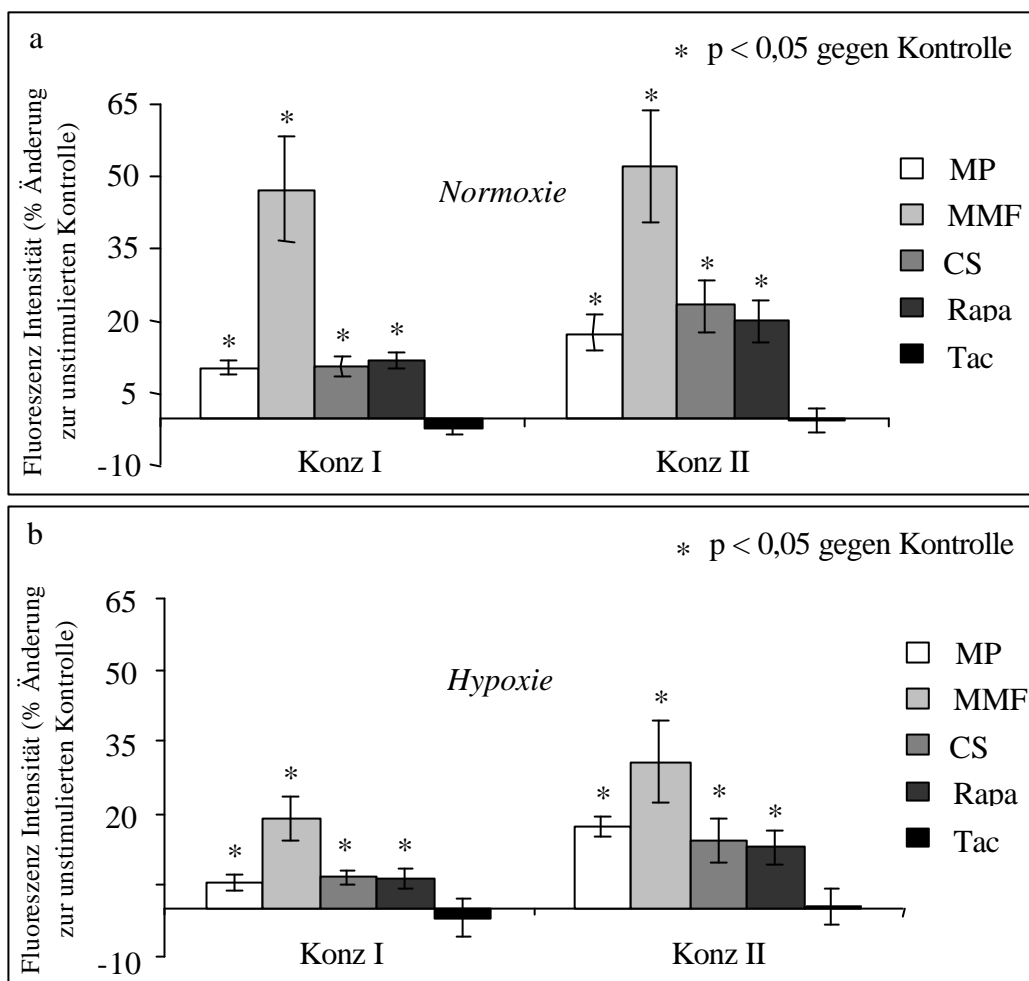
Abbildung 28: Änderung der Proliferation von HMEC-1 nach Immunsuppressiver Stimulation



3.1.5. NO Produktion (n=6)

MP, MMF, CS und Rapa induzierten eine dosisabhängige Steigerung der NO Produktion, während Tac zu keinen signifikanten Änderungen führte. Die MMF Stimulation der HMEC-1 ergab einen NO Produktionszuwachs von 47 ± 11 % ($p < 0,01$) in der niedrigen , und 52 ± 12 % ($p < 0,01$) in der hohen Konzentration bei Normoxie. Hypoxie führte zu einer geringeren Steigerung der NO Produktion von 19 ± 5 % ($p < 0,01$) der niedrigen, und 31 ± 9 % ($p < 0,01$) der hohen Konzentration von MMF. Die NO Produktion nahm durch MP, CS und Rapa auf 10 - 12 % ($p < 0,01$) in niedrigen Konzentrationen , und 17 - 23 % ($p < 0,1$) in hohen Konzentration bei Normoxie zu. Im Vergleich zur Normoxie reduzierte die Hypoxie die gesteigerte NO Produktion nach Stimulation mit MP, CS and Rapa auf 5 - 7 % ($p < 0,02$) in den niedrigen Konzentrationen, und 13 - 17 % ($p < 0,02$) in den höheren Konzentrationen (siehe Abbildung 29).

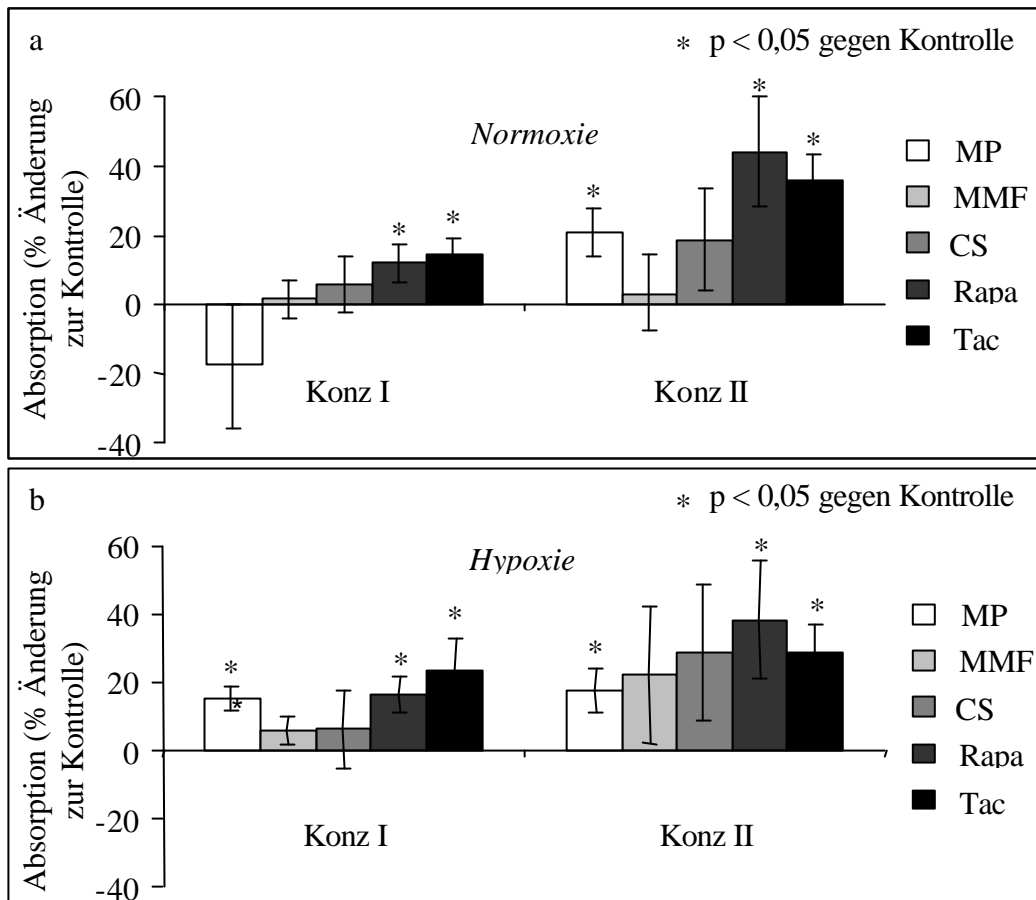
Abbildung 29: Einfluss der Immunsuppressiva auf die endotheliale NO-Produktion



3.1.6. Endothelin-1 (n=6)

Beide Konzentrationen von MMF und CS zeigten keine signifikante Änderung der ET-1 Freisetzung der Endothelzellen weder unter normoxischen noch unter hypoxischen Bedingungen. Bei Rapa und Tac ergaben sich dosisabhängige Steigerungen der ET-1 Freisetzung. Eine Stimulation mit Tac führte zu einer Erhöhung von ET-1 auf $14 \pm 4 \%$ ($p < 0,01$) in der niedrigen und $35 \pm 8 \%$ ($p < 0,003$) in der hohen Konzentration unter Normoxie und $23 \pm 9 \%$ ($p < 0,035$) bei niedriger, $28 \pm 8 \%$ ($p < 0,009$) bei hoher Dosis unter Hypoxie. Mit Rapa ergab sich eine gesteigerte ET-1 Freisetzung von $11 \pm 6 \%$ ($p < 0,5$) in niedriger und $44 \pm 16 \%$ ($p < 0,2$) in hoher Konzentration unter Normoxie. Durch Hypoxie / Reoxigenierung änderte sich die ET-1 Freisetzung bei Rapa auf $16 \pm 5 \%$ ($p < 0,02$) in niedriger und $38 \pm 8 \%$ ($p < 0,04$) in hoher Dosis. MP zeigte vergleichbare ET-1 Spiegel unter beiden Konzentrationen unter Hypoxie und der hohen Dosierung unter Normoxie ($17 \pm 3 \%$ to $20 \pm 7 \%$; $p < 0,025$; Abbildung 30). Die Ergebnisse für MP in niedriger Dosis unter Normoxie waren nicht signifikant.

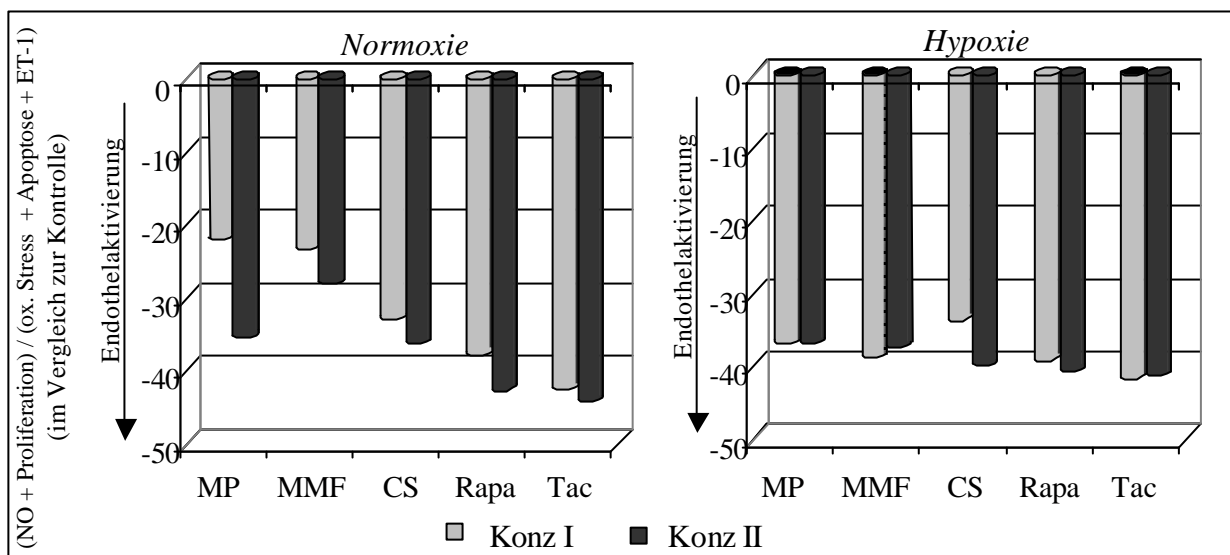
Abbildung 30: Immunsuppressive Stimulation und endotheliale ET-1 Freisetzung



3.1.7. Kumulativer Index der endothelialen Funktion (Cumulative endothelial function index CEFI)

Dieser Index wurde zur vereinfachten, schematischen Übersicht über alle gemessenen endothelialen Funktionen kreiert. Durch Integration der gemessenen Resultate nach Stimulation mit den einzelnen Immunsuppressiva kann eine grobe Einteilung der Substanzen aufgrund ihres endothelialen Aktivierungspotentials im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle erfolgen. Alle Immunsuppressiva führten zu einer dosisabhängigen, signifikanten ($p < 0,03$) Verschlechterung der Endothelfunktion verglichen zur unstimulierten Kontrolle; sowohl unter Normoxie als auch verstärkt nach Hypoxie / Reoxigenierung. Unter Normoxie (siehe Abbildung 8a) zeigten MP und MMF in der niedrigen Konzentration die geringste Endothelaktivierung (-22 bis $-23 \% \pm 7\%$ im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle). Bei CS, Rapa und Tac ergab der Index in der niedrigen Konzentration eine Verschlechterung der Endothelfunktion von -33 bis $-43 \% (\pm 2$ bis $4 \%)$. Auch in der hohen Konzentration führte MMF zu einer vergleichsweise geringen Aktivierung von $28 \pm 7 \%$, während sich bei hoher Dosis MP das Aktivierungspotential auf $-35 \pm 3 \%$ deutlich erhöhte. Die hohen Konzentrationen von CS, Rapa und Tac zeigten eine weitere, jedoch lediglich geringfügige Erhöhung des Aktivierungspotentials im Vergleich zur niedrigen Dosis auf -36 bis $44 \% (\pm 3-4 \%)$. Nach Hypoxie / Reoxigenierung (siehe Abbildung 8b) führte CS in der niedrigen Konzentration zu dem geringsten Aktivierungspotential von $-34 \pm 5 \%$, während die niedrigen Konzentrationen von MP, MMF, Rapa und Tac die Endothelfunktion um -37 bis $-42 \% (\pm 2$ bis $5 \%)$ im Vergleich zur Kontrolle verschlechterten. In den hohen Konzentrationen zeigten alle Immunsuppressiva ein erhöhtes Aktivierungspotential zwischen -37 und $-41 \% (\pm 3$ bis $6 \%)$.

Abbildung 31: Der kumulative endotheliale Index unter Normoxie und Hypoxie

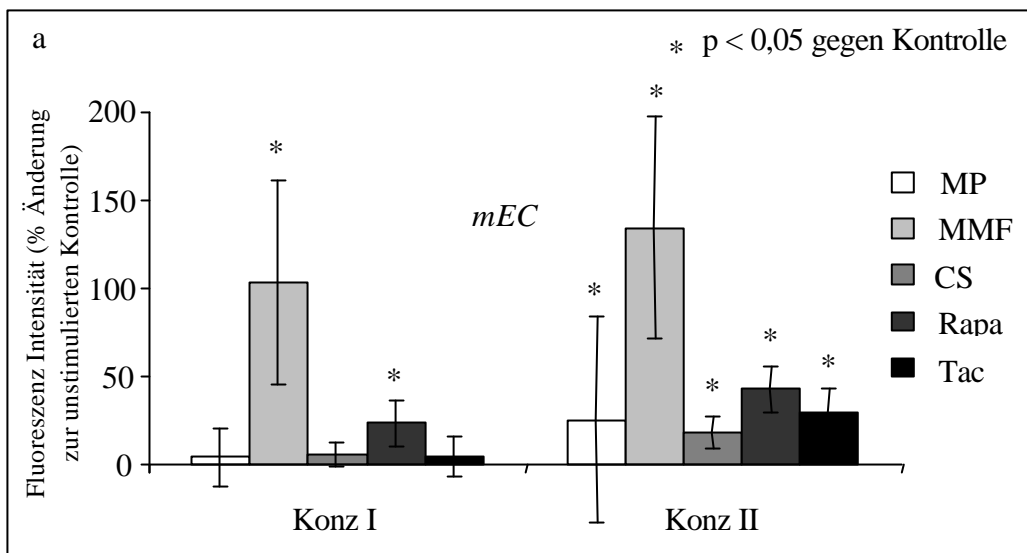


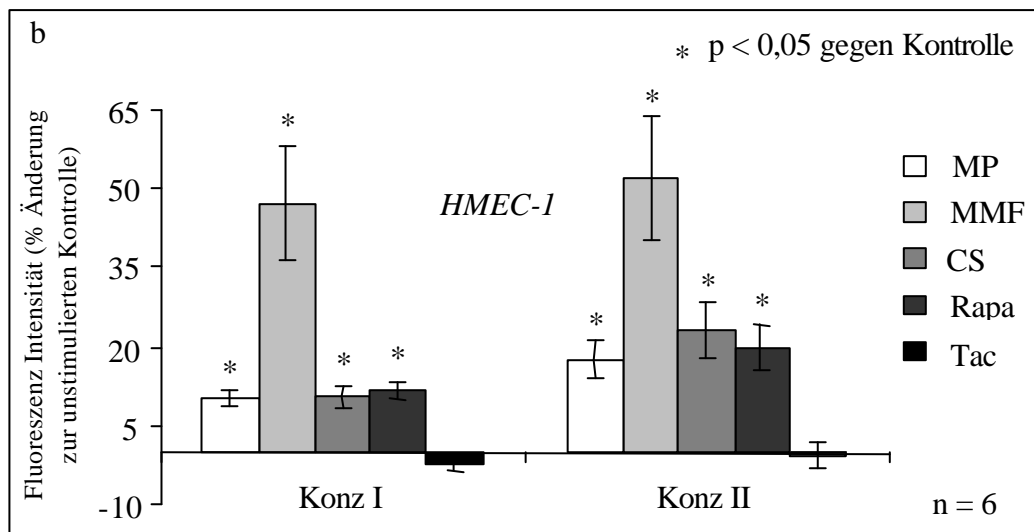
3.2. IMMUNSUPPRESSIVA UND ADHÄSION VON DENDRITISCHEN ZELLEN (MURIN)

3.2.1. mEC und NO (n = 5)

Die Untersuchung der NO Produktion von mEC bei Stimulation mit den verschiedenen Immunsuppressiva unter normoxischen Bedingungen zeigte ähnliche Ergebnisse wie bei der Stimulation der HMEC-1 (siehe Figur 9a und b). Die Stimulation der mEC mit MMF führte jedoch zu einer gesteigerten NO Produktion von $104 \pm 58 \%$ bzw. $135 \pm 63 \%$ (niedrige bzw. hohe Dosis) im Vergleich zu den Werten von $47 \pm 11 \%$ bzw. $52 \pm 12 \%$ bei der HMEC-1 Stimulation. Die NO Produktion von MP, CS und Tac in der niedrigen Dosis bei den mEC befand sich mit 4-5 % unterhalb der Testsensivität und war daher nicht signifikant. Rapa in niedriger Dosis zeigte bei den mEC eine NO Steigerung um $24 \pm 15 \%$ im Vergleich zu den HMEC-1 von ca. 12 %. In den hohen Konzentrationen zeigten alle Immunsuppressiva eine gesteigerte NO Produktion bei den mEC, während Tac bei den HMEC-1 zu keiner Erhöhung des NO führte. Insgesamt sind die Werte der einzelnen Stimulationen von mEC und HMEC-1 unterschiedlich, wobei die Verhältnisse doch sehr ähnlich erscheinen. Somit scheint die immunsuppressive Stimulation von mEC und HMEC-1 zu einem ähnlichen Verhalten der Zellen zu führen.

Abbildung 32: Vergleich der NO Produktion von HMEC-1 und murinen, aortalen EC





3.2.2. Adhäsionsassay von mDCs an mECs

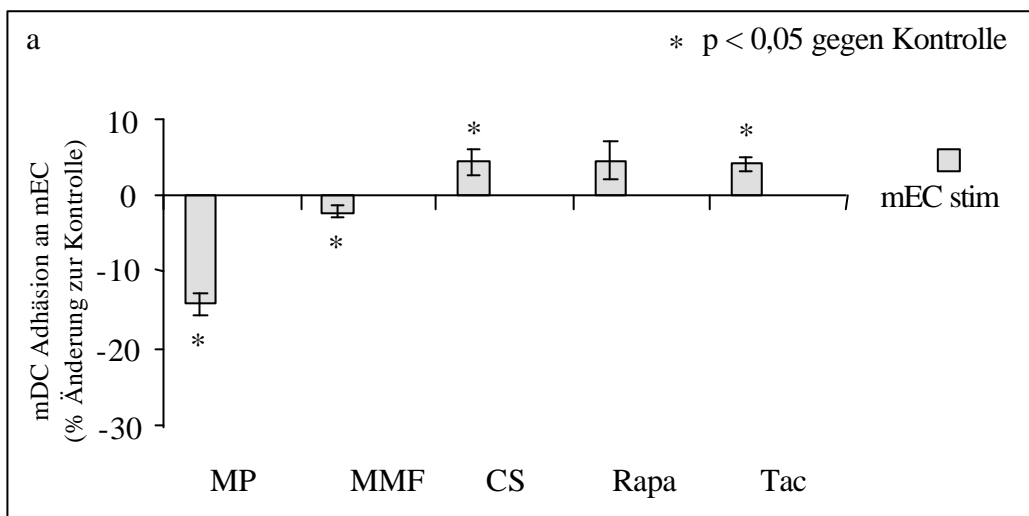
Stimulation der mECs mit niedrigen Konzentrationen der Immunsuppressiva (n = 4) führte zu einer signifikanten Verringerung der Adhäsion der mDCs durch MP ($-5 \pm 0,8 \%$; $p < 0,006$) und MMF ($-1,2 \pm 0,3 \%$, $p < 0,007$) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Auch die Stimulation der mDCs verringerte die Adhäsion um $-2 \pm 0,6\%$ ($p < 0,03$) bei niedriger Dosis MP und $-6 \pm 0,3 \%$ ($p < 0,01$) bei niedriger Dosis MMF. CS, Rapa und Tac in der niedrigen Konzentration zeigte bei keiner der Einzelstimulationen (weder bei mECs noch bei mDCs) signifikante Änderungen. Bei gleichzeitiger Stimulationen in den niedrigen Konzentrationen der Immunsuppressiva sowohl der mECs wie mDCs, auch während der Kokultivierung, ergab sich in allen Fällen eine Hemmung der mDC Adhärenz von -3 bis -10% ($\pm 1-4 \%$; $p < 0,05$) mit Ausnahme von Tac (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: mDC Adhäsion an mECs (immunsuppressive Stimulationen in niedriger Dosis)

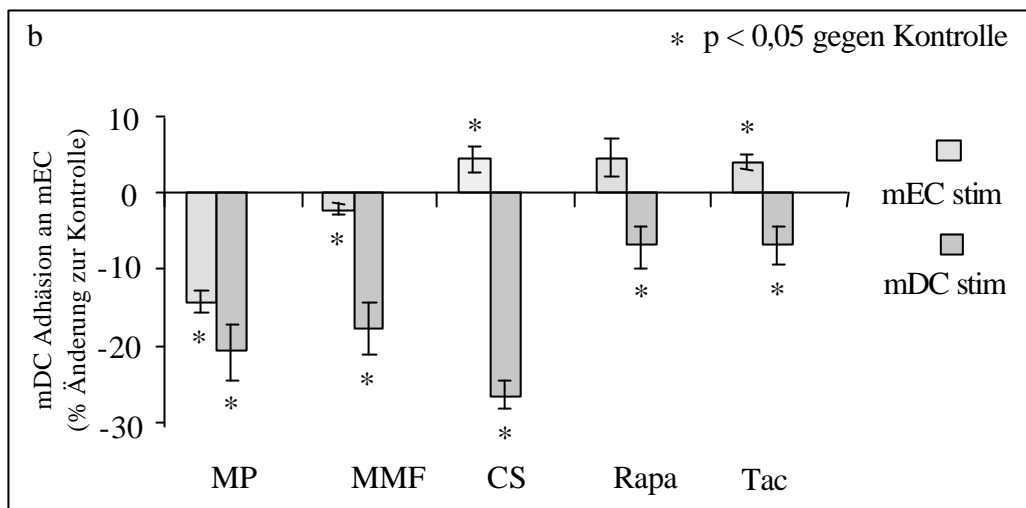
	mEC Stimulation niedrige Dosis			mDC Stimulation niedrige Dosis			mEC/ mDC Stimulation niedrige Dosis		
	MW	SEM	T-Test	MW	SEM	T-Test	MW	SEM	T-Test
MP	-4,7	0,8	0,006	-1,8	0,6	0,022	-8,9	1,4	0,004
MMF	-1,2	0,2	0,007	-6,0	0,3	0,000	-8,0	1,6	0,007
CS	-2,2	1,9	0,169	-8,3	4,2	0,072	-10,1	4,1	0,045
Rapa	0,1	0,2	0,342	-2,2	1,1	0,070	-3,3	1,1	0,029
Tac	-0,1	0,7	0,455	-1,6	1,8	0,219	-2,3	1,7	0,133

In den hohen Konzentrationen der Immunsuppressiva (n = 6) zeigte sich bei den stärker Endothel aktivierenden Substanzen CS und Tac (siehe S. 59) eine erhöhte Adhärenz der unstimulierten mDCs an die stimulierten mECs von 4 bis 4,3 % ± 1 bis 1,9 % (p < 0,04), bei Rapa eine nicht signifikante Steigerung der Adhärenz um 4,4 ± 2,5 % (p = 0.065). Die weniger Endothel aktivierenden Substanzen führten zu einer Verminderung der Adhärenz der mDCs um 14 ± 2 % (p < 0,01) bei MP und 2,2 ± 0,8 % (p < 0,03) bei MMF stimuliertem Endothel (siehe 33a).

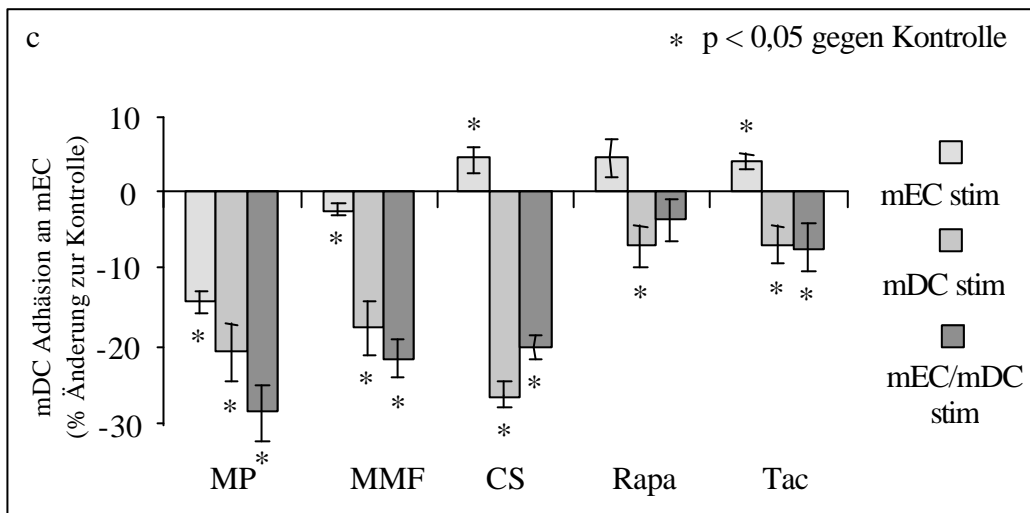
Abbildung 33: Adhäsion von mDCs an mECs (immunsuppressive Stimulation in hoher Dosis)



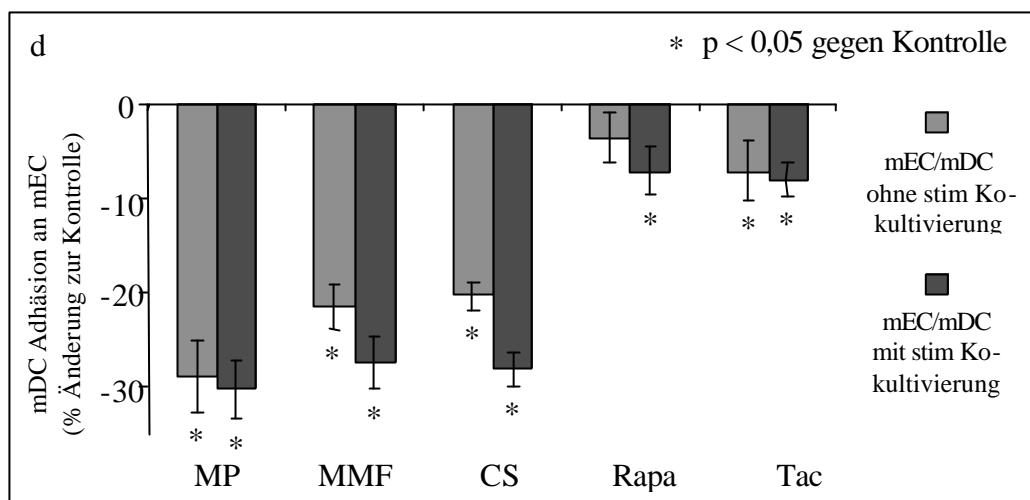
Eine immunsuppressive Stimulation mit den hohen Konzentrationen der mDCs ergab bei allen Substanzen eine deutliche Hemmung der mDC Adhäsion an das unstimulierte Endothel. CS führte zu der stärksten Adhäsionshemmung von -27 ± 2 %, gefolgt von MP mit -21 ± 4 % und MMF mit -18 ± 4 % (p < 0,01). Rapa und Tac zeigten eine im Verhältnis dazu geringere Inhibition von -7 ± 3 % mit einer Signifikanz von p < 0,03 (siehe 33b).



Die immunsuppressive Doppelstimulation in der hohen Dosis von sowohl mECs als auch mDCs resultierte ebenfalls in einer generellen Hemmung der mDC Adhäsion, wobei sich die Effekte der Einzelstimulationen von mEC und mDC summierten (siehe 33c). Somit führte hier MP zu der größten Adhäsionsinhibition von $-29 \pm 4 \%$, gefolgt von MMF mit $-22 \pm 3 \%$ und CS mit $-20 \pm 2 \%$ ($p < 0,01$). Tac ergab eine Hemmung von $-7 \pm 3 \%$ ($p < 0,04$) und zeigte damit in der Doppelstimulation eine höhere Inhibitionsrate als die Summe der Einzelstimulation. Rapa führte zu einer nicht signifikanten Hemmung von $-4 \pm 3 \%$ ($p = 0,12$).



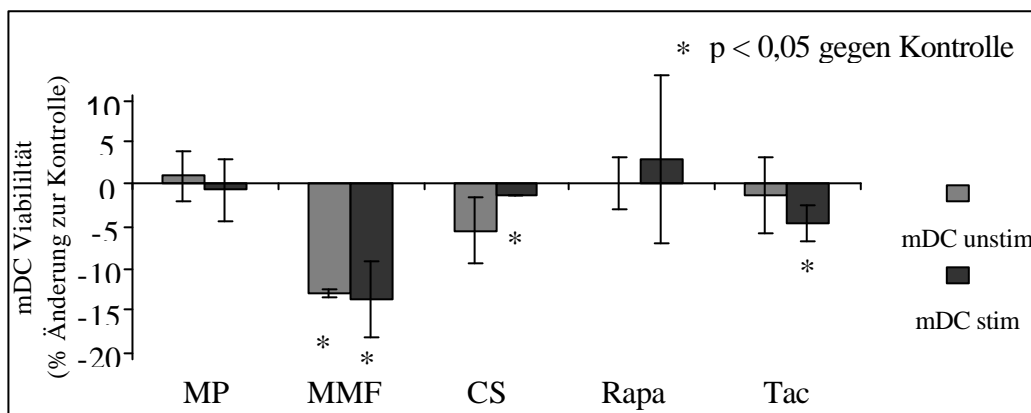
Eine zusätzliche immunsuppressive Stimulation während der Kokultivierung zu der Doppelstimulation der mECs und mDCs führte zu einer weiteren Steigerung der Adhäsionshemmung von -1 bis -8% (siehe 33d).



3.2.3. Viabilität der mDCs (n = 5)

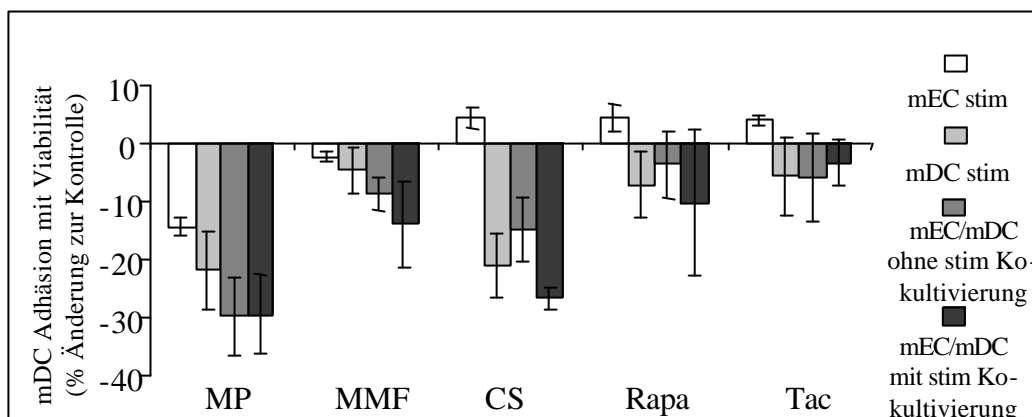
Die Viabilitätsprüfung der mDCs unter Normalbedingungen während der Kokultivierung ergab für die MMF mDC Stimulation einen deutlichen Rückgang von $-13 \pm 1 \%$ ($p < 0,01$), während die anderen Immunsuppressiva zu keinen signifikanten Ergebnissen führten (siehe Abbildung 34). Die zusätzliche mDC Stimulation während der Kokultivierung zeigte Viabilitätsänderungen von $-14 \pm 5 \%$ ($p < 0,03$) bei MMF, $-1,3 \pm 0,3 \%$ bei CS ($p < 0,04$) und $-5 \pm 2 \%$ Tac ($p < 0,05$). Die Ergebnisse für MP und Rapa waren nicht signifikant.

Abbildung 34: Viabilität von immunsuppressiv stimulierten mDC (WST-1)



Unter Einbeziehung der mDC Viabilität ergaben sich für den Adhäsionsassay (bezogen auf die nivellierte Gesamtzellzahl) veränderte Werte bei mDC Stimulation und Doppelstimulationen, besonders im Hinblick auf MMF. So zeigten sich bei der stimulierten Doppelstimulation der mECs und mDCs Änderungen von $-29 \pm 7 \%$ bei MP, $-14 \pm 7 \%$ bei MMF, $-27 \pm 2 \%$ bei CS, $-10 \pm 12 \%$ bei Rapa und $-3 \pm 4 \%$ bei Tac. Bei der mDC Stimulation führte die Berücksichtigung der Viabilität zu Werten von $-22 \pm 7 \%$ bei MP, $-5 \pm 4 \%$ bei MMF, $-21 \pm 6 \%$ bei CS, $-7 \pm 6 \%$ bei Rapa und $-6 \pm 7 \%$ bei Tac (siehe Figur 35).

Abbildung 35: Einfluss der mDC Viabilität auf die Ergebnisse der mDC Adhärenz an mECs



3.3. IMMUNSUPPRESSIVA UND GENEXPRESSION VON ADHÄSIONSMOLEKÜLEN UND EXTRAZELLULÄREN MATRIXPROTEINEN BEI MURINEN DENDRITISCHEN ZELLEN

3.3.1. RNA Isolierung aus unstimulierten und stimulierten mDCs (n = 3)

Die RNA-Isolierungen der stimulierten und unstimulierten mDCs ergaben eine Ausbeute zwischen 0,67 und 1,66 µg/µl mit einer Reinheit (260/280 nm) von 1,75 bis 1,95 (siehe Tabelle 2) mit scharfen Banden von S28 zu S18 im Verhältnis von 2:1 (Beispiel siehe Material und Methoden).

Tabelle 4: Ergebnisse der mDC RNA-Isolierung

	260 nm	280 nm	260/280 nm	Konzentration
K 1	0,804	0,438	1,84	1,64 µg/µl
MP 1	0,530	0,303	1,75	1,08 µg/µl
CS 1	0,343	0,194	1,77	0,70 µg/µl
Rapa 1	0,533	0,303	1,76	1,09 µg/µl
K 2	0,457	0,235	1,95	0,93 µg/µl
MP 2	0,540	0,302	1,79	1,10 µg/µl
CS 2	0,328	0,183	1,80	0,67 µg/µl
Rapa 2	0,644	0,348	1,85	1,31 µg/µl
K 3	0,631	0,347	1,82	1,23 µg/µl
MP 3	0,708	0,382	1,85	1,44 µg/µl
CS 3	0,813	0,450	1,81	1,66 µg/µl
Rapa 3	0,403	0,220	1,83	0,82 µg/µl

3.3.2. Genexpressionsanalyse (GEArray) der murinen DCs in Hinblick auf Adhäsionsmoleküle und extrazelluläre Matrixproteine (n = 3)

Der GEArray zeigte bei den unstimulierten mDCs starke Signale für Basigin, Caspase 8, Catherin alpha 1, CD44, Cytastin C, den Cathepsinen B und D, very late antigen – 4, der Integrin Untereinheit alpha X (= CD11c), dem Maus Analog von very late antigen – 5, der Integrin Untereinheit beta 2, der beta 2 Kette des Laminin, Hyaluronidase 5, den Matrix Metalloproteinase 12 und 8 und auch für L – Selektin. Schwächere, aber deutlich sichtbare Signale ergaben die Cathepsine E und H, das extrazelluläre Matrixprotein-1, die Integrin Untereinheiten alpha 5, alpha L, alpha M, beta 5 und beta 7, das junctional Adhäsionsmolekül, Laminin B1, MMP10 und 19, tissue Plaminogen Activator und E-Selektin (siehe Tabelle 5). Alle weiteren Sonden zeigten nur sehr schwache bis keine Signale für die Anwesenheit der entsprechenden cDNA.

Tabelle 5: Rohdaten des GEArrays für murine Adhäsionsmoleküle und extrazelluläre Matrix Proteine nach Abzug desHintergrundes und auf house keeping Gene bezogen

Starke Signale Mäßige Signale Die Grauschattierung dient nur der besseren Übersicht

Genliste	K MW	MP MW	CS MW	Rapa MW
Adamts 1	0,104	0,045	0,076	0,030
Adamts 8	0,055	0,003	0,045	0,016
Basignin mRNA	0,958	0,951	0,793	0,818
Casp 8	0,542	0,285	0,333	0,316
Casp 9 mRNA	0,120	0,060	0,078	0,054
Catenin alpha1	0,550	0,553	0,478	0,417
Catenin alpha2	0,001	0,017	0,043	0,001
Catenin alpha like 1	-0,017	-0,005	0,022	0,003
Catenin beta	0,939	0,745	0,784	0,770
Caveolin-1	0,095	0,026	0,046	0,041
CD44 antigen	1,017	0,867	0,803	0,890
E Cadherin	0,105	0,032	0,053	0,024
Cadherin 2	0,078	0,033	0,044	0,025
Cadherin 3	0,047	0,047	0,059	0,041
Cadherin 4	0,011	0,023	0,040	0,017
Mus musc. Cadherin 5	-0,004	0,002	0,044	0,016
Hepatitis virus receptor	0,203	0,057	0,121	0,092
Contactin 1	0,123	0,025	0,043	0,065
Procollagen typ 18 alpha 1	0,151	0,032	0,046	0,058
Collagen pro alpha 1 typ I chain	0,127	0,033	0,028	0,023
Col4a2	0,131	0,050	0,066	0,051
Cystatin C	0,976	1,002	0,917	0,981
Catenin delta 2	0,077	0,056	0,067	0,063
Cathepsin B	0,869	1,014	0,965	0,942
Cathepsin D	0,973	0,983	0,980	0,994
Cathepsin E	0,203	0,078	0,093	0,141
Cathepsin G	0,163	0,036	0,032	0,068
Cathepsin H	0,237	0,077	0,054	0,068
DDC	0,118	0,052	0,032	0,040
Extracellular matrix protein 1	0,224	0,118	0,145	0,117
mouse fibronectin mRNA	0,030	0,031	0,040	0,028
ICAM-1	0,162	0,065	0,125	0,176
LFA 1b = integrin alpha 2	0,145	0,045	0,094	0,100
Integrin alpha 2b (CD41b)	0,153	0,055	0,040	0,123
Integrin alpha 3 (CD49 c = b-cells)	0,156	0,065	0,047	0,111
VLA-4	1,000	0,685	0,640	0,822

3. ERGEBNISSE

Integrin alpha 5	0,304	0,147	0,100	0,125
Integrin alpha 6	0,189	0,120	0,094	0,129
Integrin alpha 7	0,036	0,052	0,036	0,034
Integrin alpha 8 mRNA	0,024	0,016	0,042	0,022
Integrin alpha E epithelial associated	0,142	0,048	0,038	0,093
Integrin alpha L mRNA	0,497	0,260	0,131	0,274
Integrin alpha V (CD11b)	0,142	0,058	0,046	0,092
Integrin alpha M	0,419	0,172	0,161	0,218
Integrin alpha X (CD 11C)	1,019	0,679	0,631	0,709
VLA 5 homolog mouse	0,954	0,778	0,766	0,814
Integrin beta 2 (CD 18 =Leukocytes)	0,754	0,394	0,291	0,530
Integrin beta 3	0,144	0,056	0,095	0,094
Integrin beta 4 subunit	0,128	0,036	0,029	0,109
Integrin beta 5	0,200	0,122	0,068	0,130
Integrin beta 6	0,156	0,091	0,050	0,098
Integrin beta 7	0,376	0,190	0,223	0,222
JAM	0,231	0,096	0,076	0,120
Laminin B1	0,281	0,191	0,155	0,223
Laminin B2 chain	0,578	0,307	0,263	0,458
Collagenase-like 1	0,022	0,030	0,028	0,026
Hyaluronidase 5	0,800	0,422	0,462	0,546
MMP 10 stomelysin 2	0,234	0,094	0,077	0,137
MMP 11 stomelysin 3	0,170	0,082	0,046	0,072
MMP 12 macrophage elastase	0,797	0,173	0,483	0,563
MMP 13 Collagenase 3	0,182	0,063	0,049	0,091
MMP 14 MT-1-MMP	0,074	0,061	0,026	0,043
MMP 15 MT-1-MMP	0,041	0,044	0,026	0,037
MMP 16 MT-1-MMP	0,017	0,019	0,022	0,031
MMP 17 MT-4-MMP	0,100	0,049	0,035	0,094
MMP 19	0,252	0,200	0,077	0,110
MMP 2 Gelatinase A	0,176	0,090	0,074	0,065
MMP20	0,177	0,073	0,034	0,068
MMP 23	0,106	0,054	0,033	0,053
MMP 24	0,072	0,062	0,034	0,062
MMP 3	0,065	0,061	0,054	0,076
MMP 7	0,029	0,028	0,040	0,036
MMP 8 collagenase 2	0,542	0,829	0,263	0,473
MMP 9 Gelatinase B	0,156	0,067	0,042	0,074
mouse mRNA for Ncam NCAM	0,177	0,067	0,052	0,070
Neural cell adhesion molecule Ncam	0,129	0,057	0,038	0,055
PECAM-1	0,091	0,058	0,030	0,065

3. ERGEBNISSE

tPA tissue Plasminogen activator	0,474	0,306	0,297	0,408
Urokinase Plasminogen activator uPA	0,963	1,032	0,947	0,993
uPA Receptor 2	0,085	0,044	0,100	0,094
E-selectin protein RNA, ELAM-1	0,362	0,234	0,180	0,281
Lymphocyte selectin L-selectin	0,683	0,799	0,156	0,336
P-selectin protein mRNA	0,123	0,074	0,061	0,063
Serine protease inhibitor 7 Maspin	0,107	0,045	0,023	0,054
Plasminogen activator inhibitor 1 PAI-1	0,082	0,057	0,020	0,060
Plasminogen activator inhibitor 2 PAI-2	0,059	0,049	0,048	0,082
SPARC secreted acidic cysteine rich glycoprot	0,123	0,064	0,108	0,141
Thrombospondin 1 mRNA	0,034	0,042	0,069	0,062
Thrombospondin 2 mRNA	0,042	0,036	0,033	0,058
Thrombospondin 3 THBS 3	0,110	0,064	0,055	0,072
Thrombospondin 4 mRNA	0,066	0,040	0,065	0,052
Tissue inhibitor for MMP 1= TIMP 1	0,066	0,050	0,028	0,054
Tissue inhibitor for MMP 2=TIMP 2	0,059	0,040	0,034	0,067
Zenascin C	0,053	0,051	0,063	0,104
VCAM-1	0,036	0,055	0,092	0,154
Vitronectin	0,040	0,058	0,090	0,126

Die Stimulation der mDCs mit MP reduzierte signifikant die Signale von Caspase 8, Cathepsin E, dem extrazellulären Matrixprotein-1, Interin Untereinheiten alpha L, alpha M und beta 2, die beta 2 Kette des Laminin, Hyaluronidase 5, den Matrix Metalloproteinase 10 und 12. Signifikante Steigerungen waren nicht ersichtlich. CS senkte signifikant die Signale der mDCs für Caspase 8, Cathepsin H, die Integrin Untereinheiten alpha 3, alpha 5, alpha L, alpha M und beta 5, das junctionale Adhäsionsmolekül 1, die beta 2 Kette des Laminin, die Matrix Metalloproteinase 8 und 10 und das L-Selektin. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Signalzunahmen. Die Rapa-Stimulation der mDCs hatte lediglich signifikante Signalabnahmen bei Caspase 8, Cathepsin H und Integrin Untereinheit alpha 5 zur Folge.

Die weiteren nicht erwähnten Ergebnisse wurden aufgrund des zu geringen Signals nicht berücksichtigt, sind aber mit den oben genannten Daten mit Fehlerabweichung und Signifikanzwerten der Tabelle 6 zu entnehmen.

3. ERGEBNISSE

Tabelle 6: Daten (GEArray) der immunsuppressiv stimulierten DCs im Verhältnis zu unstimulierten Kontrolle

Starke Signale der unstimulierten Kontrolle Mäßige Signale der unstimulierten Kontrolle

Die Grauschattierung stellt die berücksichtigten Daten mit ausreichender Signalstärke dar

Gen Liste	MP			CS			Rapa		
	MW	SEM	T-test	MW	SEM	T-test	MW	SEM	T-test
Adamts 1	-56	7	0,007	-24	10	0,071	-59	20	0,047
Adamts 8	-86	21	0,027	0	48	0,497	-52	58	0,233
Basigin mRNA	0	5	0,497	-15	20	0,268	-14	9	0,129
Casp 8	-44	8	0,017	-47	15	0,045	-45	5	0,007
Casp 9 mRNA	-46	8	0,015	-35	13	0,058	-55	14	0,03
Catenin alpha 1	18	26	0,278	-22	14	0,125	-30	11	0,057
Catenin alpha2	-65	286	0,421	680	1024	0,287	-45	262	0,439
Catenin alpha like 1	-194	120	0,124	-313	147	0,083	-47	86	0,32
Catenin beta	-20	9	0,078	-19	22	0,245	-18	8	0,068
Caveolin-1	-70	5	0,003	-47	25	0,1	-53	40	0,16
CD44 antigen	-14	11	0,166	-20	22	0,228	-12	11	0,184
E Cadherin	-79	16	0,019	-47	13	0,033	-76	11	0,009
Cadherin 2	-45	17	0,059	-27	19	0,144	-52	16	0,044
Cadherin 3	1495	1532	0,216	1406	1403	0,211	648	670	0,218
Cadherin 4	-1141	1179	0,217	-1703	1851	0,227	-497	510	0,216
Mus musc. Cadherin 5	-909	736	0,171	-78	1183	0,477	99	259	0,37
Hepatitis virus receptor	-76	8	0,006	-44	14	0,043	-51	22	0,074
Contactin 1	-84	9	0,006	-61	25	0,07	-35	65	0,322
Procollagen typ 18 alpha 1	-83	13	0,012	-68	19	0,036	-60	29	0,087
Collagen pro alpha 1 typ I chain	-78	16	0,02	-78	19	0,027	-82	13	0,013
Col4a2	-65	9	0,01	-52	13	0,027	-50	20	0,062
Cystatin C	3	1	0,101	-6	12	0,338	1	1	0,352
Catenin delta 2	-19	25	0,266	9	43	0,425	8	48	0,442
Cathepsin B	23	23	0,211	15	12	0,175	13	18	0,263
Cathepsin D	1	2	0,345	1	2	0,396	2	3	0,283
Cathepsin E	-66	14	0,022	-50	24	0,088	-18	61	0,396
Cathepsin G	-81	15	0,017	-76	23	0,039	-53	36	0,137
Cathepsin H	-68	25	0,057	-75	19	0,03	-68	21	0,043
DDC	-67	25	0,056	-65	21	0,044	-67	18	0,033
Extracellular matrix protein 1	-55	18	0,047	-34	27	0,167	-45	18	0,065
mouse fibronectin mRNA	-15	74	0,43	63	52	0,173	-18	18	0,214
ICAM-1	-58	14	0,028	-28	20	0,149	0	34	0,496
LFA 1b = integrin alpha 2	-74	14	0,016	-39	24	0,12	-29	49	0,303
Integrin alpha 2b (CD41b)	-73	17	0,024	-70	26	0,058	-10	73	0,451

3. ERGEBNISSE

Integrin alpha 3 (CD49 c = b-cells)	-65	28	0,073	-69	24	0,049	-32	37	0,24
VLA-4	-32	18	0,108	-37	25	0,14	-18	15	0,178
Integrin alpha 5	-53	30	0,108	-69	14	0,018	-61	16	0,033
Integrin alpha 6	-37	30	0,174	-57	20	0,052	-38	17	0,08
Integrin alpha 7	8	52	0,449	26	61	0,357	-1	42	0,488
Integrin alpha 8 mRNA	-2	49	0,487	241	159	0,135	99	105	0,222
Integrin alpha E epithelial associated	-66	20	0,039	-68	20	0,039	-19	60	0,392
Integrin alpha L mRNA	-51	17	0,048	-76	8	0,006	-50	19	0,058
Integrin alpha V (CD11b)	-71	23	0,046	-62	28	0,076	-33	50	0,286
Integrin alpha M	-64	20	0,04	-65	14	0,02	-54	20	0,057
Integrin alpha X (CD 11C)	-34	15	0,077	-38	19	0,091	-29	21	0,151
VLA 5 homolog mouse	-19	13	0,139	-23	27	0,243	-16	15	0,19
Integrin beta 2 (CD 18 =Leukocytes)	-51	17	0,049	-49	30	0,125	-21	34	0,303
Integrin beta 3	-26	35	0,268	46	71	0,293	27	74	0,375
Integrin beta 4 subunit	-73	20	0,034	-76	14	0,017	-11	53	0,428
Integrin beta 5	-48	32	0,136	-68	12	0,016	-40	35	0,186
Integrin beta 6	-57	26	0,079	-68	19	0,035	-41	52	0,253
Integrin beta 7	-61	22	0,052	-40	28	0,145	-41	30	0,152
JAM	-61	23	0,06	-70	8	0,007	-57	24	0,068
Laminin B1	-38	26	0,138	-44	21	0,085	-7	54	0,452
Laminin B2 chain	-50	12	0,026	-54	18	0,045	-19	26	0,265
Collagenase-like 1	102	263	0,367	-83	186	0,349	83	252	0,387
Hyaluronidase 5	-47	12	0,029	-50	22	0,079	-37	18	0,088
MMP 10 stomelysin 2	-70	17	0,027	-71	14	0,018	-42	38	0,192
MMP 11 stomelysin 3	-62	30	0,086	-75	12	0,013	-59	33	0,11
MMP 12 macrophage elastase	-83	16	0,018	-49	24	0,089	-41	30	0,148
MMP 13 Collagenase 3	-76	17	0,023	-75	13	0,015	-64	34	0,101
MMP 14 MT-1-MMP	-39	35	0,188	-61	28	0,079	-42	61	0,28
MMP 15 MT-1-MMP	-8	55	0,451	-12	46	0,406	45	114	0,367
MMP 16 MT-1-MMP	178	269	0,287	-47	162	0,399	114	352	0,388
MMP 17 MT-4-MMP	-57	10	0,015	-70	10	0,01	-4	62	0,476
MMP 19	-28	29	0,217	-70	13	0,015	-52	32	0,122
MMP 2 Gelatinase A	-61	23	0,061	-65	12	0,016	-66	33	0,09
MMP20	-64	31	0,086	-83	6	0,003	-69	24	0,051
MMP 23	-50	25	0,09	-66	5	0,003	-87	52	0,117
MMP 24	-32	25	0,164	-54	24	0,075	-6	58	0,465
MMP 3	-19	39	0,337	0	42	0,497	63	89	0,277
MMP 7	0	147	0,499	-49	224	0,424	-79	224	0,378
MMP 8 collagenase 2	84	51	0,121	-57	19	0,048	0	49	0,499
MMP 9 Gelatinase B	-64	20	0,042	-76	13	0,013	-44	42	0,202
mouse mRNA for Ncam NCAM	-70	12	0,014	-76	6	0,003	-61	33	0,102

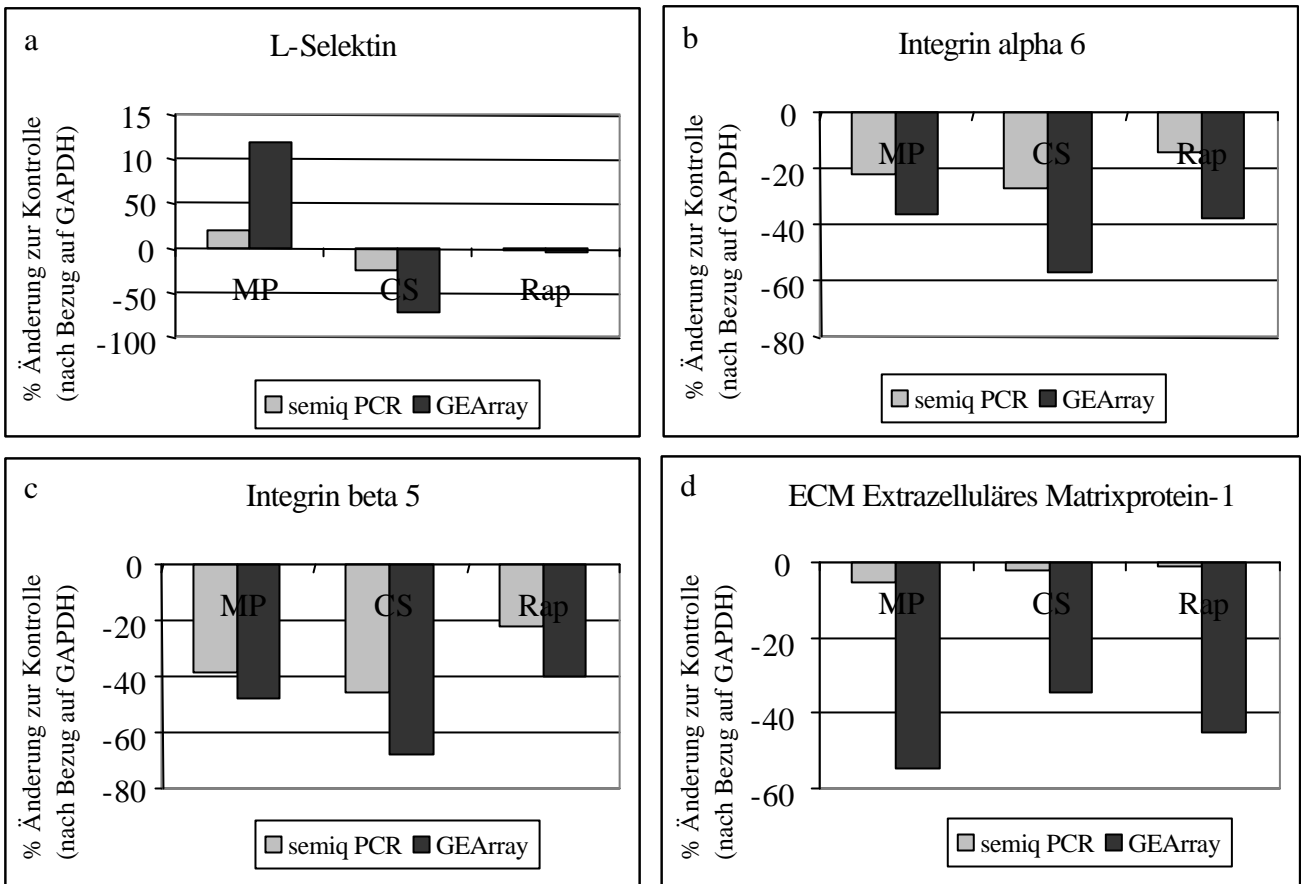
3. ERGEBNISSE

Neural cell adhesion molecule Ncam	-62	20	0,047	-73	6	0,003	-62	34	0,104
PECAM-1	-45	19	0,068	-68	9	0,008	-33	58	0,313
tPA tissue Plasminogen activator	-30	20	0,133	-32	32	0,211	13	55	0,418
Urokinase Plasminogen activator uPA	7	3	0,088	-2	2	0,274	3	4	0,265
uPA Receptor 2	2	52	0,485	103	95	0,196	96	87	0,193
E-selectin protein RNA, ELAM-1	-31	21	0,139	-54	31	0,11	8	62	0,456
Lymphocyte selectin L-selectin	119	132	0,232	-74	14	0,018	-5	60	0,472
P-selectin protein mRNA	-52	21	0,065	-63	22	0,050	-43	41	0,204
Serine protease inhibitor 7 Maspin	-70	17	0,026	-86	19	0,022	-31	48	0,294
Plasminogen activator inhibitor 1 PAI-1	-42	19	0,08	-83	9	0,006	-22	51	0,354
Plasminogen activator inhibitor 2 PAI-2	-3	21	0,446	6	48	0,459	225	248	0,229
SPARC secreted acidic cysteine rich glycoprot	-38	19	0,088	-10	35	0,397	58	75	0,261
Thrombospondin 1 mRNA	-252	358	0,277	339	495	0,282	117	441	0,408
Thrombospondin 2 mRNA	-13	37	0,379	-33	67	0,334	77	89	0,237
Thrombospondin 3 THBS 3	-45	26	0,114	-57	41	0,148	-12	48	0,412
Thrombospondin 4 mRNA	-45	26	0,11	-35	66	0,324	-5	61	0,474
Tissue inhibitor for MMP 1= TIMP 1	-44	31	0,147	-75	23	0,041	-18	48	0,374
Tissue inhibitor for MMP 2=TIMP 2	-42	21	0,09	-57	30	0,099	1	42	0,491
Zenascin C	54	73	0,268	-18	62	0,399	247	203	0,174
VCAM-1	258	239	0,197	144	128	0,189	505	209	0,069
Vitronectin	715	638	0,189	378	423	0,233	493	352	0,148

3.3.3. Semiquantitative PCR von mDC cDNA aus RNA zur Evaluierung des GEMArray

Für die semiquantitative PCR wurden Beispiele des GEMArrays von stimulierten mDC mit möglichst großen Signalunterschieden zu der unstimulierten Kontrolle gewählt, um bei dieser relativ ungenauen Methode ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten (Foto des Gels, siehe S. 46). Die Tendenz der Ergebnisse der semiquantitativen PCR für die verschiedenen Adhäsionsmolekülgruppen der Selektine und Integrine, sowie des Extrazellulären Matrix Proteins entspricht den Ergebnisse des GEMArray (siehe Abbildung 36, Figuren a bis d).

Abbildung 36 : Überprüfung der Ergebnisse des GEMArray (murin) anhand semiquantitativer PCR



3.4. IMMUNSUPPRESSIVA UND GENEXPRESSION VON ADHÄSIONSMOLEKÜLEN UND EXTRAZELLULÄREN MATRIXPROTEINEN BEI HUMANEN MYELOIDEN DENDRITISCHEN ZELLEN

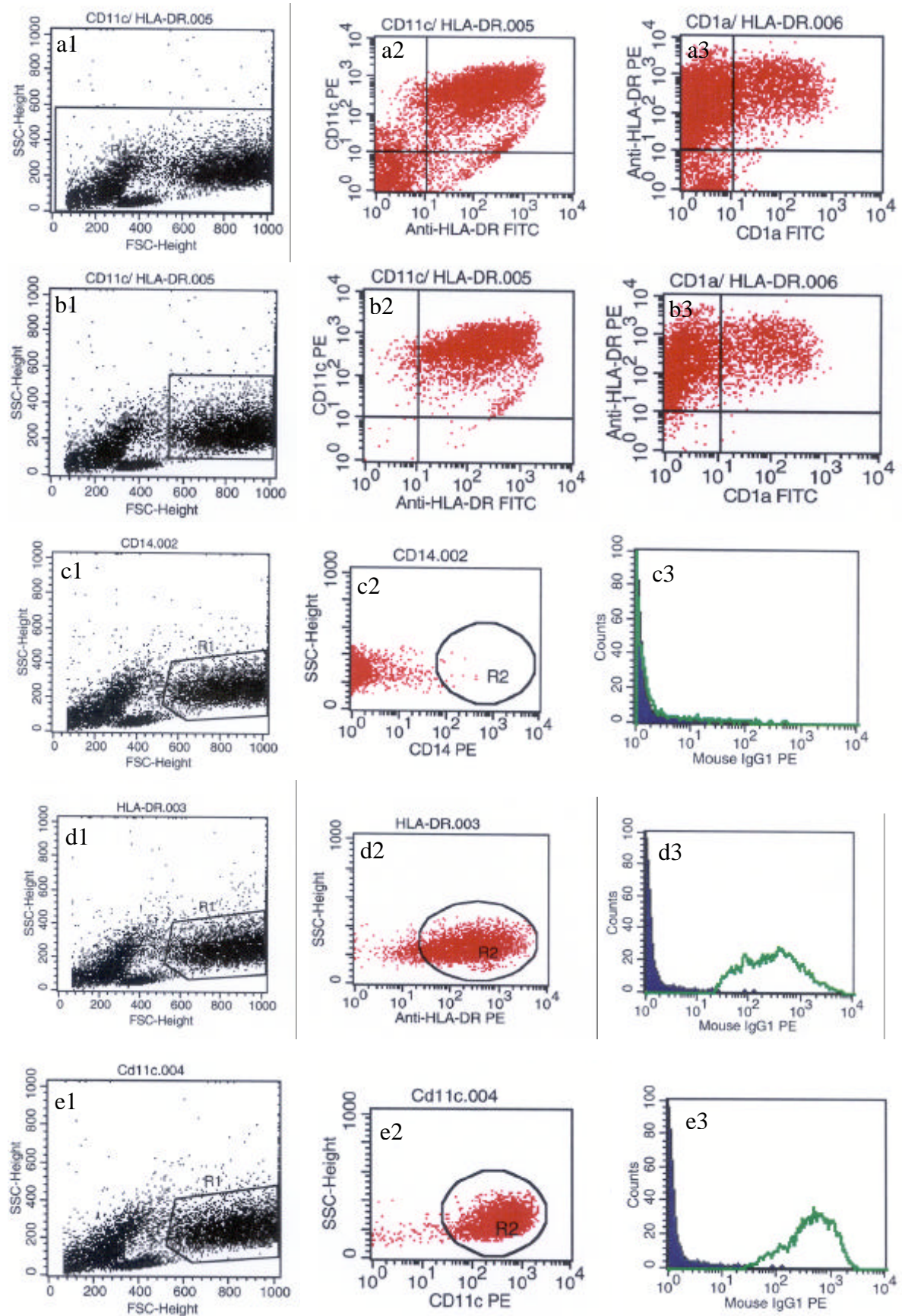
3.4.1. Überprüfung der humanen myeloiden DCs (hDCs) aus Vollblut mittels FACS-Analyse

Die FACS-Analyse der hDCs (Abbildung 37) zeigte so gut wie kein Signal für CD14 (siehe Abbildungen c). Im Gesamtüberblick (Abbildung a1) ergaben 63,56 % der hDCs ein positives Signal für sowohl CD11c als auch HLA-DR (doppelt positiv, oben rechts Abbildung a2); 3,33 % der Zellen waren einfach positiv auf HLA-DR (Abbildung a2 unten rechts) und 5,65 % einfach positiv auf CD11c (Abbildung a2 oben links). Die Doppelfärbung von HLA-DR und CD1a zeigte im Gesamtüberblick 21,13 % der Zellen doppelt positiv (Abbildung a3 oben rechts); 50,98 % der Zellen ergaben ein einfach positives Ergebnis auf HLA-DR (Abbildung a3 oben rechts) und 0,39 % ein einfach positives Signal auf CD1a (Abbildung a3 unten rechts). 26,13 bis 26,16 % der hDCs zeigten ungegated kein Signal für CD11c, CD1a und HLA-DR (siehe Abbildungen a2 und a3 unten links).

Die Einschränkung auf die Zellpopulation ohne Berücksichtigung von Zelltrümmern und ähnlichem (siehe Abbildung b1) wies eine 96,45 prozentige Doppelfärbung für CD11c und HLA-DR auf (Abbildung b2 oben rechts), nur 3,02 % der Zellen zeigten ein einfach positives Signal für CD11c (Abbildung b2 oben links) und 0,3 % ein einfach positives Signal für HLA-DR (Abbildung b2 unten rechts). 0,22 % der Zellen waren HLA-DR und CD11c doppelt negativ. 66,18 % der gegateten Zellen erschienen HLA-DR und CD1a doppelt positiv (Abbildung b3 oben rechts); 31,83 % ergaben ein HLA-DR einfach positives Signal (Abbildung b3 oben links) und nur weitere 0,08 % ein CD1a einfach positives Signal (Abbildung b3 unten rechts). Lediglich 0,22 bis 1,92 % der Zellen erschien negativ auf sowohl CD11c, CD1a und HLA-DR (Abbildungen b2 und b3 unten links).

Alle Färbungen sind nochmals einzeln mit Ergebnissen des jeweiligen Isotyps (dunkle Kurve in den Abbildungen c3, d3 und e3) in den Abbildungen c, d und e zu sehen.

Abbildung 37: FACS-Analyse der hDCs



3.4.2. RNA Isolierung aus unstimulierten und stimulierten humanen, myeloiden DCs (n = 1)

Die Isolierung der RNA aus unstimulierten humanen myeloiden DCs, sowie nach 24 h Stimulation mit den hohen Konzentrationen der Immunsuppressiva MP, CS und Rapa ergaben folgende Reinheiten und Konzentrationen:

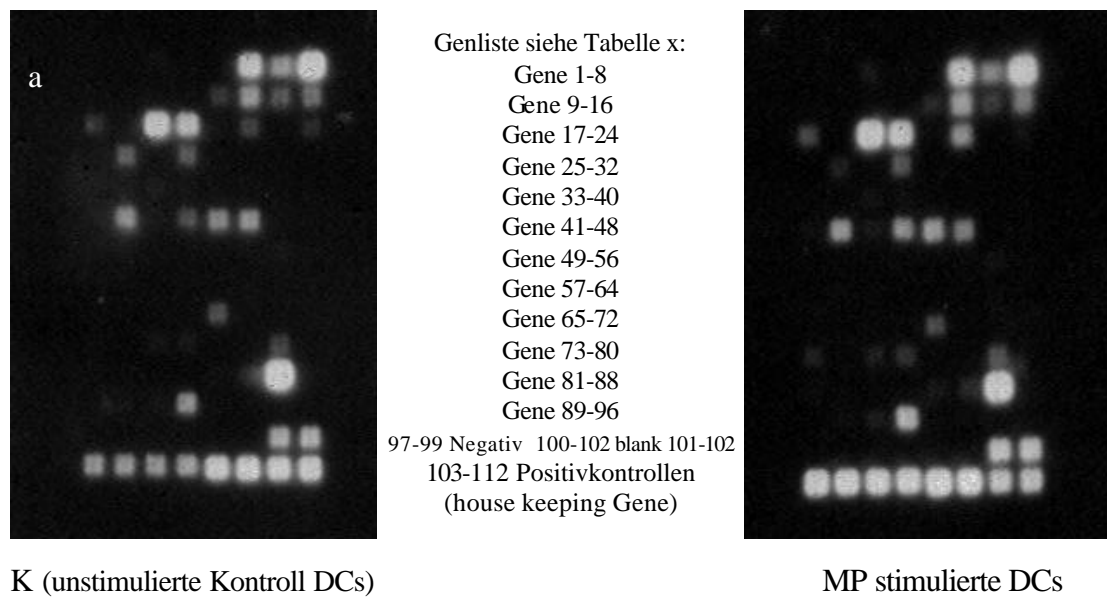
Tabelle 7: Ergebnisse der hDC RNA-Isolierung

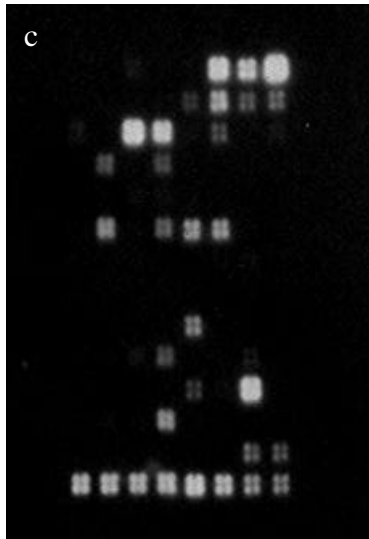
	260 nm	280 nm	260/280 nm	Konzentration
K 1	0,400	0,210	1,81	0,82 µg/µl
MP 1	0,363	0,197	1,84	0,74 µg/µl
CS 1	0,699	0,376	1,86	1,43 µg/µl
Rapa 1	0,233	0,122	1,91	0,48 µg/µl

3.4.3. Genexpressionsanalyse (GEArray) der humanen, myeloiden DCs in Hinblick auf Adhäsionsmoleküle und extrazelluläre Martixproteine (n = 1)

Die Abbildung der invertierten Scanbilder der Filme visualisiert die Signale der Membranen über Chemilumineszenz. Die zugehörigen Gene der entsprechenden Position sind in Tabelle 8 ersichtlich.

Abbildung 38: Invertierte Bilder des GEArrays (human)



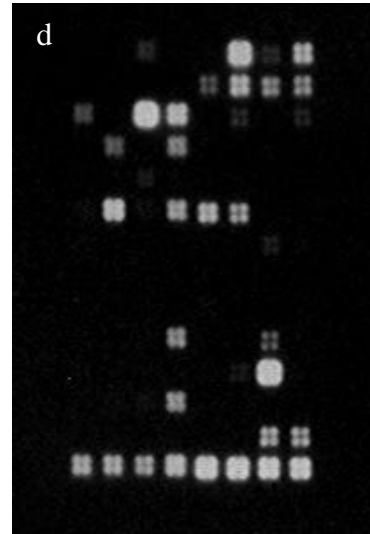


CS stimulierte DCs

Genliste siehe Tabelle x:

- Gene 1-8
- Gene 9-16
- Gene 17-24
- Gene 25-32
- Gene 33-40
- Gene 41-48
- Gene 49-56
- Gene 57-64
- Gene 65-72
- Gene 73-80
- Gene 81-88
- Gene 89-96

97-99 Negativ 100-102 blank 101-102
103-112 Positivkontrollen
(house keeping Gene)



Rapa stimulierte DCs

Die Signale des GEArray zeigen durch die immunsuppressive Stimulation der hDCs ein deutlich verändertes Expressionsmuster (gesamte Daten siehe Tabelle x). So wird durch CS und Rapa Stimulation die Caspase 8 RNA deutlich stärker exprimiert. CS zeigt eine extreme Steigerung des CD 44, E-Cadherin und CEACAM-5, während Rapa die E-Cadherin Expression klar reduziert. Cytastin C wird wiederum durch CS und Rapa gesteigert, durch MP eher gehemmt exprimiert. Die Catenin Untereinheiten zeigen durch CS stark gesteigerte, durch Rapa leichte erhöhte und durch MP eher leicht verringerte Signale. Cathepsin B, D und L wird vorwiegend durch CS hochgeregelt. Cathepsin L führt erstmals auch zu einem erkennbaren Anstieg durch MP. Die RNA des extrazellulären Matrixproteins-1 und des Fibronectin 1 wird durch MP Stimulation stark verringert, während CS Fibronectin 1 deutlich erhöht. ICAM-1 RNA Expression wird durch CS und Rapa Stimulation erhöht, MP führt hier zu einer leichten Abnahme. Die Integrin Untereinheiten alpha M, alpha X (= CD11c), beta 1 und beta 2 zeigen durch CS drastische, durch Rapa deutliche Erhöhungen des Signals. MP steigert leicht die Integrin alpha X, und senkt die Integrin alpha M und beta 2 RNA Synthese. Die Matrix Metalloproteinase 26 RNA wird bei CS Stimulation drastisch erhöht, durch Rapa stark und MP leicht gesenkt. Ausschließlich nach CS Stimulation wird ein Signal für die Plasminogen activator inhibitor 1 RNA sichtbar. Auch platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1) zeigt erst nach Stimulation mit CS und Rapa ein deutliches, ausgeprägtes Signal, wie auch Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) durch CS. Bei secreted phosphoprotein 1 (SPP1) und Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 werden RNA Syntheseraten lediglich

wieder durch die CS Stimulation drastisch erhöht. Die weiteren, nicht erwähnten Ergebnisse werden aufgrund des zu geringen Signals nicht berücksichtigt.

Tabelle 8 : Auswertung des GEMArray für humane Adhäsionsmoleküle und extrazelluläre Matrix Proteine (von oben links nach unten rechts) nach Abzug des Hintergrundes und Bezug auf das house keeping Gen GAPDH

Die Grauschattierung markiert die relevanten Daten mit ausreichender Signalstärke

Gen Liste mit Membranposition		K	MP	CS	Rapa
A disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif, 1	1	0,03	0,03	0,05	0,00
Homo sapiens a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 mo	2	0,02	0,04	0,04	0,01
Caspase 8, apoptosis -related cysteine protease	3	0,04	0,08	0,25	0,23
Caspase 9, apoptosis -related cysteine protease	4	0,03	0,04	0,07	0,02
Caveolin 1, caveolae protein, 22kD	5	0,06	0,05	0,11	0,03
CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)	6	1,16	1,24	2,56	1,21
Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	7	0,87	0,63	2,44	0,25
Homo sapiens carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5 (CEACAM5)	8	1,19	1,29	2,59	1,12
Contactin 1	9	0,05	0,05	0,04	0,00
Collagen, type XVIII, alpha 1	10	0,03	0,04	0,05	0,01
Collagen, type I, alpha 1	11	0,05	0,05	0,08	0,01
Collagen, type IV, alpha 2	12	0,04	0,05	0,09	0,01
Homo sapiens cystatin C (amyloid angiopathy and cerebral hemorrhage) (CST3),	13	0,27	0,16	0,61	0,49
Catenin (cadherin-associated protein), alpha 1 (102kD)	14	0,87	0,87	2,12	1,13
Catenin (cadherin-associated protein), alpha-like 1	15	0,48	0,22	1,04	0,85
Catenin (cadherin-associated protein), beta 1 (88kD)	16	0,64	0,59	1,23	0,86
Catenin (cadherin-associated protein), delta 1	17	0,26	0,26	0,20	0,43
Catenin (cadherin-associated protein), delta 2	18	0,09	0,06	0,05	0,02
Cathepsin B	19	1,17	1,25	2,62	1,27
Cathepsin D (lysosomal aspartyl protease)	20	1,09	1,20	2,50	1,19
Homo sapiens cathepsin G (CTSG),	21	0,08	0,07	0,16	0,01
Cathepsin L	22	0,34	0,73	0,92	0,26
Deleted in colorectal carcinoma	23	0,04	0,04	0,10	0,01
Homo sapiens extracellular matrix protein 1 (ECM1), transcript variant 1	24	0,20	0,08	0,22	0,21
Fibrinogen, B beta polypeptide	25	0,09	0,04	0,00	0,01
Fibronectin 1	26	0,52	0,11	0,92	0,54
Homo sapiens heparanase mRNA	27	0,10	0,06	0,09	0,03
Intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor	28	0,48	0,34	0,86	0,82
Integrin, alpha 1	29	0,05	0,05	0,06	0,02
Integrin, alpha 10	30	0,03	0,05	0,05	0,01
integrin, alpha 11	31	0,03	0,03	0,06	0,01
Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA -2 receptor)	32	0,02	0,03	0,06	0,01

3. ERGEBNISSE

Integrin, alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex, antigen CD41B)	33	0,13	0,04	0,00	0,01
Integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA -3 receptor)	34	0,14	0,04	0,02	0,03
Integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA -4 receptor)	35	0,13	0,05	0,11	0,15
Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)	36	0,09	0,06	0,13	0,03
Integrin, alpha 6 subunit	37	0,05	0,04	0,06	0,01
Integrin, alpha 7	38	0,05	0,04	0,05	0,02
Integrin, alpha 8	39	0,03	0,03	0,04	0,00
Integrin, alpha 9	40	0,03	0,04	0,02	0,01
Integrin, alpha L (CD11a (p180)) LFA-1 subunit	41	0,13	0,05	0,02	0,08
Integrin, alpha M (CD11b (p170))	42	0,81	0,69	1,63	1,21
Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	43	0,12	0,08	0,06	0,06
Integrin, alpha X (antigen CD11C (p150), alpha polypeptide)	44	0,42	0,63	1,11	1,01
Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	45	0,77	0,77	1,80	1,14
Integrin, beta 2 (antigen CD18 (p95), LFA-1-, Mac-1- subunit)	46	0,84	0,58	1,82	1,00
Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	47	0,06	0,03	0,04	0,01
Integrin, beta 4	48	0,04	0,04	0,03	0,01
Integrin, beta 5	49	0,08	0,02	0,02	0,04
Integrin, beta 6	50	0,11	0,03	0,03	0,02
Integrin, beta 7	51	0,05	0,03	0,04	0,01
Integrin, beta 8	52	0,05	0,04	0,03	0,02
Laminin B1 chain	53	0,06	0,04	0,00	0,02
Laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)	54	0,07	0,04	0,08	0,02
Meningioma expressed antigen 5 (hyaluronidase)	55	0,09	0,06	0,09	0,18
Homo sapiens MICA gene, allele MUC-18	56	0,05	0,04	0,04	0,03
Matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	57	0,04	0,02	0,00	0,01
Matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	58	0,04	0,03	0,02	0,03
Human stromelysin-3	59	0,02	0,04	0,03	0,02
Matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)	60	0,03	0,03	0,03	0,01
Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)	61	0,04	0,03	0,02	0,02
H.sapiens mRNA for membrane-type matrix metalloproteinase 1	62	0,05	0,04	0,00	0,00
Matrix metalloproteinase 15 (membrane-inserted)	63	0,06	0,03	0,01	0,01
Matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)	64	0,04	0,04	0,01	0,01
Matrix metalloproteinase 17 (membrane-inserted)	65	0,02	0,00	0,01	0,04
Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kD type IV collagenase)	66	0,02	0,00	0,01	0,02
Matrix metalloproteinase 20 (enamelysin)	67	0,02	0,01	0,02	0,02
Matrix metalloproteinase 24 (membrane-inserted)	68	0,03	0,02	0,03	0,01
Homo sapiens matrix metalloproteinase-26 (MMP26) mRNA	69	0,41	0,23	1,50	0,03
Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	70	0,04	0,03	0,01	0,01
Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	71	0,05	0,02	0,01	0,01
Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)	72	0,06	0,02	0,01	0,01
Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kD type IV collagenase)	73	0,02	0,09	0,02	0,05

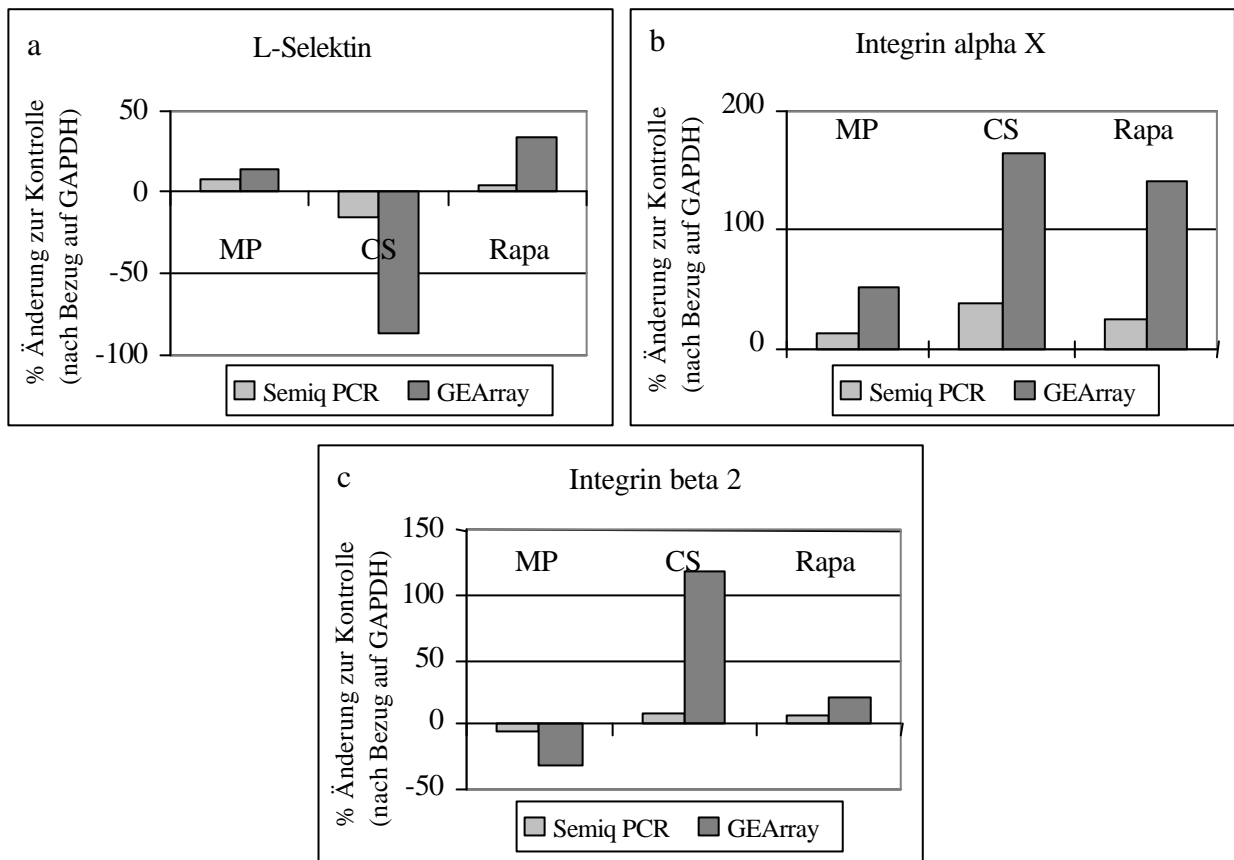
3. ERGEBNISSE

Neural cell adhesion molecule 1	74	0,00	0,03	0,01	0,03
Neuronal cell adhesion molecule	75	0,06	0,07	0,16	0,05
Homo sapiens platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen) (PECAM1)	76	0,09	0,11	0,86	0,90
Homo sapiens plasminogen activator, tissue (PLATa)	77	0,03	0,00	0,03	0,02
Plasminogen activator, urokinase	78	0,04	0,03	0,04	0,01
Human urokinase-type plasminogen activator receptor	79	0,37	0,27	0,26	0,54
Human endothelial leukocyte adhesion molecule I (ELAM1) mRNA	80	0,05	0,02	0,00	0,03
Selectin L (lymphocyte adhesion molecule 1)	81	0,04	0,05	0,01	0,05
Selectin P (granule membrane protein 140kD, antigen CD62)	82	0,02	0,04	0,00	0,03
Human plasminogen activator inhibitor (PAI-2)	83	0,01	0,04	0,00	0,04
Protease inhibitor 5, function as tumor suppressor in breast and prostate cancers	84	0,02	0,05	0,02	0,03
Plasminogen activator inhibitor, type I (PAI-1)	85	0,05	0,06	0,66	0,03
Homo sapiens secreted protein, acidic, cysteine-rich (SPARC)	86	0,26	0,14	0,12	0,14
Homo sapiens secreted phosphoprotein 1 (early T-lymphocyte activation 1) (SPP1)	87	1,23	1,22	2,50	1,28
Homo sapiens thrombospondin 1 (THBS1)	88	0,10	0,04	0,03	0,04
Human thrombospondin 2 (THBS2) mRNA	89	0,04	0,04	0,01	0,04
Homo sapiens thrombospondin 3 (THBS3) gene	90	0,08	0,05	0,06	0,06
Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	91	0,07	0,10	0,02	0,10
Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	92	0,80	0,92	1,73	0,95
Tissue inhibitor of metalloproteinase 3a	93	0,05	0,08	0,03	0,04
Transmembrane protease, serine 4	94	0,05	0,06	0,01	0,02
Vascular cell adhesion molecule 1	95	0,09	0,09	0,02	0,02
Vitronectin	96	0,05	0,04	0,01	0,01

3.4.4. Semiquantitative PCR von myeloider humaner DC cDNA aus RNA zur Evaluierung des GEMicroarray

Die Tendenz der Ergebnisse der semiquantitativen PCR der verschiedenen Adhäsionsmolekülgruppen Selektine und Integrine entspricht den erhaltenen Ergebnisse des GEMicroarray (siehe Abbildung 39a bis c).

Abbildung 39: Überprüfung der Ergebnisse des GEMicroarray (human) anhand semiquantitativer PCR



4. Diskussion

4.1. IMMUNSUPPRESSIVA UND ENDOTHELFUNKTION

In dieser Arbeit sollten die derzeit klinisch relevanten Immunsuppressiva hinsichtlich ihrer Beeinflussung auf verschiedene, endotheliale Funktionen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen verglichen werden, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Substanz und Endothelaktivierung mit nachfolgend erhöhter Wahrscheinlichkeit einer chronischen Abstoßung zu erkennen. Die wichtigsten Aussagen dieser Experimente können wie folgt zusammengefasst werden:

- 1) Die Stimulation von HMEC-1 mit CS, MMF und Rapa führte zu einer stärkeren Induktion des oxidativen Stresses verglichen zu der Stimulation mit MP und Tac.
- 2) Die durch Immunsuppressiva vermittelte Induktion von oxidativem Stress, Apoptose und metabolischer Aktivität ergaben eine deutliche Korrelation.
- 3) MMF zeigte unter hypoxischen Bedingungen eine signifikant verringerte Proliferation, während bei CS in niedriger Konzentration unter sowohl normoxischen wie hypoxischen Bedingungen eine signifikante Erhöhung erfolgte. MP führte nur in der niedrigen Konzentration unter normoxischen Bedingung zu einer geringen Steigerung der Proliferation.
- 4) Die NO Produktion wurde bei allen Immunsuppressiva außer Tac in beiden Konzentrationen unter beiden Bedingungen erhöht, im Besonderen durch MMF.
- 5) Im Gegenzug dazu führten ausschließlich Stimulationen mit Rapa, Tac und CS zu einer gesteigerten ET-1 Freisetzung.
- 6) In der Gesamtheit der Funktionen führten CS, Rapa und Tac zu einer stärkeren Endothelaktivierung im Vergleich zu MP und MMF.

Wie im folgenden kurz beschrieben, besteht zwischen den Eigenschaften und Funktionen des Endothels eine deutliche direkte oder indirekte Beeinflussung. So ergibt sich aus unseren Daten eine direkte Korrelation zwischen oxidativem Stress und metabolischer Aktivität. Zellen reagieren auf oxidativen Stress mit vermehrter Expression von Hitzeschock Proteinen (Amberger A, 1999), Glutathion, Superoxyd Dismutase, Häm Oxygenase-1 und Thioredoxin (Pohlman, J surg res 2000), was zu einer erhöhten metabolischen Aktivität führt. Jedoch steigert auch vermehrte Proliferation (Maulik 2002), insbesondere die G1 Phase des Zell-

zyklus (Phase der Proteinbiosynthese) die metabolische Aktivität (Karlson P, 1994). Dies wiederum hat über die vermehrte Arbeit der Mitochondrien ein erhöhtes „Superoxyd Leck“ und damit gesteigerten oxidativen Stress zur Folge (Stryer, 1990).

Die Korrelation zwischen oxidativem Stress (und metabolische Aktivität) und Apoptose scheint eine unzureichende Ausprägung des oben beschriebenen kompensatorischen Schutzmechanismus widerzuspiegeln. Die immunsuppressiv induzierte Modulation des Zellzyklus mit den Auswirkungen auf die metabolische Aktivität und die Proliferation spielen hier eine wichtige Rolle (Choy 2001).

Weiterhin besteht ein Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und den beiden vasoaktiven Mediatoren NO und ET-1 (Alonso D, 2003; Anderson, 2003; Li *et al.*, 2003). So werden bei der NO-Produktion für die Umwandlung von L-Arginin über NOH-Arginin in L-Citrullin und NO (durch NOS katalysiert) 1,5 NADPH verbraucht. Das NADP⁺ wird über die NADPH-Oxidase wieder in NADPH umgewandelt, dies jedoch erzeugt oxidativen Stress über Superoxyd-Entstehung (Griffith *et al.*, 1995). Das entstandene NO führt sowohl zu einer cGMP gesteuerten, calcium-abhängigen Dilatation in den glatten Muskelzellen; ebenso hemmt es auch die Präpro-Endothelin Synthese im Endothel. Oxidativer Stress wiederum, z.B. durch CS Stimulation, kann zu Peroxinitrit-Bildung führen (Navarro-Antolin *et al.*, 2001), was in einer verminderten NO Bioverfügbarkeit mit folgendem Anstieg des Gegenspielers ET-1 resultiert (Alonso D, 2003). Jedoch kann die Bindung des ET-1 an den endothelialen ET_B Rezeptor über die eNOS Aktivierung mit folgend erhöhter NO Produktion als negative Rückkopplung betrachtet werden (Verhaar *et al.*, 1998).

4.1.1. Immunsuppressiva und oxidativer Stress, Apoptose und Proliferation

Es wird vermehrt in der Literatur berichtet, dass Immunsuppressiva eine substanzspezifische Endothelschädigung unterschiedlichen Ausmaßes verursachen können. Eine der Hauptursachen dieser Endothelschädigung wird in der Induktion des oxidativen Stresses gesehen. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen für die endotheliale CS Stimulation zeigte auch Longoni (Longoni *et al.*, 1999) einen signifikanten Anstieg des oxidativen Stresses nach CS Behandlung von humanen Endothelzellen, sowie eine erhöhte Apoptose-Rate (Longoni *et al.*, 2001). Mogayzel (Mogayzel *et al.*, 2003) berichtet nach Stimulation von humanen pulmonalen Endothelzellen mit CS bzw. Tac von einer reduzierten Überlebensrate

der Zellen, welche durch gleichzeitige Stimulation mit H₂O₂ weiter sinkt, sich jedoch, wie bei uns, durch die Hypoxie/Reoxygenierung nicht potentiert.

Eine direkte *in vitro* Untersuchung von MMF im Hinblick auf einzelne Endothelfunktionen am Endothel alleine, wie bei uns sind bisher nicht durchgeführt worden.

Ha (Ha *et al.*, 2004) erwähnt nach MMF Stimulation und Ischämie/Reperfusion an glatten Muskelzellen und glomerulären mesangialen Zellen eine durch Inhibition des oxidativen Stresses eher protektive Eigenschaft auf das Endothel. Von ihnen wird auch eine MMF ausgelöste Hemmung der durch PDGF (Platelet derived Growth Factor = Thrombozyten abstammender Wachstumsfaktor) ausgelöste ROS Produktion in glatten Muskelzellen gezeigt (Park *et al.*, 2004). Aus unseren Experimenten lässt sich jedoch eine deutliche Erhöhung des endothelialen oxidativen Stresses durch MMF erkennen. Da unser Detektionssystem (siehe S. 28f) mit allen Arten von Radikalen reagiert, geht hier sicherlich auch das durch MMF verstärkt produzierte NO[•] (Ergebnisse S. 58) in die Messung mit ein. Die von uns erkennbare MMF induzierte Proliferationshemmung wird auch von Huang (Huang *et al.*, 2005) an humanen Nabelschnur – Endothelzellen beschrieben. Wie schon bei MMF liegen auch für MP, Rapa und Tac keine *in vitro* Versuche an Endothel zu oxidativem Stress und Apoptose/Nekrose vor. Kahan (Kahan, 2001) und Mohacsi (Mohacsi *et al.*, 1997) berichten von einer Hemmung der Wachstumsfaktor-induzierten Proliferation durch Rapa und Tac bei Endothel- und glatten Muskelzellen *in vitro* und auch Butzal (Butzal *et al.*, 2004) verzeichnet sowohl eine Inhibition der Proliferation und auch Differenzierung von endothelialen Progenitorzellen durch Rapa. Jedoch unterscheiden sich hier sowohl Versuchsansatz (Stimulation mit Wachstumsfaktoren) als auch die Zellarten; abgesehen davon spielt auch hier die Stimulationskonzentration (bis zu 25-fach höhere Konzentrationen bei Rapa als bei uns) und –dauer eine Rolle. So zeigen sich bei uns bei Rapa in der niedrigen Dosis sogar eher proliferationssteigernde Tendenzen, während die höhere Dosis bei uns keinen Einfluss auf die endotheliale Proliferation zeigt.

Tac zeigte in Patientenstudien eine ähnliche oxidative Stressinduktion wie CS (Calo *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2005). An murinen Endothelzellen erwähnt Azizian (Azizian *et al.*, 2004) nach Ischämie/Reperfusion mit Tac Stimulation keine signifikanten Auswirkung auf die Viabilität, was unseren Daten nach Hypoxie/Reoxygenierung mit Tac entspricht. Detailliertere *in vitro* Versuche mit Tac an Endothelzellen in Hinblick auf oxidativen Stress und Apoptose/Nekrose, die unseren Experimenten entsprechen, sind derzeit nicht bekannt. Auch für Methylprednisolon sind bisher lediglich *in vitro* Untersuchung der Proliferation an Endothelzellen untersucht worden (Mohacsi *et al.*, 1997), jedoch ohne Effekt. Zu oxidativem

Stress wurden jedoch in Patientenstudien von Volk (Volk *et al.*, 2003) kein Einfluss von MP auf die Ischämie/ Reperfusion induzierte ROS Generierung gefunden, bzw. fand Bourbon (Bourbon *et al.*, 2004) sogar eine signifikante Reduktion der ROS durch MP. Die Abweichung zu den bei uns minimal erhöhten oxidativen Stress-Werten ist sicherlich durch die unterschiedlichen Versuchsansätze zu erklären.

4.1.2. Immunsuppressiva und NO und ET-1

Wie schon oben beschrieben, ist der Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und den vasoaktiven Mediatoren NO und ET-1 recht komplex. Unsere Ergebnisse der MMF Stimulation von Endothelzellen ergaben in Übereinstimmung mit Haug (Haug *et al.*, 2002) keine Erhöhung der ET-1 Konzentration, was auch auf die sehr stark erhöhte NO Produktion durch MMF mit folgender Inhibierung der Präpro-Endothelin Transkription zurückzuführen ist (Alonso *et al.*, 2003). CS ist für eine Induktion von Bluthochdruck bekannt; dies ist unter anderem ein Effekt des durch CS gesteigerten endothelialen ET-1 (Marsen *et al.*, 1999; Wilasrusmee *et al.*, 2003). Nach CS Stimulation von HMEC-1 sehen wir eine dosisabhängige Tendenz zur ET-1 Steigerung. Diese Tendenz war nicht signifikant, wobei unsere CS Konzentrationen um 5- bis zu 20- fach geringer gewählt waren, da therapeutisch angelehnt, als in den oben beschriebenen Veröffentlichungen. Unsere leicht erhöhten Werte der NO Produktion durch CS wurden auch von Stroes (Stroes *et al.*, 1997) im gestauten Unterarmblut gefunden. Jedoch könnte dies, wie auch die durch MP und Rapa gesteigerte NO-Produktion, zusätzlich auf die ET-1 abhängige Aktivierung des endothelialen ET_B Rezeptors zurückzuführen sein. Dies war bei unseren erhöhten ET-1 Ergebnissen nach der endothelialen Tac Stimulation, wie bei Takeda (Takeda *et al.*, 1993) nicht der Fall, wobei hier die Tac abhängige eNOS Transkriptions- und Aktivitätsinhibierung (Takeda Y, 1999) verantwortlich ist.

Im Bezug auf ET-1 zeigte Yatscoff (Yatscoff *et al.*, 1993) übereinstimmend mit unseren Ergebnissen, eine deutliche, durch Rapa und Tac induzierte Steigerung der ET-1 Freisetzung in Kanichen Endothelzellen. Die Konzentrationen im oben genannten Versuch waren sehr viel höher gewählt als in unserem Versuch, dennoch ergab sich auch hier für Rapa eine höhere Stimulation der ET-1 Freisetzung verglichen zu Tac.

Für Rapa, Tac und MP sind *in vitro* Untersuchungen an Endothelzellen hinsichtlich NO bisher nicht bekannt. Jedoch konnten Naoum (Naoum *et al.*, 2005; Naoum *et al.*, 2004) erhöhte eNOS –Protein Expression in Rapa behandelten Apo-E knockout Mäusen nachweisen, was auch unsere gesteigerten ET-1 Konzentrationen nach Rapa Stimulation erklären könnte.

4.1.3. Immunsuppressiva und die Integration aller untersuchten Funktionen (CEFI)

Zusammengefasst kann anhand des CEFIs das Aktivierungspotential der immunsuppressiven Substanzen nach folgender Reihenfolge eingeteilt werden:

- unter normoxischen Bedingungen zeigten in der niedrigen Dosis MP und MMF ein ähnlich geringes Endothelaktivierungspotential, während sich dieses Potential von CS über Rapa bis Tac in der niedrigen Dosis auf bis das Doppelte der MP Aktivierung erhöht. Die hohe Dosis weist bei den Substanzen, bis auf MP, dieselbe Tendenz mit nur leichter, weiterer Verschlechterung der Endothelfunktion auf. MP jedoch zeigt eine deutliche, dosis-abhängige Verschlechterung der Endothelfunktion, wie auch aus der Pharmakologie bekannt (Forth W, 2004).
- unter hypoxischen Bedingungen änderte sich dieses Bild erheblich, was auf die geringeren Unterschiede zur unstimulierten Kontrolle (mit durch Hypoxie /Reoxigenierung erhöhten Basiswerten) zurückzuführen ist. Somit differieren die Endothelaktivierungspotentiale der einzelnen Substanzen (in beiden Dosen) nur geringfügig, mit Ausnahme von CS. Die Hypoxie/Reoxigenierung führte bei CS, vor allem in der niedrigen Dosierung, zu unter diesen Bedingungen der geringsten Endothelaktivierung. Die eher leicht verringerte Endothelaktivierung der Substanzen Rapa und Tac in der hohen Dosierung unter Hypoxie/Reoxigenierung im Vergleich zur Normoxie könnte auf eine leichte Toleranzanpassung, wie bei Pohlman (Pohlman *et al.*, 2000) beschrieben, zurückzuführen sein. Die Angleichung der Aktivierungspotentiale der Substanzen unter Hypoxie könnte ein Hinweis auf Potentiale kurz vor dem Aktivierungsmaximum gesehen werden, da in Vorversuchen eine größere Stressung zu einem derart schlechten Zustand der Zellen führte, sodass diese Bedingungen ausgeschlossen werden mussten.

4.2. IMMUNSUPPRESSIVA UND DENDRITISCHE ZELLEN

In den letzten Jahren hat sich das Forschungsinteresse an DCs, vor allem im Zusammenhang mit Transplantations- und Autoimmunerkrankungen stark entwickelt. Da die DCs und ihre Entwicklung, wie schon in der Einleitung erwähnt, stark durch ihre Mikroumgebung beeinflusst werden, ist besonders die pharmakologische Wirkung immunsuppressiver Substanzen auf folgende DC Eigenschaften von generellem Interesse:

- a) Ausmaß der Differenzierung und Expansion in die einzelnen DC Subtypen
- b) Antigen-Aufnahme und -Prozessierung, Migration (mit der vorausgehenden DC-Adhäsion) und Maturierung der DCs,
- c) Fähigkeit zur Lymphozyten Aktivierung und Überlebensrate bzw. -dauer der DCs
- d) Zytokin-Ausschüttung der DCs.

Die Reviews von Abe, Hackstein und Lagaraine (Abe *et al.*, 2003; Hackstein *et al.*, 2004; Lagaraine *et al.*, 2003) integrieren hierzu einige der interessantesten Ergebnisse der bisherigen Forschung:

So weiß man heute, dass **MMF** zu einer dosisabhängigen Änderung der phänotypischen und funktionellen Maturierung der DCs führt. Als Folge der von MMF reduzierten Expression von kostimulierenden Signalen ergibt sich eine fehlerhafte stimulatorische Kapazität der T-Zell-Aktivierung von murinen Knochenmark abstammenden DCs. In vivo Versuche mit MMF zeigten eine gestörte Antigen-Präsentation von LCs (Langerhans Zellen), was auch mit obigen Ergebnissen und der in vivo gefundenen Erhöhung des toleranzerzeugenden DC Phänotyps übereinstimmt, welcher verstärkt zu Populationen von regulatorischen T-Zellen (auch Suppressor T-Zellen genannt) führen kann.

Kortikosteroide wie **MP** sind mittlerweile dafür bekannt, die DC Differenzierung und Maturierung zu hemmen. So konnte nach Kortikosteroid Zugabe in vitro die Differenzierung aus Monozyten blockiert werden; auch die Differenzierung aus CD34+ Zellen in intestinale oder dermale (=LCs) DCs wurde unterdrückt. In vivo wurde eine deutliche Abnahme der Anzahl und Funktion im peripheren Blut zirkulierender plasmazytoider DCs nach Verabreichung von Prednison verzeichnet, wobei hierzu noch das migratorische und apoptotische Verhalten der DCs untersucht werden muss. Weiterhin führen Kortikosteroide zu einer reduzierten Expression der kostimulierenden Signale, zu einer für den entsprechenden Maturierungsgrad erhöhten Endozytose und einer geänderten Zytokinproduktion (in Richtung TH-2 Profil), was

auch ein Effekt der durch Kortikosteroide gehemmten Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 erklärbar wäre.

CS scheint verstärkt inhibitorische Effekte auf Antigen Aufnahme und –Prozession, und damit auf die stimulatorische Kapazität der T-Zell Aktivierung von murinen Knochenmark abstammenden DCs zu haben. Milzzellen verloren unter CS die Fähigkeit bereits bzw. gerade prozessierte Antigene zu präsentieren. Außerdem wurde bei CS von DCs mit geringerem Antigengehalt im Vergleich zur Kontrolle berichtet. Weiterhin wird von einer ausgelösten Änderung der Zytokin-Ausschüttung und einer jedoch nur geringen Hemmung der Migration durch CS berichtet.

Tac zeigt ein dem CS vergleichbares Bild; auch hier wird vermehrt über eine verminderte stimulatorische Kapazität der T-Zell Aktivierung und eine veränderte Zytokin-Expression berichtet. Es wurde generell eine Beeinträchtigung der normalen DC Funktionen durch Tac beobachtet, weitere Untersuchungen sind jedoch nötig, da im Hinblick auf Differenzierung und Maturierung die Ergebnisse zum Teil sehr stark voneinander abweichen.

Besonders zu beachten ist die durch **Rapa** ausgelöste DC Apoptose, welche die DC Zahl verringert. Durch die Hemmung der zur Differenzierung benötigten Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise IL-4 und GM-CSF bei DCs monozytären Ursprungs, wird die DC Zahl durch Rapa weiterhin gesenkt. Außerdem soll Rapa über verringerte Endozytose die DC Antigen Aufnahme hemmen und zu veränderter Zytokin-Ausschüttung führen, wenn auch in erheblich geringerem Maße zu den obigen Immunsuppressiva. Dadurch werden sowohl in vitro als auch in vivo deutlich die DC Funktionen durch Rapa geändert.

4.2.1. DC-Adhärenz an das Endothel

Oben wurden einige Einflüsse von Immunsuppressiva vor allem auf die DC-Entwicklung aufgeführt. Im Hinblick auf die DC Migration sind derzeit nur wenige Beobachtungen beschrieben. Die Voraussetzung für eine erfolgreiche DC Migration ist zuerst die Adhäsion der DCs an das Endothel.

Wie im Kapitel *Immunsuppressiva und Endothelfunktion* beschrieben führen verschiedene Immunsuppressiva zu einer unterschiedlich ausgeprägten Endothelaktivierung (Karlsson 1997). Eine Endothelaktivierung hat über verschiedene Mechanismen eine verstärkte Adhäsion von Zellen des Blutes wie z.B. auch Leukozyten und DCs zur Folge (Brown *et al.*, 1997; de la Rosa *et al.*, 2003; Weis *et al.*, 2002). So wird von Cooper (Cooper *et al.*, 2002) über verstärkte Blutzelladhäsion bei erhöhtem oxidativen Stress berichtet; auch eine erhöhte ET-1

Freisetzung bewirkt eine gesteigerte Leukozytenadhäsion (Jozsef *et al.*, 2002). Diese gesteigerte Adhäsion wird unter anderem über eine erhöhte Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle wie beispielsweise E- und P- Selekin, ICAM-1 und VCAM-1 vermittelt. Eine Endothelaktivierung durch den Stressor TNF α führt beispielsweise über eine Aktivierung des NF κ B zu einer erhöhten Transkription und nachfolgender Translation von verschiedenen Adhäsionsmolekülen (Choi *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2004; Zapolska-Downar *et al.*, 2004).

4.2.1.1. Immunsuppressive Endothelstimulation (murin) und DC (murin) Adhärenz

Auch in unserem murinen Modell führte eine immunsuppressive Stimulation der Endothelzellen zu einer Endothelaktivierung, welche nach Stimulation mit CS, Rapa und Tac in einer gesteigerten Adhäsion der DCs resultierte (siehe oben). Die Stimulation mit MP zeigte hingegen eine starke Hemmung der DC-Adhäsion; auch MMF ergab eine Adhärenz-Inhibition, jedoch in deutlich geringerem Maße. Die Reduktion der DC Adhäsion bei MP ist auf eine Aktivierungshemmung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 über den Glukokortikoid-Rezeptorkomplex mit nachfolgender Hemmung der Adhäsionsmolekülexpression zurückzuführen (Pitzalis *et al.*, 2002). So zeigten (Gelati *et al.*, 2000) eine MP ausgelöste Reduktion von Zytokin induzierten Adhäsionsmolekülen an humanen Hirn Endothelzellen. MMF dagegen führt über die gehemmte Purin-Synthese nicht nur zu einer Proliferationsinhibition, sondern hat auch eine verringerte Expression der Adhäsionsmoleküle an humanen Nabelschnur Endothelzellen zur Folge (Raab *et al.*, 2001).

4.2.1.2. Immunsuppressive DC Stimulation (murin) und Adhärenz an das Endothel (murin)

Die Adhärenz von Leukozyten, somit auch der DCs an das Endothel, ist nicht nur von der Endothelaktivierung sondern neben anderen Aspekten (wie Zytokinausschüttung) auch von der Aktivierung der Leukozyten abhängig. Ein Effekt der Leukozytenaktivierung, neben einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen, ist die Konformations- und damit Affinitätsänderung der Integrine, welche sich adhäsionsfördernd auswirkt (Noti, 2004). Eine Inhibition der Integrine über Antikörper resultiert nach D'Amico (D'Amico *et al.*, 1998) in einer massiven Hemmung der DC Adhäsion eines aktivierten oder ruhenden Endothels.

Unsere immunsuppressive Stimulation der DCs führte hingegen bei allen verwendeten Substanzen zu einer deutlichen Hemmung der Adhäsion. Wie bereits oben beschrieben, führt auch hier die gehemmte Purinsynthese durch MMF zu einer verminderten Expression von

Adhäsionsmolekülen. Weiterhin wird dadurch auch die Proliferation negativ beeinflusst, wie durch den Viabilitätsassay gezeigt, sodass die Hemmung der DC Adhäsion hier auch auf eine reduzierte Zellzahl zurückgeht. Glukokortikoide (wie MP) zeigen nach Abe (Abe *et al.*, 2003) mannigfaltige inhibitorische Effekte auf DCs, unter anderem wird die Expression der kostimulatorischen Moleküle vermindert und eine verringerte T-Zell-Aktivierung geschildert. Eine direkte Hemmung der DC Adhäsionsmoleküle durch MP wurde bisher nicht angeführt, jedoch wurde von einer Hemmung der dazu involvierten Transkriptionsfaktoren NF κ _B und AP-1 in DCs berichtet (Auphan *et al.*, 1995). Interessanterweise wird auch bei DC Stimulation mit CS über eine Hemmung des NF κ _B berichtet (Lee *et al.*, 1999), was unserer Beobachtung einer CS induzierten DC Adhärenzhemmung entspricht. Karlsson (Karlsson *et al.*, 1997) zeigt, dass Tac die mitogen-induzierte Leukozyten-Adhäsion an stimuliertes und unstimuliertes Endothel reduzierte; dies ging mit einer Hemmung der Adhäsionsmoleküle PECAM-1 und α X β 1 Integrin einher. Die Hemmung der DC Adhäsion durch Rapa wird lediglich mit einer verringerten Aktivierung der DCs beschrieben, wobei NF κ _B und AP-1 durch Rapa laut Chiang (Chiang *et al.*, 2004) nicht beeinflusst werden.

4.2.1.3. Immunsuppressive DC Stimulation (murin) und Adhärenz an das immunsuppressiv stimulierte Endothel (murin) mit und ohne immunsuppressive Stimulation während der Kokultivierung

Die immunsuppressive Stimulation von beiden murinen Zelltypen ergab lediglich eine Aufsummierung der oben im Einzelnen beschriebenen Effekte. Die zusätzliche Stimulation während der Kokultivierung ergab eine weitere, geringfügig erhöhte Inhibition der DC Adhärenz im Vergleich zur unstimulierten Kokultivierung. Dies spricht für einen reversiblen Effekt der Immunsuppressiva MMF, CS und Rapa, wie auch Teunissen (Teunissen *et al.*, 1991) bei CS gezeigt hat.

4.2.2. DC Aktivierung

4.2.2.1. Genexpressionsanalyse von murinen myeloiden, immaturren DCs

Die Untersuchung der unstimulierten murinen, myeloiden, immaturren DCs mittels Genexpressionsanalyse für Adhäsionsmoleküle, Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und extrazellulärer Matrixproteine zeigte **starke** (im Folgenden fett und unterstrichen markiert), **mäßige** (im Folgenden fett markiert) oder **schwache** (im Folgenden fett und kursiv markiert) Signale für die RNA-Expression folgender Proteine:

- **Basigin Bsg** (auch Basigin bzw. CD147) ist ein Transmembran-Glykoprotein der Immunglobulin-Superfamilie, das unter anderem auch bei inflammatorischen Prozessen eine Rolle spielt und als Cyclophilin-Rezeptor A vermutet wird. Bsg kann auch Matrix Metalloprotease Produktion auslösen und damit Invasion (=Transmigration) in Gewebe ermöglichen (Muramatsu *et al.*, 2003).
- **Caspase 8** ist ein Mitglied der Cystein Proteasen, welches an Funktionen wie Apoptose und Cytokin Prozessierung beteiligt ist (Kruidering *et al.*, 2000).
- **Catenin a1 und β** sind zytoplasmatische Proteine, welche durch Interaktion mit der intrazellulären Domäne der Cadherine die adhäsions- und signalübertragende Eigenschaften beeinflussen (Gooding *et al.*, 2004).
- **CD44 Antigen** ist ein Oberflächen-Glykoprotein, welches bei Zell-Zell- Kontakten, aber auch bei der Homing Funktion (Migration) vor allem bei DCs und Langerhanszellen in die Lymphknoten eine wichtige Rolle spielt (Weiss *et al.*, 1997).
- **Cystatin C** ist ein Cystein-Protease-Inhibitor, welcher mit fortschreitender Maturierung von DCs intrazellulär ansteigt und möglicherweise auch Auswirkungen auf die Cathepsine zeigt (Zavasnik-Bergant *et al.*, 2005).
- **Cathepsin B, D, E und H** sind Cystein-Proteasen, die meist in Lysosomen vorhanden sind und durch intrazelluläre Proteindegradation am normalen Zellmetabolismus beteiligt sind. Einige dieser Proteasen sind an der Antigen Prozessierung und – Präsentation von DCs beteiligt (Mohamadzadeh *et al.*, 2004).
- ***Extracellular Matrix Protein-1 (ECM- 1)*** ist ein sekretorisches Glykoprotein, das mit Angiogenese, Zellproliferation und -differenzierung in Verbindung gebracht wird.
- ***Integrin- a5-, a6- , aL-, aM aX - und - β 2-, β 5, bzw. β 7- Untereinheiten*** Die Integrine bestehen aus zwei Untereinheiten, jeweils einer a- und einer β - Untereinheit, und bilden damit Heterodimere, welche Zell-Adhäsion und -Transmigration durch

Zell-Zell-Kontakte vermitteln. Bis heute kennt man 24 α - und 9 β - Untereinheiten. Die verschiedenen Integrine binden unterschiedliche Liganden und unterscheiden sich im Vorkommen bei den Zellen. Bei den Monozyten und myeloiden DCs befinden sich die folgenden bekannten Integrine: LFA-1 (α L β 2); Mac-1 (α M β 2); gp150/95 (α X β 2); und die β 7 Integrine (α 4 β 7 und α E β 7), welche auf Lymphozyten auftreten (Walzog *et al.*, 2000). Die von Ammon (Ammon *et al.*, 2000) gezeigten Unterschiede in der Integrin-expression von Monozyten und myeloiden, aus Monozyten generierten DCs können daher als Differenzierungsmerkmal angesehen werden.

- **Very late Antigen- 4 (VLA-4)**, auch Integrin α 4 β 1. Die Liganden dieses Integrins sind VCAM (α 4- Untereinheit) oder Fibronectin (β 1-Untereinheit). Neuerdings ist bei VLA-4 auch eine unterstützende Funktion als kostimulierendes Signal zur T-Zell Aktivierung beschrieben worden (Mittelbrunn *et al.*, 2004).
- ***Junctional Adhesion Molecule (JAM-1)*** ist Mitglied der Immunglobulin Superfamilie und an Zell-Adhäsion und -Migration, auch bei DCs beteiligt (Cera *et al.*, 2004).
- ***Laminin B1 und B2*** ist Hauptbestandteil der Basalmembran und besitzt biologische Aktivitäten wie Förderung der Zell-Adhäsion, -Migration und -Differenzierung.
- **Hyaluronidase 5** ist das Hyaluronsäure-spaltende Enzym, welches dadurch auch die Gewebepermeabilität erhöht.
- **Matrix-Metalloproteinasen (MMP) 3 (Stromelysin 1), 8 (Kollagenase), 10 (Stromelysin 2), 12 (Macrophagen Elastase) und 19** sind Enzyme, welche vor allem extrazelluläre Matrixbestandteile (Kollagen, Elastin, etc.) substratspezifisch spalten können und damit die Transmigration von Zellen ins Gewebe erleichtern.
- **Tissue Plasminogen Aktivator (tPA) und Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA)** sind Enzyme, die von Zellen der Gefäßwand sezerniert werden und Plasminogen in Plasmin spalten, welches wiederum zur Fibrinolyse führt (Limitierung der Blutgerinnung). Im Zusammenhang mit Gewebedegradierung, Transmigration und Differenzierung sind die PA auch bei DCs von Ferrero (Ferrero *et al.*, 2000) und Burg (Burg *et al.*, 1987) beschrieben worden.
- ***Endothelial- (E-) und Lymphocyte- (L-) Selektin*** sind lektinartige Rezeptoren, die vor allem am frühen Kontakt der Leukozytenadhäsion am Endothel, dem sogenannten Rollen, beteiligt sind. Colvin (Colvin *et al.*, 2004) berichten von L-Selektin(=CD62L) auf murinen DCs, was jedoch interessanterweise keinen Einfluss auf die Transmigration der DCs hatte.

Die immunsuppressive Stimulation mit MP, CS und Rapa zeigte zum Teil sehr deutliche Änderungen im Expressionsprofil der murinen DCs; interessanterweise führten alle drei Immunsuppressiva zu einer signifikanten Reduktion (ca. 45 %) der pro-apoptotischen Caspase 8 .

DC Stimulation mit **MP** führt signifikant zu einer deutlichen Hemmung (ca. 50 %) der Integrine, vor allem den Untereinheiten α L, α M und β 2 und β 7, welche an der stabilen Adhäsion (siehe S.13) beteiligt sind; das an der Transmigration mitwirkende JAM-1 ist um 60 % reduziert. Das adhäsionsfördernde Laminin B2 und das ECM-1 wird um 50 % inhibiert. Die Cathepsine E und H werden um ca. 70 %, die Enzyme Hyaluronidase 5, MMP 10 und MMP 12, die die Gewebeporosität und damit die Transmigration erleichtern, um ca. 50 bis 80 % reduziert.

Auch die **CS** Stimulation der murinen DC resultiert in einer signifikanten Hemmung der Integrine (- 50 bis -70 %), vor allem den Untereinheiten α L und α M (wie bei MP); jedoch zusätzlich den α 5- und α 6- Untereinheiten. Bei den β Untereinheiten ergab sich durch CS lediglich eine signifikante Hemmung für β 5; auch wurde JAM-1 (um ca. 70 %) inhibiert.

Das Laminin B2 und die Enzyme Hyaluronidase, MMP10 und 12 und Cathepsin E und H sind ebenso inhibiert wie bei MP Stimulation, zusätzlich hemmt CS jedoch MMP 19 und MMP 8 um 60 bis 70 %. Das L-Selektin wurde ausschließlich durch die CS Stimulation signifikant um ca. 75 % gehemmt.

Die DC Stimulation mit **Rapa** zeigt eine deutlich verschieden gerichtete Änderung des DC Expressionsprofiles als mit Stimulationen von MP oder CS. So reduziert Rapa Catenin α 1 und Catenin β um ca. 20 - 30 %; das Cathepsin H signifikant um ca 70 % und das ECM-1 um ca. 45 %. Bei den Integrinen werden durch Rapa lediglich die α Untereinheiten α 5, α 6, α L und α M inhibiert, die β Untereinheiten werden nicht beeinflusst. JAM-1 ist jedoch wie bei MP und Tac um ca. 60 % gehemmt.

Die Ergebnisse des Adhäsionsassays konnten somit anhand dieser Genexpressionsanalyse der murinen DCs erläutert und bestätigt werden. Die Beeinflussung der Adhäsionsmoleküle durch die immunsuppressive Stimulation korrelierte mit der tatsächlichen Adhäsionsinhibition. So zeigte MP sowohl in der Genexpressionsanalyse als auch im Adhäsionsassay die stärkste Hemmung, während Rapa in beiden Versuchsansätzen zu der geringste Beeinflussung führte.

4.2.2.2. Genexpressionsanalyse von humanen myeloiden, immaturren DCs

Die Untersuchung der humanen, myeloiden, immaturren DCs mittels Genexpressionsanalyse für Adhäsionsmoleküle, Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und extrazellulärer Matrixproteine zeigte im Vergleich zu den murinen DCs zum Teil deutliche Unterschiede. Zum einen stimmten jedoch die untersuchten Gene nicht vollständig überein, zum anderen wurde die Genexpressionsanalyse nur einmal durchgeführt und kann deswegen nur tendenziell gewertet werden.

Es ergaben sich erste Hinweise, dass unstimulierte humane, aus Monozyten generierte, (myeloide) DCs wie die murinen DCs Caspase 8, CD44, CystatinC und Catenin $\alpha 1$ und $\beta 1$, die Cathepsine B und D, ECM-1, die Integrin- Untereinheiten αM und αX , sowie $\beta 1$ und $\beta 2$ exprimieren. Jedoch zeigte sich, dass auch Cadherin E, das Catenin α -like 1, ICAM-1 und PECAM-1 exprimiert wird, welches bei den murinen DC nicht gefunden wurde.

Auch die immunsuppressive Stimulation der humanen DC scheint andere Konsequenzen zu haben. So werden zwar auch hier die Integrin-Untereinheiten αM , $\alpha 4$ und $\beta 2$ sowie ICAM-1 durch MP reduziert, durch CS und Rapa jedoch deutlich gesteigert. Die Caspase 8 und PECAM-1 scheint auch über CS und Rapa eher induziert zu werden.

Weitere und genauere Genexpressionsanalysen im Hinblick auf Adhäsionsmoleküle und extrazelluläre Matrixproteine, vor allem auch unter immunsuppressiver Stimulation, scheinen daher durchaus lohnenswert.

Zusammenfassung

Die Herztransplantation ist für Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz eine etablierte Therapieform. Die Häufigkeit einer akuten Abstoßung konnte mittlerweile dank optimierter immunsuppressiver Therapie, die in einer Hemmung der T-Zellaktivierung resultiert, deutlich verringert werden. Dennoch ist das Langzeitüberleben der Patienten durch die Entwicklung der chronischen Abstoßung eingeschränkt. Die auch als Transplantatvaskulopathie bezeichnete chronische Abstoßung gilt als eine der häufigsten Ursachen des chronischen Transplantatversagens. Die Transplantatvaskulopathie ist durch eine frühe koronare Endotheldysfunktion charakterisiert und vermittelt durch allo-immunabhängige und allo-immun-unabhängige Risikofaktoren die Entwicklung koronarsklerotischer Läsionen. Da klinische Beobachtungen auf einen Zusammenhang zwischen immunsuppressiver Therapie und Auftreten einer Transplantatvaskulopathie hinweisen, war es das Ziel dieser Arbeit, den qualitativen und quantitativen Einfluss klinisch relevanter Immunsuppressiva auf verschiedene Endothelfunktionen *in vitro* zu untersuchen. Dazu wurden an der humanen Endothelzelllinie HMEC-1 nach Stimulation mit therapeutischen Konzentrationen der Immunsuppressiva Methylprednisolon (MP), Mycophenolsäure als aktiver Metabolit des Mycophenolat Mofetil (MMF), Cyclosporin (CS), Rapamycin (Rapa) und Tacrolimus (Tac) Messungen des oxidativen Stresses, der Apoptose bzw. Nekrose, der Proliferation, der metabolischen Aktivität, der NO-Produktion und der ET-1 Freisetzung unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen durchgeführt.

Alle immunsuppressiven Substanzen führten zu einer Endothelaktivierung, also einer Verschlechterung der Endothelfunktionen. Dies war von der Konzentration und Art des Immunsuppressivums abhängig. So zeigten stimulierte Endothelzellen mit MMF, CS oder Rapa deutlich vermehrten oxidativen Stress im Vergleich zur Stimulation mit MP oder Tac. Der oxidative Stress korrelierte stark mit der endothelialen Apoptose und der metabolischen Aktivität. MMF führte von allen Substanzen zu der höchsten Produktion des (anti-inflammatorischen) Vasodilatators NO; CS, Rapa und Tac dagegen führten zu beträchtlich gesteigerter Freisetzung des (pro-inflammatorischen) Vasokonstriktors Endothelin. Die Ergebnisse der einzelnen Endothelzellfunktionen nach immunsuppressiver Stimulation wurden zur Vereinfachung in einem Index der kumulativen Endothelfunktion integriert, um eine grobe Einteilung der Substanzen aufgrund ihres Endothelaktivierung-Potentiales zu ermöglichen.

Dabei ergaben sich für CS, Rapa und Tac deutlich ausgeprägtere Aktivierungspotentiale als für MP und MMF.

Eine Endothelaktivierung hat meist eine gesteigerte Adhäsionsmolekül-Expression zur Folge. Daher wurden anhand eines murinen Modellsystems die Auswirkungen der Adhäsion von Dendritischen Zellen an das immunsuppressiv aktivierte Endothel untersucht.

Dendritische Zellen sind die wichtigsten Antigen-präsentierenden Zellen und können den gesamten zellulären Anteil des adaptiven Immunsystems aktivieren. Da Dendritische Zellen auch Toleranz induzieren können, gelten sie als Auslöser und Modulator der Immunantwort. Insbesondere nach Transplantation wird jedoch von einer durch Dendritische Zellen vermittelten Aktivierung der T-Lymphozyten mit folgend in Gang gesetzter Immunreaktion ausgegangen. Die Adhäsion der Dendritischen Zellen an das Endothel ist hier deshalb als Initialschritt der Aktivierung des Immunsystemes zu verstehen.

Tatsächlich führte die immunsuppressive Aktivierung der Endothelzellen mit den stärker aktivierenden Substanzen CS, Rapa und Tac zu einer erhöhten Adhärenz der Dendritischen Zellen, während MP und MMF sogar in einer geringen Adhärenzhemmung resultierten. Eine immunsuppressive Stimulation der Dendritischen Zellen selbst jedoch ergab bei allen Substanzen eine deutlich reduzierte DC Adhärenz; die gleichzeitige Stimulation sowohl der Endothelzellen als auch der Dendritischen Zellen mit allen immunsuppressiven Substanzen zeigte lediglich eine Aufsummierung der Einzeleffekte. Die auffälligste Adhärenzinhibierung war durch MP und CS zu verzeichnen, MMF reduzierte die Zahl der adhärennten Dendritischen Zellen an das Endothel vorwiegend durch Proliferationshemmung.

Die anschließend durchgeführte Charakterisierung der mit MP, CS und Rapa stimulierten Dendritischen Zellen mittels Genexpressionsanalyse auf RNA-Ebene im Hinblick auf Adhäsionsmoleküle und extrazelluläre Matrixproteine/Enzyme bestätigte die im Adhäsionsassay gefundenen Resultate. So zeigte hier MP eine deutliche Reduktion der an der Adhäsion beteiligten Integrine und für Transmigration notwendige Basalmembran schneidenden Enzyme. Auch CS und Rapa präsentierten Auswirkungen auf die Genexpression einzelner an der Adhäsion beteiligter Strukturen und Faktoren, jedoch lediglich entsprechend dem im Adhäsionsassay gezeigten geringeren Ausmaß.

Zusammenfassend konnte anhand dieser Arbeit in einem in-vitro Modell der endothelaktivierende Einfluss von Immunsuppressiva gezeigt werden, der möglicherweise an der Progression einer Transplantatvaskulopathie beteiligt ist. Die Endothelaktivierung durch die Immunsuppressiva führt jedoch nicht zu einer erhöhten Rekrutierung von Dendritischen Zellen, da

durch immunsuppressive Behandlung verschiedene Adhäsionsmoleküle auf Dendritischen Zellen herunterreguliert werden. Somit wurde ein weiterer Wirkungsmechanismus der Immunsuppressiva zur Unterdrückung einer Immunantwort charakterisiert.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema zur Entstehung der Transplantatvaskulopathie.....	7
Abbildungen 2: Gefäßaufbau	8
Abbildung 3: Wechselwirkung von NO und ET-1.....	11
Abbildung 4: Schematische Leukozyten-Endothel Interaktion.....	13
Abbildung 5: Die Entwicklung von DCs auf verschiedenen Vorläufern.....	14
Abbildung 6: Die dendritische Zelle und ihre Haupt- Adhäsions- und kostimulatorischen Moleküle	15
Abbildung 7: DC Migration, Antigenaufnahme und T-Zellaktivierung	16
Abbildung 8: Vom DC Vorläufer zum maturen DC	16
Abbildung 9: Aufbau eines Lymphknotens	17
Abbildung 10: Der Unterschied zwischen myeloiden und lymphoiden DCs.....	18
Abbildung 11: plasmazytoide und myeloide DC und ihre T-Zell Aktivierung.....	18
Abbildungen 12: T-Zell Aktivierung.....	20
Abbildung 13: Hemmung der T-Zell Aktivierung durch Immunsuppressiva.....	21
Abbildung 14: Die Neubauer Zählkammer.....	28
Abbildung 15: Das Prinzip des BrdU-ELISAs.....	31
Abbildung 16: Das Prinzip des ET-1 ELISAs.....	32
Abbildung 17: Endothelmonolayer mit adhärenenten DCs.....	36
Abbildung 18: Verdünnungsreihe von MDC an konfluenten mEC.....	38
Abbildung 19: Beispiel eines Gel-Fotos der S28 S18 rRNA.....	41
Abbildung 20: Prinzip des GEArrays.....	42
Abbildung 21: Das Prinzip der PCR.....	44
Abbildung 22: Beispiel eines semiquantitativen PCR Gels.....	47
Abbildung 23: Ficoll Aufreinigung von PBMC aus heparinisiertem Vollblut.....	48
Abbildung 24: Verhältnis des oxidativen Stresses immunstimulierter HMEC-1 von Hypoxie zu Normoxie.....	53
Abbildung 25: Immunsuppressive Induktion von oxidativem Stress.....	54
Abbildung 26: Die Korrelation von oxidativem Stress und Apoptose.....	55
Abbildung 27: Die Korrelation von oxidativem Stress und metabolischer Aktivität.....	56
Abbildung 28: Immunsuppressive Änderung der Proliferation von HMEC-1.....	57
Abbildung 29: Einfluss der Immunsuppressiva auf die endotheliale NO-Produktion.....	58
Abbildung 30: Immunsuppressive Stimulation und endotheliale ET-1 Freisetzung.....	59
Abbildung 31: Der kumulative endotheliale Index unter Normoxie und Hypoxie	60
Abbildung 32: Vergleich der NO Produktion von HMEC-1 und murinen, aortalen ECs...61/62	
Abbildung 33: Adhäsion von mDCs an mECs.....	63/64
Abbildung 34: Viabilität von immunsuppressiv stimulierten mDCs.....	65
Abbildung 35: Einfluss der mDC Viabilität auf die Ergebnisse der mDC Adhärenz an mEC.65	
Abbildung 36 : Überprüfung der Ergebnisse des GEArray (murin).....	73
Abbildungen 37: FACS-Analyse der hDCs.....	75
Abbildungen 38: Invertierte Bilder des GEArrays (human).....	76/77
Abbildung 39: Überprüfung der Ergebnisse des GEArray (human) anhand semiquantitativer PCR.....	81

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Endothelfunktion	9
Tabelle 2: Adhäsionsmoleküle, die an Adhäsion und Transmigration beteiligt sind.....	12
Tabelle 3: mDCAdhäsion an mECs	62
Tabelle 4: Ergebnisse der mDC RNA-Isolierung	66
Tabelle 5: Rohdaten des GEArrays für murine Adhäsionsmoleküle.....	67
Tabelle 6: Daten (GEArray) der immunsuppressiv stimulierten DCs im Verhältnis zu unstimulierten Kontrolle.....	70
Tabelle 7: Ergebnisse der hDC RNA-Isolierung.....	76
Tabelle 8 : Auswertung des GEArray für humane Adhäsionsmoleküle und extrazelluläre Matrix Proteine (von oben links nach unten rechts) nach Hintergrundabzug, Bezug auf GAPDH.....	78

Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Transcription factor AP-1
CC	chemokine
CD	cluster of differentiation
CS	Cyclosporin
DC	dendritic cell (Dendritische Zelle)
EC	endothelial cell (Endothelzelle)
ECE	Endothelin converting enzyme
ECM	Extracellular matrix protein
E-Selectin	Endothelial Selectin
ESL	E- Selectin ligand
ET-1	Endothelin 1
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulation factor
HLA	human leukocyte antigen
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IL	Interleukin
INF	Interferon
JAM	junctional adhesion molecule
L-Arg	L- Arginin
LC	Langerhans cell LFA
LFA	leukocyte function associated antigen
LPS	Lipopolysaccharide
L-Selectin	Leukocyte Selectin
MCP	monocyte chemoattractant protein
M-CSF	macrophage colony stimulation factor
MP	Methylprednisolon
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MMF	Mycophenolsäure
MMP	Matrix Metalloproteinase
NF κ _B	nuclear factor kappa B
NF-AT	nuclear factor of activation in T-cells
NO	Nitric oxide, Stickstoffmonoxid
NOS	Nitric oxide synthase
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule
ppET	prepro Endothelin
P-Selectin	Platelet (=Thrombozyten) Selectin
PSGL	P- Selectin glycoprotein ligand
VCAM	vascular cell adhesion molecule
Rapa	Rapamycin
ROS	reactive oxygen species (Sauerstoffradikale)
ROI	reactive oxygen intermediates (Sauerstoffradikale)
TCR	T-cell receptor
Tac	Tacrolimus
TGF	tissue growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
tPA	tissue Plasminogen Activator
uPA	Urokinase Plasminogen Activator
VLA	very late antigen

Literaturverzeichnis

- ABE, M. & THOMSON, A.W. (2003). Influence of immunosuppressive drugs on dendritic cells. *Transpl Immunol*, **11**, 357-65.
- ADES EW, C.F., SWERLICK RA, GEORGE VG, SUMMERS S, BOSSE DC, LAWLEY TJ (1992). HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol*, **99**, 683-90.
- ALONSO, D. & RADOMSKI, M.W. (2003). The nitric oxide-endothelin-1 connection. *Heart Fail Rev*, **8**, 107-15.
- ALONSO D, R.M. (2003). The nitric oxide-endothelin-1 connection. *Heart Fail Rev*, **8**, 107-15.
- AMBERGER A, H.M., SAURWEIN-TEISSL M, METZLER B, GRUBECK-LOEBENSTEIN B, XU Q, WICK G. (1999). Suppressive effects of anti-inflammatory agents on human endothelial cell activation and induction of heat shock proteins. *Mol Med*, **5**, 117-28.
- AMMON, C., MEYER, S.P., SCHWARZFISCHER, L., KRAUSE, S.W., ANDREESEN, R. & KREUTZ, M. (2000). Comparative analysis of integrin expression on monocyte-derived macrophages and monocyte-derived dendritic cells. *Immunology*, **100**, 364-9.
- ANDERSON, T.J. (2003). Nitric oxide, atherosclerosis and the clinical relevance of endothelial dysfunction. *Heart Fail Rev*, **8**, 71-86.
- ARMSTRONG, V.W. & OELLERICH, M. (2001). New developments in the immunosuppressive drug monitoring of cyclosporine, tacrolimus, and azathioprine. *Clin Biochem*, **34**, 9-16.
- AUPHAN, N., DiDONATO, J.A., ROSETTE, C., HELMBERG, A. & KARIN, M. (1995). Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science*, **270**, 286-90.
- AZIZIAN, M., RAMENADEN, E.R., SHAH, G., WILASRUSMEE, C., BRUCH, D. & KITTUR, D.S. (2004). Augmentation of ischemia/reperfusion injury to endothelial cells by cyclosporin A. *Am Surg*, **70**, 438-42.
- BANCHEREAU, J., BRIERE, F., CAUX, C., DAVOUST, J., LEBECQUE, S., LIU, Y.J., PULENDRAN, B. & PALUCKA, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, **18**, 767-811.
- BECKER, B.F., HEINDL, B., KUPATT, C. & ZAHLER, S. (2000). Endothelial function and hemostasis. *Z Kardiol*, **89**, 160-7.
- BLANKENBERG, S., BARBAUX, S. & TIRET, L. (2003). Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, **170**, 191-203.
- BLANTZ, R.C. & MUNGER, K. (2002). Role of nitric oxide in inflammatory conditions. *Nephron*, **90**, 373-8.
- BONNEFOY A, H.J., PFLIEGLER G, FAUVEL-LAFEVE F, LEGRAND C. (2001). The subendothelium of the HMEC-1 cell line supports thrombus formation in the absence of von Willebrand factor and collagen types I, III and VI. *Thromb Haemost*, **85**, 552-9.
- BOURBON, A., VIONNET, M., LEPRINCE, P., VAISSIER, E., COPELAND, J., MCDONAGH, P., DEBRE, P. & GANDJBAKHCH, I. (2004). The effect of methylprednisolone treatment on the cardiopulmonary bypass-induced systemic inflammatory response. *Eur J Cardiothorac Surg*, **26**, 932-8.
- BROWN, K.A., BEDFORD, P., MACEY, M., MCCARTHY, D.A., LEROY, F., VORA, A.J., STAGG, A.J., DUMONDE, D.C. & KNIGHT, S.C. (1997). Human blood dendritic cells: binding to vascular endothelium and expression of adhesion molecules. *Clin Exp Immunol*, **107**, 601-7.

- BURG, G., STUNKEL, K.G., BIEBER, T., OPITZ, U. & KAUDEWITZ, P. (1987). Cutaneous infiltrates of histiocytosis X contain plasminogen activator-bearing epidermotropic dendritic cells different from Langerhans cells. *Arch Dermatol Res*, **279 Suppl**, S88-91.
- BUTZAL, M., LOGES, S., SCHWEIZER, M., FISCHER, U., GEHLING, U.M., HOSSFELD, D.K. & FIEDLER, W. (2004). Rapamycin inhibits proliferation and differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Exp Cell Res*, **300**, 65-71.
- CALO, L.A., DAVIS, P.A., GIACON, B., PAGNIN, E., SARTORI, M., RIEGLER, P., ANTONELLO, A., HUBER, W. & SEMPLICINI, A. (2002). Oxidative stress in kidney transplant patients with calcineurin inhibitor-induced hypertension: effect of ramipril. *J Cardiovasc Pharmacol*, **40**, 625-31.
- CERA, M.R., DEL PRETE, A., VECCHI, A., CORADA, M., MARTIN-PADURA, I., MOTOIKE, T., TONETTI, P., BAZZONI, G., VERMI, W., GENTILI, F., BERNASCONI, S., SATO, T.N., MANTOVANI, A. & DEJANA, E. (2004). Increased DC trafficking to lymph nodes and contact hypersensitivity in junctional adhesion molecule-A-deficient mice. *J Clin Invest*, **114**, 729-38.
- CHIANG, P.H., WANG, L., BONHAM, C.A., LIANG, X., FUNG, J.J., LU, L. & QIAN, S. (2004). Mechanistic insights into impaired dendritic cell function by rapamycin: inhibition of Jak2/Stat4 signaling pathway. *J Immunol*, **172**, 1355-63.
- CHOI, J.S., CHOI, Y.J., PARK, S.H., KANG, J.S. & KANG, Y.H. (2004). Flavones mitigate tumor necrosis factor-alpha-induced adhesion molecule upregulation in cultured human endothelial cells: role of nuclear factor-kappa B. *J Nutr*, **134**, 1013-9.
- CINES, D.B., POLLAK, E.S., BUCK, C.A., LOSCALZO, J., ZIMMERMAN, G.A., MCEVER, R.P., POBER, J.S., WICK, T.M., KONKLE, B.A., SCHWARTZ, B.S., BARNATHAN, E.S., MCCRAE, K.R., HUG, B.A., SCHMIDT, A.M. & STERN, D.M. (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, **91**, 3527-61.
- COCHET, O., TEILLAUD, J.L. & SAUTES, C. (1998). *Immunological Techniques made easy*. Weinheim, Germany: John Wiley & Sons.
- COLVIN, B.L., LAU, A.H., SCHELL, A.M. & THOMSON, A.W. (2004). Disparate ability of murine CD8alpha- and CD8alpha+ dendritic cell subsets to traverse endothelium is not determined by differential CD11b expression. *Immunology*, **113**, 328-37.
- COOPER, D., STOKES, K.Y., TAILOR, A. & GRANGER, D.N. (2002). Oxidative stress promotes blood cell-endothelial cell interactions in the microcirculation. *Cardiovasc Toxicol*, **2**, 165-80.
- COSTANZO, M.R. (2001). New immunosuppressive drugs in heart transplantation. *Curr Control Trials Cardiovasc Med*, **2**, 45-53.
- CZOCK, D., KELLER, F., RASCHE, F.M. & HAUSSLER, U. (2005). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clin Pharmacokinet*, **44**, 61-98.
- D'AMICO, G., BIANCHI, G., BERNASCONI, S., BERSANI, L., PIEMONTE, L., SOZZANI, S., MANTOVANI, A. & ALLAVENA, P. (1998). Adhesion, transendothelial migration, and reverse transmigration of in vitro cultured dendritic cells. *Blood*, **92**, 207-14.
- DE LA ROSA, G., LONGO, N., RODRIGUEZ-FERNANDEZ, J.L., PUIG-KROGER, A., PINEDA, A., CORBI, A.L. & SANCHEZ-MATEOS, P. (2003). Migration of human blood dendritic cells across endothelial cell monolayers: adhesion molecules and chemokines involved in subset-specific transmigration. *J Leukoc Biol*, **73**, 639-49.
- FAJARDO, L.F. (1989). The complexity of endothelial cells. A review. *Am J Clin Pathol*, **92**, 241-50.

- FERRARI, R., GUARDIGLI, G., MELE, D., PERCOCO, G.F., CECONI, C. & CURELLO, S. (2004). Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Curr Pharm Des*, **10**, 1699-711.
- FERRERO, E., VETTORETTO, K., BONDANZA, A., VILLA, A., RESNATI, M., POGGI, A. & ZOCCHI, M.R. (2000). uPA/uPAR system is active in immature dendritic cells derived from CD14+CD34+ precursors and is down-regulated upon maturation. *J Immunol*, **164**, 712-8.
- FORTH W, H.D., RUMMEL W (2004). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. München, Jena: Urban & Fischer Verlag.
- GELATI, M., CORSINI, E., DUFOUR, A., MASSA, G., GIOMBINI, S., SOLERO, C.L. & SALMAGGI, A. (2000). High-dose methylprednisolone reduces cytokine-induced adhesion molecules on human brain endothelium. *Can J Neurol Sci*, **27**, 241-4.
- GLUCKMAN, J.C., CANQUE, B. & ROSENZWAJG, M. (2002). Dendritic cells: a complex simplicity. *Transplantation*, **73**, S3-6.
- GOODING, J.M., YAP, K.L. & IKURA, M. (2004). The cadherin-catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures. *Bioessays*, **26**, 497-511.
- GORACA, A. (2002). New views on the role of endothelin (minireview). *Endocr Regul*, **36**, 161-7.
- GRANUCCI, F., ZANONI, I., FEAU, S., CAPUANO, G. & RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. (2004). The regulatory role of dendritic cells in the immune response. *Int Arch Allergy Immunol*, **134**, 179-85.
- GRIFFITH, O.W. & STUEHR, D.J. (1995). Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol*, **57**, 707-36.
- HA, H., PARK, J., KIM, Y.S. & ENDOU, H. (2004). Oxidative stress and chronic allograft nephropathy. *Yonsei Med J*, **45**, 1049-52.
- HACKSTEIN, H. & THOMSON, A.W. (2004). Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol*, **4**, 24-34.
- HAUG, C., SCHMID-KOTSAS, A., LINDER, T., JEHL, P.M., BACHEM, M.G., GRUENERT, A. & ROZDZINSKI, E. (2002). The immunosuppressive drug mycophenolic acid reduces endothelin-1 synthesis in endothelial cells and renal epithelial cells. *Clin Sci (Lond)*, **103 Suppl 48**, 76S-80S.
- HOLLENBERG, S.M., KLEIN, L.W., PARRILLO, J.E., SCHERER, M., BURNS, D., TAMBURRO, P., OBEROI, M., JOHNSON, M.R. & COSTANZO, M.R. (2001). Coronary endothelial dysfunction after heart transplantation predicts allograft vasculopathy and cardiac death. *Circulation*, **104**, 3091-6.
- HUANG, Y., LIU, Z., HUANG, H., LIU, H. & LI, L. (2005). Effects of mycophenolic acid on endothelial cells. *Int Immunopharmacol*, **5**, 1029-39.
- JANEWAY CA, T.P. (1995). *Immunologie*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.
- JIANG, M.Z., TSUKAHARA, H., OHSHIMA, Y., TODOROKI, Y., HIRAOKA, M., MAEDA, M. & MAYUMI, M. (2004). Effects of antioxidants and nitric oxide on TNF-alpha-induced adhesion molecule expression and NF-kappaB activation in human dermal microvascular endothelial cells. *Life Sci*, **75**, 1159-70.
- JOZSEF, L., KHREISS, T., FOURNIER, A., CHAN, J.S. & FILEP, J.G. (2002). Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in endothelin-1-induced homotypic adhesion of human neutrophil granulocytes. *Br J Pharmacol*, **135**, 1167-74.
- KAHAN, B.D. (2001). Potential therapeutic interventions to avoid or treat chronic allograft dysfunction. *Transplantation*, **71**, SS52-7.

- KARLSON P, D.D., KOOLMAN J (1994). *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- KARLSSON, H. & NASSBERGER, L. (1997). FK506 suppresses the mitogen-induced increase in lymphocyte adhesiveness to endothelial cells, but does not affect endothelial cell activation in response to inflammatory stimuli. *Transplantation*, **64**, 1217-20.
- KEOGH, A. (2004). Calcineurin inhibitors in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*, **23**, S202-6.
- KOJIMA, H. (1998). Detection and Imaging of Nitric Oxide with Novel Fluorescent Indicators: Diaminofluoresceins. *Analytical Chemistry*, **70**, 2446-2453.
- KRUIDERING, M. & EVAN, G.I. (2000). Caspase-8 in apoptosis: the beginning of "the end"? *IUBMB Life*, **50**, 85-90.
- LAGARAINÉ, C. & LEBRANCHU, Y. (2003). Effects of immunosuppressive drugs on dendritic cells and tolerance induction. *Transplantation*, **75**, 37S-42S.
- LEE, H.Y., KANG, H.K., JO, E.J., KIM, J.I., LEE, Y.N., LEE, S.H., PARK, Y.M., RYU, S.H., KWAK, J.Y. & BAE, Y.S. (2004). Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met stimulates phagocytosis via phospho-lipase D-dependent signaling in mouse dendritic cells. *Exp Mol Med*, **36**, 135-44.
- LEE, J.I., GANSTER, R.W., GELLER, D.A., BURCKART, G.J., THOMSON, A.W. & LU, L. (1999). Cyclosporine A inhibits the expression of costimulatory molecules on in vitro-generated dendritic cells: association with reduced nuclear translocation of nuclear factor kappa B. *Transplantation*, **68**, 1255-63.
- LI, L., CHU, Y., FINK, G.D., ENGELHARDT, J.F., HEISTAD, D.D. & CHEN, A.F. (2003). Endothelin-1 stimulates arterial VCAM-1 expression via NADPH oxidase-derived superoxide in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension*, **42**, 997-1003.
- LONGONI, B., BOSCHI, E., DEMONTIS, G.C., MARCHIAFAVA, P.L. & MOSCA, F. (1999). Regulation of Bcl-2 protein expression during oxidative stress in neuronal and in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **260**, 522-6.
- LONGONI, B., BOSCHI, E., DEMONTIS, G.C., RATTO, G.M. & MOSCA, F. (2001). Apoptosis and adaptive responses to oxidative stress in human endothelial cells exposed to cyclosporin A correlate with BCL-2 expression levels. *Faseb J*, **15**, 731-40.
- MARSEN, T.A., WEBER, F., EGINK, G., SUCKAU, G. & BALDAMUS, C.A. (1999). Cyclosporin A induces prepro endothelin-1 gene transcription in human endothelial cells. *Eur J Pharmacol*, **379**, 97-106.
- MITTELBRUNN, M., MOLINA, A., ESCRIBESE, M.M., YANEZ-MO, M., ESCUDERO, E., URSA, A., TEJEDOR, R., MAMPASO, F. & SANCHEZ-MADRID, F. (2004). VLA-4 integrin concentrates at the peripheral supramolecular activation complex of the immune synapse and drives T helper 1 responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 11058-63.
- MOGAYZEL, P.J., JR. & WAGNER, T.L. (2003). Cyclosporin and tacrolimus do not potentiate oxidative damage in pulmonary epithelial cells. *Transpl Int*, **16**, 709-12.
- MOHACSI, P.J., TULLER, D., HULLIGER, B. & WIJNGAARD, P.L. (1997). Different inhibitory effects of immunosuppressive drugs on human and rat aortic smooth muscle and endothelial cell proliferation stimulated by platelet-derived growth factor or endothelial cell growth factor. *J Heart Lung Transplant*, **16**, 484-92.
- MOHAMADZADEH, M., MOHAMADZADEH, H., BRAMMER, M., SESTAK, K. & LUFTIG, R.B. (2004). Identification of proteases employed by dendritic cells in the processing of protein purified derivative (PPD). *J Immune Based Ther Vaccines*, **2**, 8.
- MOIEN-AFSHARI, F., MCMANUS, B.M. & LAHER, I. (2003). Immunosuppression and transplant vascular disease: benefits and adverse effects. *Pharmacol Ther*, **100**, 141-56.

- MORENO, J.M., RUIZ, M.C., RUIZ, N., GOMEZ, I., VARGAS, F., ASENSIO, C. & OSUNA, A. (2005). Modulation factors of oxidative status in stable renal transplantation. *Transplant Proc*, **37**, 1428-30.
- MULLER, W. (2003). Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends in Immunology*, **24**, 326-33.
- MURAMATSU, T. & MIYAUCHI, T. (2003). Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histol Histopathol*, **18**, 981-7.
- NAOUM, J.J., WOODSIDE, K.J., ZHANG, S., RYCHAHOU, P.G. & HUNTER, G.C. (2005). Effects of rapamycin on the arterial inflammatory response in atherosclerotic plaques in apo-e knockout mice. *Transplant Proc*, **37**, 1880-4.
- NAOUM, J.J., ZHANG, S., WOODSIDE, K.J., SONG, W., GUO, Q., BELALCAZAR, L.M. & HUNTER, G.C. (2004). Aortic eNOS expression and phosphorylation in Apo-E knockout mice: differing effects of rapamycin and simvastatin. *Surgery*, **136**, 323-8.
- NAVARRO-ANTOLIN, J., LÓPEZ-MUNOZ, M.J., KLATT, P., SORIA, J., MICHEL, T. & LAMAS, S. (2001). Formation of peroxynitrite in vascular endothelial cells exposed to cyclosporine A. *The FASEB Journal*.
- NOTI, J.D. (2004). Expression and function of the leukocyte integrins in organ transplant rejection. *Curr Med Chem*, **11**, 477-90.
- PARK, J., HA, H., SEO, J., KIM, M.S., KIM, H.J., HUH, K.H., PARK, K. & KIM, Y.S. (2004). Mycophenolic acid inhibits platelet-derived growth factor-induced reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase activation in rat vascular smooth muscle cells. *Am J Transplant*, **4**, 1982-90.
- PITZALIS, C., PIPITONE, N. & PERRETTI, M. (2002). Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids. *Ann N Y Acad Sci*, **966**, 108-18.
- POHLMAN T H, H.J.M. (2000). Adaptive Responses to the Endothelium to Stress. *J Surg Res*, **89**, 85-119.
- POHLMAN, T.H. & HARLAN, J.M. (2000). Adaptive responses of the endothelium to stress. *J Surg Res*, **89**, 85-119.
- RAAB, M., DAXECKER, H., KARIMI, A., MARKOVIC, S., CICHNA, M., MARKL, P. & MULLER, M.M. (2001). In vitro effects of mycophenolic acid on the nucleotide pool and on the expression of adhesion molecules of human umbilical vein endothelial cells. *Clin Chim Acta*, **310**, 89-98.
- SCHELD HH, D.M., HAMMEL D, SCHMID C (2001). *Leitfaden Herztransplantation*. Darmstadt: Steinkopff Verlag.
- SHEN, Z., REZNIKOFF, G., DRANOFF, G. & ROCK, K.L. (1997). Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol*, **158**, 2723-30.
- STROES, E.S., LUSCHER, T.F., DE GROOT, F.G., KOOMANS, H.A. & RABELINK, T.J. (1997). Cyclosporin A increases nitric oxide activity in vivo. *Hypertension*, **29**, 570-5.
- STRYER, L. (1990). *Biochemie*. Heidelberg: Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH.
- TAKEDA Y, M.I., FURUKAWA K, INABA S, MABUCHI H. (1999). Mechanisms of FK 506-induced hypertension in the rat. *Hypertension*, **33**, 130-6.
- TAKEDA, Y., YONEDA, T., ITO, Y., MIYAMORI, I. & TAKEDA, R. (1993). Stimulation of endothelin mRNA and secretion in human endothelial cells by FK 506. *J Cardiovasc Pharmacol*, **22 Suppl 8**, S310-2.

- TEUNISSEN, M.B., DE JAGER, M.H., KAPSENBERG, M.L. & BOS, J.D. (1991). Inhibitory effect of cyclosporin A on antigen and alloantigen presenting capacity of human epidermal Langerhans cells. *Br J Dermatol*, **125**, 309-16.
- TRULOCK, E.P., EDWARDS, L.B., TAYLOR, D.O., BOUCEK, M.M., KECK, B.M. & HERTZ, M.I. (2004). The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-first official adult heart transplant report--2004. *J Heart Lung Transplant*, **23**, 804-15.
- VALUJSKIKH, A. & HEEGER, P.S. (2003). Emerging roles of endothelial cells in transplant rejection. *Curr Opin Immunol*, **15**, 493-8.
- VAN KOOYK, Y. & GEIJTENBEEK, T.B. (2002). A novel adhesion pathway that regulates dendritic cell trafficking and T cell interactions. *Immunol Rev*, **186**, 47-56.
- VERHAAR, M.C., STRACHAN, F.E., NEWBY, D.E., CRUDEN, N.L., KOOMANS, H.A., RABELINK, T.J. & WEBB, D.J. (1998). Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. *Circulation*, **97**, 752-6.
- VERMA, S. & ANDERSON, T.J. (2002). Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation*, **105**, 546-9.
- VOLK, T., SCHMUTZLER, M., ENGELHARDT, L., PANTKE, U., LAULE, M., STANGL, K., GRUNE, T., WERNECKE, K.D., KONERTZ, W. & KOX, W.J. (2003). Effects of different steroid treatment on reperfusion-associated production of reactive oxygen species and arrhythmias during coronary surgery. *Acta Anaesthesiol Scand*, **47**, 667-74.
- WALZOG, B. & GAEHTGENS, P. (2000). Adhesion Molecules: The Path to a New Understanding of Acute Inflammation. *News Physiol Sci*, **15**, 107-113.
- WANG H, J.J. (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med*, **27**, 612-6.
- WEIS, M., PEHLIVANLI, S. & VON SCHEIDT, W. (2000). Heart allograft endothelial cell dysfunction. Cause, course, and consequences. *Z Kardiol*, **89 Suppl 9**, IX/58-62.
- WEIS, M., SCHLICHTING, C.L., ENGLEMAN, E.G. & COOKE, J.P. (2002). Endothelial determinants of dendritic cell adhesion and migration: new implications for vascular diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **22**, 1817-23.
- WEIS, M. & VON SCHEIDT, W. (1997). Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Circulation*, **96**, 2069-77.
- WEISS, J.M., SLEEMAN, J., RENKL, A.C., DITTMAR, H., TERMEER, C.C., TAXIS, S., HOWELLS, N., HOFMANN, M., KOHLER, G., SCHOPF, E., PONTA, H., HERRLICH, P. & SIMON, J.C. (1997). An essential role for CD44 variant isoforms in epidermal Langerhans cell and blood dendritic cell function. *J Cell Biol*, **137**, 1137-47.
- WILASRUSMEE, C., DA SILVA, M., SIDDIQUI, J., BRUCH, D., KITTUR, S., WILASRUSMEE, S. & KITTUR, D.S. (2003). Role of endothelin-1 in microvascular dysfunction caused by cyclosporin A. *J Am Coll Surg*, **196**, 584-91.
- WOLTMAN, A.M. & VAN KOOTEN, C. (2003). Functional modulation of dendritic cells to suppress adaptive immune responses. *J Leukoc Biol*, **73**, 428-41.
- YATSCOFF, R.W., FRYER, J. & THLIVERIS, J.A. (1993). Comparison of the effect of rapamycin and FK506 on release of prostacyclin and endothelin in vitro. *Clin Biochem*, **26**, 409-14.
- ZAPOLSKA-DOWNAR, D., SIENNICKA, A., KACZMARCZYK, M., KOLODZIEJ, B. & NARUSZEWICZ, M. (2004). Simvastatin modulates TNFalpha-induced adhesion molecules expression in human endothelial cells. *Life Sci*, **75**, 1287-302.

ZAVASNIK-BERGANT, T., REPNIK, U., SCHWEIGER, A., ROMIH, R., JERAS, M., TURK, V. & KOS, J. (2005). Differentiation- and maturation-dependent content, localization, and secretion of cystatin C in human dendritic cells. *J Leukoc Biol.*

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei PD Dr. med. Michael Weis für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas und der Möglichkeit zur eigenständigen Planung und Durchführung der Experimente bedanken. Die Diskussionsbereitschaft und auch die große Unterstützung zur Teilnahme an Kongressen und Kolloquien habe ich sehr geschätzt.

Auch Prof. Dr. med. W. von Scheidt möchte ich für die anfängliche Ermöglichung der Doktorarbeit durch seine Betreuung danken.

Prof. Dr. med. G. Steinbeck danke ich für die Übernahme der Arbeit an die Medizinische Klinik und Poliklinik I an der LMU München.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. W. Siess, der mir sowohl die finanzielle Unterstützung als auch die Teilnahme am hervorragenden Programm des DFG-geförderten Graduiertenkollegs „Vaskuläre Biologie in der Medizin“ ermöglichte.

Den technischen Assistentinnen Conny Grimm, Genoveva Kim, Bianca Hildebrand und Andrea Plasse danke ich für die stets freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit und Unterstützung und die freundschaftliche Atmosphäre im Labor.

Den „GRK-Mädels“ Claudia Vosseler, Tina Rubic, Melanie Antl, Simone Blattner und Katrin Schürzinger danke ich für den regen Austausch und die motivationsfördernden Treffen, auch bzw. vor allem außerhalb des Graduiertenkollegs.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. med. Ute Wilbert-Lampen bedanken, die mir durch die Übernahme in ihre Arbeitsgruppe die schriftliche Fertigstellung der vorliegenden Arbeit sehr erleichtert hat.

Für das stets offene Ohr und die Geduld in allen Belangen danke ich insbesondere Dr. rer. biol. hum. Christian Seliger, der mir mit Rat und Tat zu Seite stand.

Meine größte Dankbarkeit gilt meinen Eltern, meiner gesamten Familie und meinen Freunden, die mir durch die große Unterstützung, viel Verständnis und die anhaltende Geduld überhaupt das Gelingen der vorliegenden Arbeit ermöglicht haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Anja Carola Trapp
geboren am: 12.06.1972
in: München
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1978-1982 Grundschole Kleinhadern / Lochham
1982-1991 Bertold-Brecht-Gymnasium München
Abschluss: Abitur

Studienlaufbahn:

Nov. 1992 - März 1999 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berufstätigkeit:

01 Mai 1999 bis 15 Juli 2001 Labor- und Produktionsbereichsleiterin, stellvertretende Kontroll- und Herstellungsleiterin bei Vascular Biotech GmbH

01 August 2001 bis 31 Oktober 2004 Experimentelle Durchführung der vorliegenden Dissertation in der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München mit 3 jährigem Stipendium des DFG geförderten Graduiertenkolleges GRK438 „Vascular Biology in Medicine“

seit 01.11.2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe Dr. med. U. Wilbert-Lampen in der Medizinische Klinik und Poliklinik I des Klinikum Großhadern der LMU München

Wissenschaftliche Beiträge

Publikationen:

Trapp A, Weis M: The impact of immunosuppression on endothelial function.
J Cardiovasc Pharmacol 2005 Jan; 45(1): 81-7

Präsentationen:

a) Vorträge

Trapp A, Weis M: Einfluss der Immunsuppression auf die Endothelfunktion.
Z Kardio 2003, 92 Suppl 1

Trapp A, Weis M: Beeinflussung der Endothelin-1 Freisetzung, NO Produktion und Adhäsion von Dendritischen Zellen auf Endothelzellen durch Immunsuppressiva.
Z Kardio 2004, 93 Suppl 3

Trapp A, Weis M: Impact of immunosuppressive drugs on dendritic cell - endothelial cell interaction. EUROPEAN HEART JOURNAL 25: 345-345 Suppl. S AUG-SEP 2004

b) Poster

Weis M, Grimm C, Trapp A, Schlichting CL: Endothelin Regulates Dendritic Cell Adhesion and Transmigration; CIRCULATION 106 (19): 732 Suppl. S NOV 5 2002

Weis M, Trapp A, Grimm C, Schlichting CL. Endothelin moduliert die Adhäsion und Transmigration von Dendritischen Zellen; Z Kardio 2004, 93 Suppl 3

Trapp A, Weis M: Variations in endothelial activation by immunosuppressive agents.
EUROPEAN HEART JOURNAL 24: 609-609 Suppl. S AUG-SEP 2003