Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Zur Bedeutung des Prolaktins für Pathogenese und Krankheitsverlauf bei systemischem Lupus erythematodes (SLE)

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Frau Annett Marita Jacobi

aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Gutachter:

1. Herr Prof. Dr. Hiepe, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt für Rheumatologie und Klinische Immunologie, Charité Berlin
2. Frau Prof. Dr. Gromnica Ihle, Rheuma-Klinik, Berlin-Buch
3. Herr Prof. Dr. Schneider, Klinik für Nephrologie und Rheumatologie Heinrich Heine Universität Düsseldorf

Datum der Promotion: 22.05.2000

1 Einleitung 8

1.1 Ätiopathogenese des systemischen Lupus erythematodes 8

1.2 Prolaktin 10

1.2.1 Rückblick 10

1.2.2 Struktur 10

1.2.3 Funktion 11

1.2.4 Vorkommen 13

1.2.5 Hypophysäres Prolaktin 15

1.2.6 Prolaktin in der Schwangerschaft und Stillzeit 18

1.2.7 Hyperprolaktinämie 19

1.3 Der Prolaktinrezeptor 20

1.4 Rolle des Prolaktins im Immunsystem 22

2 Problemstellung 27

3 Eigene Untersuchungen 28

3.1 Material und Methoden 28

3.1.1 Bestimmung der Serumprolaktinspiegel 28

3.1.1.1 Charakterisierung der drei untersuchten Gruppen 28

3.1.1.1.1 SLE – Patienten 28
3.1.1.1.2 Patienten mit anderen Kollagenosen oder Vaskulitiden 29
3.1.1.1.3 Gesunde Kontrollgruppe.....30
3.1.1.2 Prolaktin-Bestimmung 30
3.1.1.2.1 Enzymimmunoassay 31
3.1.1.2.2 Immunradiometrischer Assay (IRMA).....32
3.1.1.3 Ermittlung des Aktivitätsindex bei SLE 34
3.1.1.4 Bestimmung verschiedener Autoantikörper.....34
3.1.1.5 Statistische Methoden 35
3.1.2 Effekte von Prolaktin auf die PBMC 36
3.1.2.1 Charakterisierung der untersuchten Gruppen 36
3.1.2.1.1 SLE-Patienten 36
3.1.2.1.2 Gesunde Kontrollgruppe.....37
3.1.2.2 Zellkulturen.....37
3.1.2.2.1 Lymphozytenkultur zur Immunglobulinproduktion 37
3.1.2.2.2 Zellkultur zur Zytokinproduktion.....38
3.1.2.3 Messungen.....39
3.1.2.3.1 IgG-Bestimmung in den Kulturüberständen.....39
3.1.2.3.2 Zytokinbestimmung 39
3.1.2.4 Statistische Methoden 42
3.1.3 Untersuchung einer Gruppe von Prolaktinompatienten auf das Vorhandensein von klinischen oder serologischen Anzeichen für einen Autoimmunprozeß.....43
3.1.3.1 Charakterisierung der zwei untersuchten Gruppen 43
3.1.3.1.1 Prolaktinompatienten.....43
3.1.3.1.2 Gesunde Kontrollgruppe.....43
3.1.3.2 Bestimmung der Autoantikörper 43
3.1.3.2.1 Antinukleäre Antikörper 43
3.1.3.2.2 Anti-dsDNA-Antikörper 44
3.1.3.2.3 Immunoblot.....44
3.1.3.3 Statistische Methoden 45

3.2 Ergebnisse 46

3.2.1 Verhalten der Serumprolaktinwerte bei SLE 46
3.2.1.1 Vergleich der Serumprolaktinwerte von SLE-Patienten und Gesunden.....46
3.2.1.2 Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität und der Höhe der Serumprolaktinwerte der SLE-Patienten 47
3.2.1.3 Zusammenhang zwischen der Art der SLE-Manifestation und der Höhe des Serumprolaktins 49
3.2.1.4 Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Autoantikörpern, deren Konzentration und den Serumprolaktinwerten 52
3.2.1.4.1 Anti-dsDNA-Antikörper 52
3.2.1.4.2 Anti-Cardiolipin-Antikörper.....52
3.2.1.4.3 Zirkulierende Immunkomplexe 53
3.2.1.5 Zusammenhang zwischen der immunsuppressiven Therapie der SLE-Patienten und den Serumprolaktinwerten 53
3.2.1.6 Verlaufsbeobachtung von SLE-Patienten hinsichtlich Krankheitsaktivität, Anti-dsDNA-Antikörper-Titer und Serumprolaktin.....55
3.2.2 In-vitro-Effekte von Prolaktin auf PBMC 59
3.2.2.1 IgG-Produktion 59
3.2.2.1.1 ... Abhängigkeit der durch PRL stimulierbaren IgG-Produktion der SLE-PBMC vom Prolaktinwert der Patienten 60
3.2.2.1.2 ..... Zusammenhang zwischen der durch PRL stimulierten IgG-Produktion der SLE-PBMC und der Krankheitsaktivität.....61
3.2.2.1.3 Vergleich der verwendeten Prolaktine 62
3.2.2.2 Zytokin-Produktion 62
3.2.3 Das Auftreten von Autoantikörpern und klinischen Befunden im Sinne einer Kollagenose bei Prolaktinompatienten 64
3.2.3.1 Autoantikörper bei Prolaktinompatienten.....64
3.2.3.1.1 ANA 64
3.2.3.1.2 Anti-dsDNA-Antikörper 68
3.2.4 klinische Befunde im Sinne einer Kollagenose bei Prolaktinompatienten 69

3.3 Diskussion 70
3.3.1 Verhalten der Serumprolaktinwerte bei SLE 70
3.3.1.1 Vergleich der Serumprolaktinwerte von SLE-Patienten und Gesunden 70
3.3.1.2 Zusammenhang zwischen dem Serumprolaktin und der Krankheitsaktivität bei SLE 73
3.3.1.3 Assoziation der Hyperprolaktinämie mit bestimmten Manifestationen des SLE 77
3.3.2 In-vitro-Effekte von Prolaktin auf PBMC 77
3.3.2.1 IgG-Produktion 77
3.3.2.2 Zytokin-Produktion 80
3.3.3 Das Auftreten von Autoantikörpern und klinischen Befunden im Sinne einer Kollagenose bei Prolaktinompatienten 81
3.3.4 Die Rolle des Prolaktins bei SLE-Patienten 82

4 Zusammenfassung 84

5 Literatur 86

6 Anhang 106

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACL-Ak	Anti-Cardiolipin-Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper

Anti-La-Ak	Autoantikörper gegen Zellkernantigen La(SS-B), Benennung nach Patientennamen
Anti-Sm-Ak	Autoantikörper gegen Zellkernantigen „Smith“, Benennung nach Patientennamen
Anti-Ro-Ak	Autoantikörper gegen zytoplasmatisches und Kernantigen „Robair“, Bennenung nach Patientennamen
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
Bcl-2	antiapoptotisch wirksames Protoonkogen
BRC	Bromocriptin (Dopamin-Agonist)
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
C3/4	Faktoren des Komplementsystems
CD	cluster of differentiation (designation)
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
Con-A	Concanavalin-A
D	Dopamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DsDNA	doppelsträngige DNA
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECLAM	European Consensus Lupus Activity Measurement
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
et al.	und Mitarbeiter
Fab	fragment of antigen binding
Fc	fragment crystallizable
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GH	Wachstumshormon (growth hormone)

GN	Glomerulonephritis
h	human
HPA-	hypothalomo-pituitary-adrenal-
HPRL	Hyperprolaktinämie
HWZ	Halbwertzeit
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGF	insulin-like growth factor
IL	Interleukin
IRMA	Immunoradiometrischer Assay
KD	Kilodalton
MCTD	Mischkollagenose (mixed connective tissue disease)
MCR	metabolic clearance rate
MW	Mittelwert
mRNA	messenger RNA
Nb2	T-Zell-Lymphom-Linie der Ratte
Nb2 BA	Nb2-Bioassay
LPS	Lipopolysacharid
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphatgepufferte Kochslzlösung
PHA	Phytohämagglutinin
POD	Peroxidase
PRL	Prolaktin
PWM	pokeweed mitogen

R	Rezeptor
r	rekombinant
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
RHS	Retikulohistiozytäres System
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
SD	Standardabweichung
SLE	systemischer Lupus erythematodes
(f)T3/T4	(freies) Trijodthyronin/Thyroxin
Tab.	Tabelle
TcR	T-Zell-Rezeptor
TH-	T-Helfer-
TNF	Tumor necrosis factor
TRH	Thyreotropin releasing hormone
TSH	Thyroidea stimulating hormone
VIP	Vasointestinales Polypeptid
vs.	versus

1 Einleitung

1.1 Ätiopathogenese des systemischen Lupus erythematodes

Obwohl der SLE ein sehr heterogenes Krankheitsbild darstellt, läßt sich feststellen, daß den zahlreichen klinischen Manifestationsformen ein relativ einheitlicher Prozeß zugrunde liegt. Es kommt zu einer Produktion verschiedener Autoantikörper gegen Bestandteile des Zellkerns, des Zytoplasmas und der Zelloberfläche (Anti-dsDNA, Anti-Sm, Anti-Ro, Anti-La, Anti-RNP) (1, 2, 3, 4, 5, 6). Diese bilden Immunkomplexe, welche dann auf dem Boden einer Vaskulitis bzw. lokalen Entzündungsreaktion nach Ablagerung in verschiedenen Geweben zur Aktivierung von Komoplementsystem und RHS mit Freisetzung zytotoxischer und immunmodulatorisch wirksamer Substanzen führen und damit den Grundstein für einen sich selbst verstärkenden Entzündungsprozeß legen. Der Grund für diese Autoantikörper-Produktion ist unter anderem eine generalisierte polyklonale B-Zell-Aktivierung (7, 8, 9, 10, 11), die als eine Folge des Zytokinungleichgewichtes zwischen TH1- und TH2-Zytokinen betrachtet werden kann (12, 13) und die oft zu beobachtende Hypergammaglobulinämie der Patienten erklärt. Das Zytokinungleichgewicht ist sowohl Ausdruck als auch eine Ursache der gestörten T- /B-Zell-Wechselwirkung bei SLE-Patienten (14, 15, 16, 17). So haben SLE-Patienten im Vergleich zu Gesunden eine verminderte Anzahl von TH1–T-Zellen, die IL-2 und IFN-γ produzieren. Auf der anderen Seite verfügen sie über eine erhöhte Anzahl von TH2–T-Zellen, Monozyten und auch B-Zellen, die IL-6 und IL-10 produzieren (18). TH1-Zytokin±e lenken die Immunreaktion normalerweise in Richtung zelluläre Immunantwort. TH2-Zytokine verstärken dagegen die humorale und hemmen (IL-10) die zelluläre Immunantwort (19). SLE-Patienten haben eine defiziente zelluläre Immunantwort vom verzögerten Typ (20). Die Aktivität der zytotoxischen T-Zellen ist vermindert (21, 22). Einige Autoren favorisieren einen autokrinen Regelkreis der SLE-B-Zellen, welche sich durch Produktion von IL-6 und IL-10 selbst in ihrer Anti-dsDNA-Produktion verstärken (16, 17), als Erklärung für die Autoantikörper-Produktion. Andere hingegen halten diese für einen T-Zell-abhängigen, Antigen-vermittelten Prozeß (23, 24, 25, 26). Zahlreiche T-Zell-Defekte sind bisher bei SLE-Patienten gefunden worden. Dazu gehören unter

anderem Störungen verschiedener Schlüsselfunktionen der frühen Zellaktivierung, wie intrazellulärer pH-Wert, intrazelluläre Kalziumkonzentration und CD69-Expression (27). Desweiteren werden TcR-Defekte (28) oder die erhöhte Expression des CD40-Liganden auf T- und B-Lymphozyten von SLE-Patienten als mögliche Ursachen der gestörten T-B-Zell-Wechselwirkung diskutiert (29). Obwohl die Höhe der Anti-dsDNA-Antikörper im Serum der Patienten häufig gut mit der Krankheitsaktivität korreliert (30, 6), muß allerdings die Rolle der Anti-dsDNA-Antikörper differenziert betrachtet werden, da sie unter bestimmten Bedingungen auch im Serum klinisch Gesunder vorkommen (31). Zur Ausprägung des Krankheitsbildes tragen Einflüsse aus Umwelt und Genetik bei. Eine nicht zu unterschätzende Rolle kommt in dieser Hinsicht auch der Wechselwirkung zwischen Immunsystem und Endokrinium zu (32). 5% der Verwandten eines SLE-Patienten sind ebenfalls erkrankt (33). Die Konkordanzrate bei eineiigen Zwillingen beträgt ca. 25% (34). Dies ist ein Indiz für die Bedeutung der Umwelteinflüsse. Heriditärere Defekte des Komplementsystems, wie das Fehlen von oder der Mangel an Komplementfaktoren, wie zum Beispiel C1q, C2 und C4 (35), können die Entstehung eines SLE bedingen. Ebenso können Umweltfaktoren wie Viren, UV-Licht oder Medikamente zur Manifestation eines SLE führen (36, 37). Hierbei handelt es sich um Vorgänge, die zur Freisetzung von sonst gegen das Immunsystem abgeschirmten Antigenen führen. Diese Antigene werden nach der Präsentation durch APZ als fremd erkannt, und sie lösen eine Immunantwort aus. Östrogene stehen schon seit langem unter Verdacht, an der Pathogenese des SLE beteiligt zu sein. So ist das Verhältnis der erkrankten Frauen und Männer 9:1. Es handelt sich häufig um Frauen im gebärfähigen Alter. Veränderungen im Hormonstatus, wie zum Beispiel eine Schwangerschaft, können mit einer Veränderung der Krankheitsaktivität assoziiert sein (38). Dem Testosteron wird hingegen eine protektive Rolle in Hinblick auf Zeitpunkt und Schweregrad der Manifestation des SLE zugeschrieben (39). Patienten mit SLE haben erniedrigte Dehydroepiandrosteron (DHEA)–Serumwerte, und eine Inkubation der SLE-Lymphozyten mit DHEA in vitro kann die defiziente IL-2 Produktion wiederherstellen (40). Auch für den Östrogen-Antagonisten Tamoxifen und monoklonale Anti-Östradiol-Antikörper ist im Tierexperiment eine verzögernde und abschwächende Wirkung hinsichtlich der Ausprägung einzelner Krankheitsmanifestationen nachgewiesen worden. Dem liegt unter anderem ein

Eingriff in das Muster der sezernierten Zytokine zugrunde, wobei die Wiederherstellung physiologischer Verhältnisse gezeigt werden konnte (41). Ein weiteres Hormon, das unter Umständen Einfluß auf den Krankheitsverlauf des SLE haben kann, ist das Prolaktin. Seine vielfältigen Funktionen und besonders seine immunologische Bedeutung sollen in den folgenden Kapiteln erläutert werden.

1.2 Prolaktin

1.2.1 Rückblick

Es wird über mehr als 85 verschiedene Funktionen berichtet, die das PRL bei den Wirbeltieren erfüllt (42). Es ist das vielseitigste Hormon überhaupt. Nach seiner Entdeckung 1928 (43) konnte es vier Jahre später erstmals isoliert werden (44). Allerdings erfolgte erst 1971 (45) die Isolierung des humanen PRL und die Abgrenzung vom Wachstumshormon (GH). Anfang der 80er Jahre gelang die Klonierung und Sequenzierung des PRL-Gens (46). In den letzten 10 Jahren wurden neue Erkenntnisse zur PRL-Gen-Regulation (47) und zur Struktur und Zuordnung des PRL-Rezeptors gewonnen (48).

1.2.2 Struktur

Prolaktin ist ein einkettiges Polypeptid mit 3 Disulfidbrücken. Es besteht aus 199 Aminosäuren. Sein Molekulargewicht beträgt 23 kDa (49). Die dreidimensionale Struktur des Prolaktins gleicht der vieler Zytokine (50). Das PRL-Gen befindet sich beim Menschen auf Chromosom Nr.6 (51). GH und PRL stimmen in ihrer Struktur zu 40 % überein. Das weist auf die Entwicklung ihrer heutigen Gene aus einem gemeinsamen Vorläufer hin. Dieser Prozeß vollzog sich im Laufe von 400 Millionen Jahren (52). Prolaktin kommt jedoch nicht nur in der oben beschriebenen 23-kDa-Form vor. Es existieren eine Vielzahl von Prolaktin-Varianten. Diese entstehen entweder durch modifiziertes Splicing oder durch posttranslatorische Veränderungen (53). Zu diesen gehören unter anderem die Bildung von Aggregaten, bestehend aus mehreren PRL-Molekülen, die protelytische Spaltung, die Glykosylierung oder Phosphorylierung des Prolaktins. Aus diesen

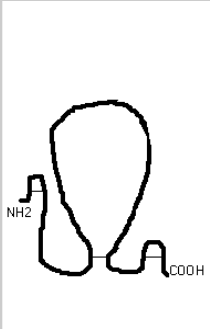
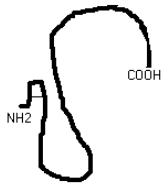
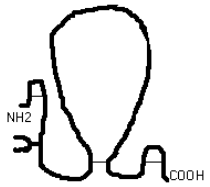
Veränderungen in der Molekülstruktur resultieren nun Abweichungen hinsichtlich der Rezeptoraffinität und des Wirkprofils dieser PRL-Varianten im Vergleich zum 23-kDa-PRL. Der Ort der posttranlationalen Modifizierung ist variabel. Sie kann z.B. am Ort der Synthese (54) oder aber im Zielgewebe (55) stattfinden. Prolaktin kann sich außerdem an IgG binden (56). Die IgG-PRL-Komplexe haben zwar keine verminderte biologische Aktivität (57), können jedoch aufgrund ihres hohen Molekulargewichts die Zielzelle schlechter erreichen. Dies könnte die verminderte Wirkung in vivo erklären. Bei der Bestimmung des Serumprolaktins muß beachtet werden, daß es sich in diesem Fall um etwas Heterogenes handelt. Es besteht aus vielen Varianten mit mehr oder weniger hoher biologischer Aktivität und unterschiedlich hohem Bindungsvermögen an die in den Assays verwendeten Antikörper. Die Heterogenität des Prolaktins kann die Ursache für Unterschiede in der durch verschiedene Assays (RIA, IRMA, Nb2BA) bestimmten Prolaktinkonzentration ein und desselben Serums sein (58). Tab. 1 soll einen Überblick über die bedeutendsten PRL-Formen, deren Entstehung, Struktur, Eigenschaften und Wirkung geben.

1.2.3 Funktion

Der Begriff Prolaktin läßt in erster Linie an ein durch die Hypophyse produziertes Hormon denken, welches seine Funktion in der Steuerung der Entwicklung der weiblichen Brustdrüse während der Schwangerschaft und der Aufrechterhaltung der Laktation im Anschluß an die Schwangerschaft hat. Dies ist zwar die eindrucksvollste, aber nur eine vieler Funktionen des Prolaktins beim Menschen. Weitere Wirkungen entfaltet das Prolaktin auf dem Gebiet der Immunmodulation, Osmoregulation und Verhaltensmodifikation. Auf Zellen kann Prolaktin mitogen, morphogen bzw. sekretionssteigernd wirken. Die Vielfalt dieser Funktionen läßt sich auf folgende Umstände zurückführen (59):

1. strukturelle Unterschiede des PRL (siehe Tab. 1)
2. verschiedene Orte der Produktion und des Processings
3. unterschiedliche intrazelluläre Signaltransduktion
4. verschiedene Zielgene

Tab. 1: Prolaktin-Varianten

PRL-Variante	MW	Struktur	Biol. Aktivität	Quelle/Wirkung
Makro- (big, big) PRL	>100 kDa	PRL-Autoantikörper (IgG) + 23kDa-PRL (60, 61) oder Polymer des 23kDa-PRL (62, 63)	unvermindert bzw. abhängig von den im Polymer enthaltenen PRL-Varianten	Neben der unverminderten Wirkung des PRL-IgG-Komplexes auf Nb2-Lymphomzellen gibt es Hinweise weiterer Funktionen, die durch natives PRL nicht erfüllt werden, z.B. kostimulatorisch auf die Proliferation maligner B-Lymphozyten zu wirken (64), Vorkommen: (Angaben verschieden) 3 (65) –16% (66) Schwangerer bzw. von Pat. mit HPRL
Natives (little) PRL	23kDa		100%	Siehe unten
16-kDa-PRL	16kDa		Bindungsfähigkeit an den PRL-R herabgesetzt	erzeugt durch eine Kathepsin D-ähnliche Protease und anschließende Reduktion der Disulfidbrücke Die Produkte sind das 16-kDa-PRL (PRL_{1-143}) und ein 8-kDa-Fragment. Der Anteil am sezernierten PRL beträgt 1%. Die Bindungsfähigkeit an den PRL-Rezeptor ist herabgesetzt (67). Es liegt keine Helix-Bündel-Struktur, wie bei einigen Interleukinen und dem nativen PRL vor. Es wirkt antiproliferativ auf Endothelzellen (68) über einen Rezeptor, der sich vom PRL-Rezeptor unterscheidet (69).
22-kDa-PRL	22kDa	PRL_{1-173}	vermindert	erzeugt durch Kallikrein in PRL-produzierenden Zellen (54). Die Produktion ist geschlechtsabhängig, durch Östrogene stimulierbar und durch Dopamin supprimierbar (70).
glykosyliertes PRL			häufig vermindert	Es kommt in der Hypophyse und im Plasma vor (15% des hypophysären PRL) Die zahlreichen verschiedenen Möglichkeiten der Glykosylierung sorgen für Unterschiede in der biologischen und immunologischen Aktivität, in der Rezeptoraffinität und MCR des PRL (53). Eine einheitliche Funktion kann dieser Variante nicht zugeordnet werden.

Es gibt Hinweise darauf, daß Prolaktin aus extrahypophysären Quellen einen Mangel an hypophysärem Prolaktin teilweise kompensieren kann (71). Es wird deutlich, wie komplex die Funktionen des Prolaktins sind. Das Prolaktin kann ohne weiters als Zytokin klassifiziert werden (59). Dafür sprechen:

1. Strukturbestandteile, die mit denen hämatopoetischer Wachstumsfaktoren vergleichbar sind
2. die zahlreichen Syntheseorte des PRL
3. die ubiquitäre Rezeptorverteilung des PRL-Rezeptors
4. eine homologe Rezeptorstruktur
5. ähnliche Wege der intrazellulären Signaltransduktion

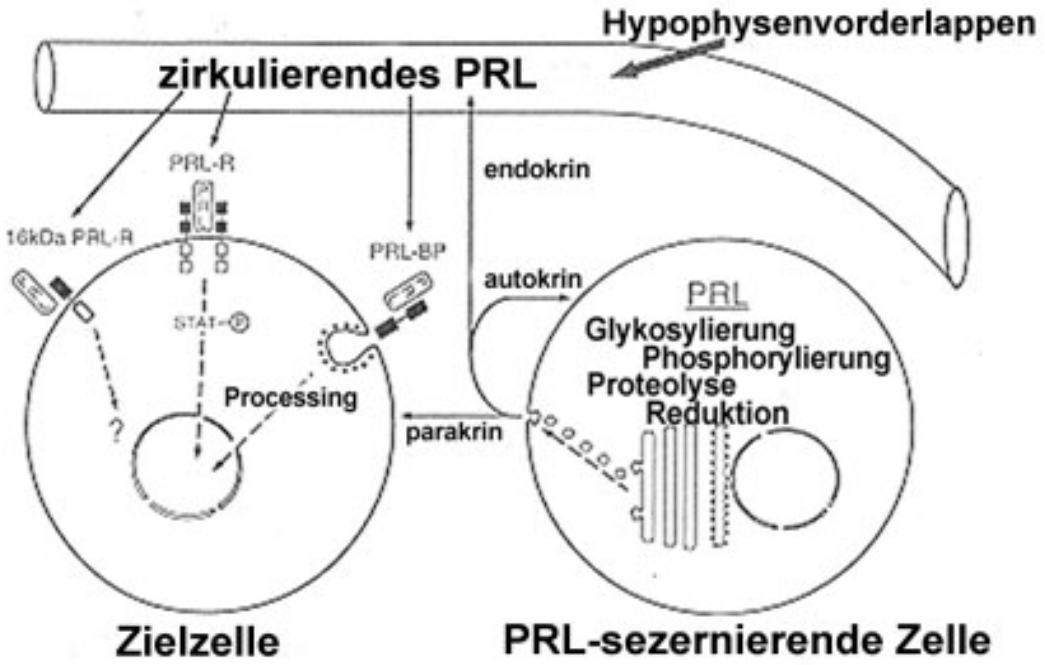


Abb. 1: Wirkungsmechanismen des Prolaktins (nach *Ben-Jonathan et al.*, 59)

1.2.4 Vorkommen

Einen Überblick über die wichtigsten PRL-enthaltenden Gewebe bzw. Flüssigkeiten des menschlichen Körpers gibt Abb.2 (59). Sie zeigt das ubiquitäre Vorkommen des Prolaktins. Dies läßt Rückschlüsse auf Multifunktionalität und Vielzahl der Syntheseorte dieses Hormons zu. Von den links aufgelisteten Zellen

bzw. Geweben ist bekannt, daß sie Prolaktin produzieren.

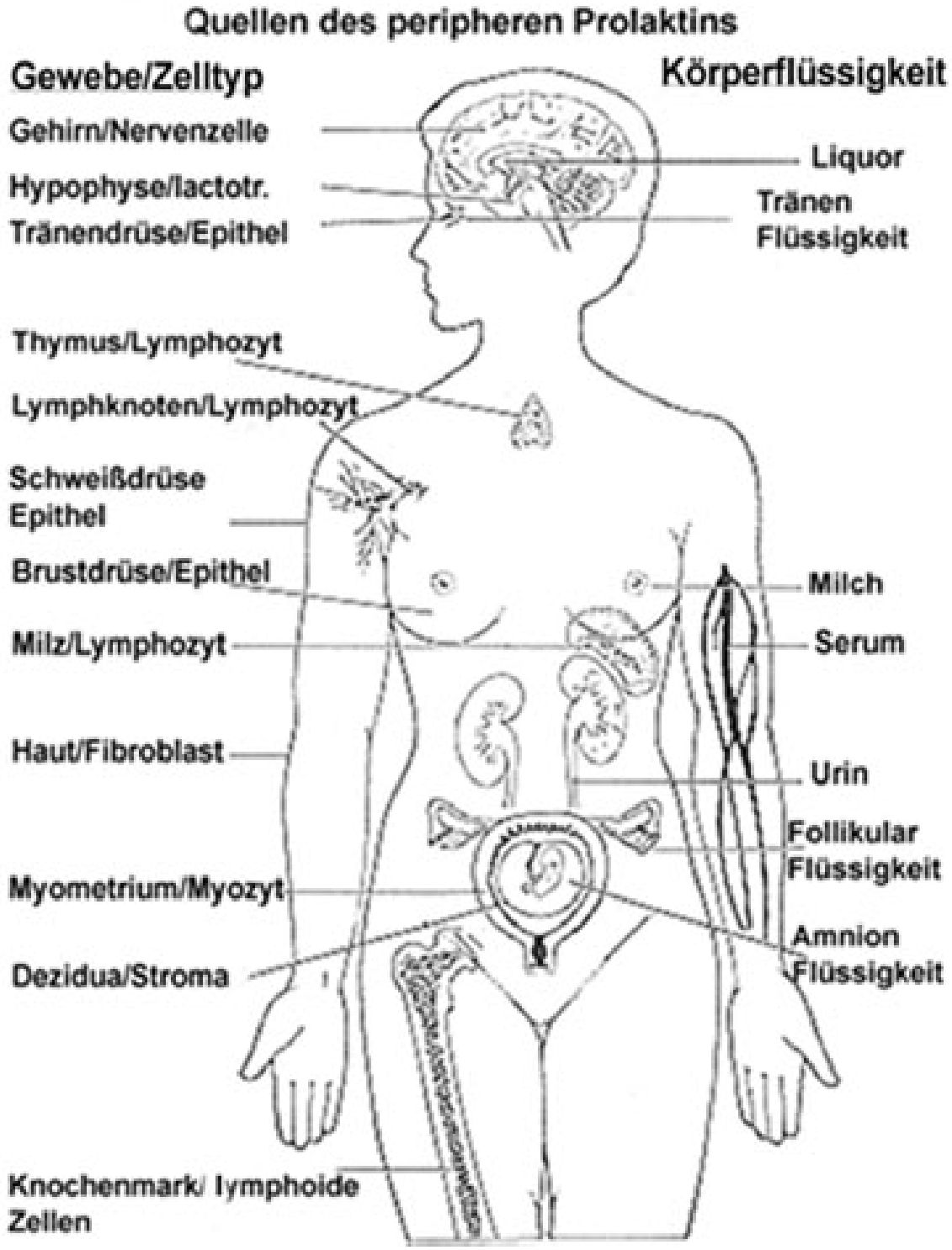


Abb. 2: Vorkommen des Prolaktins im menschlichen Organismus (*Ben-Jonathan et al.*, 59)

1.2.5 Hypophysäres Prolaktin

Da angenommen werden muß, daß im Normalfall das durch die azidophilen Zellen des Hypophysenvorderlappens sezernierte Prolaktin, den Hauptanteil des Serumprolaktins darstellt, soll hier auf seine Regulation und Funktion etwas genauer eingegangen werden.

Durch die Hypophyse wird kontinuierlich Prolaktin sezerniert. Dieses Muster wird durch eine zusätzliche, stoßartige Prolaktin-Sekretion überlagert (72). Die Prolaktinkonzentration im Serum unterliegt von der Tageszeit abhängigen Schwankungen (siehe Abb. 3) mit einem Minimum zwischen 9 und 11 Uhr (73). Die HWZ von ^{125}I-markiertem PRL im Serum liegt bei 50 bis 60 min (74). Sie ist abhängig von der Form des Prolaktins (siehe Tab. 1). Die Höhe der Prolaktinkonzentration im Serum ist unter anderem abhängig vom Alter und Geschlecht. Männer haben niedrigere PRL-Werte als Frauen (75). Nach der Menopause liegen die PRL-Werte, nach Meinung einiger Autoren, ebenfalls tiefer als davor (76, 77). Dies wird sowohl im Ergebnisteil als auch in der Diskussion dieser Arbeit berücksichtigt. Es gibt außerdem zyklusabhängige Schwankungen des Prolaktins bei der geschlechtsreifen Frau, welche im Verlauf denen des Östradiols gleichen (78). Diese Phänomene sind auf den Einfluß des Östradiols auf die hypophysäre Prolaktinfreisetzung zurückzuführen. Es steigert die Prolaktinfreisetzung, abhängig von Dosis und Dauer der Applikation, durch Erhöhung der Sekretionsamplitude ohne Einfluß auf die Frequenz (79). Folgende Mechanismen liegen dem zugrunde: Einerseits besitzt die PRL-produzierende Zelle einen nukleären Östrogen-Rezeptor, dessen Aktivierung zur Steigerung der Transkription der PRL-mRNA führt (80). Andererseits fördern Östrogene die TRH-Rezeptor-Expression der PRL-produzierenden Hypophysenzellen (81), was die PRL-Produktion auf indirektem Wege erhöht. Bei Ratten ist außerdem eine anti-dopaminerge Wirkung des Östradiols bekannt. Die Aktivierung des G_i-Proteins des D_2-Rezeptors wird in diesem Fall durch Östradiol verhindert (82). Ein weiteres weibliches Geschlechtshormon mit Einfluß auf die Prolaktinfreisetzung ist das Progesteron. Da die Hypophysenzellen keine Rezeptoren für Progesteron besitzen (83), wird angenommen, daß es seine Wirkung auf der Ebene des Hypothalamus entfaltet (84).

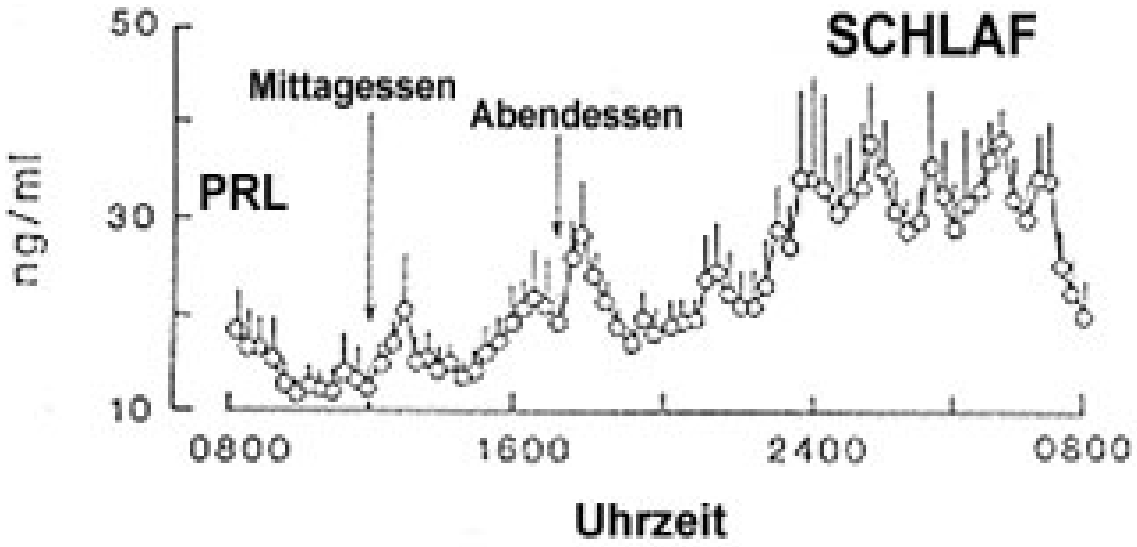


Abb. 3: Serum-Prolaktin-Konzentration im Tagesverlauf (aus 85)

Es gibt nur einen wesentlichen Faktor, der die hypophysäre PRL-Sekretion supprimieren kann, das Dopamin und seine Agonisten. Alle physiologischen und pathologischen Umstände, die entweder den Dopamingehalt des Hypothalamus senken oder aber die Dopaminrezeptoren blockieren, führen zur verstärkten PRL-Ausschüttung. Der exakte Mechanismus, durch den Dopamin die PRL-Sekretion hemmt, ist nicht bekannt. Fest steht jedoch, daß es verschiedene Angriffspunkte gibt. Dazu gehören z.B. Eingriffe in das Ionengleichgewicht der Zelle, die Supprimierung der Adenylatcyclase-Aktivität, des Inositol-Phosphat-Stoffwechsels, der Arachidonsäure-Freisetzung, der PRL-Gen-Expression und der Zellproliferation (aus 59). Neben dem Dopaminmangel wirken sich auch andere Substanzen, wie z.B. TRH (86) und VIP (87) sowie Serotonin (88) positiv auf die PRL-Sekretion aus. So wird beispielsweise das erhöhte Serumprolaktin bei einigen Patienten mit Hypothyreose nicht nur durch die herabgesetzte metabolische Clearance-Rate (MCR) des PRL, sondern auch durch das erhöhte TRH erklärt. Eine weitere Erkrankung, bei der erhöhte PRL-Werte beobachtet werden, ist die Niereninsuffizienz. Im Stadium der terminalen Niereninsuffizienz sind bei 80% der Patienten erhöhte Serumprolaktinwerte nachweisbar In allen anderen Stadien finden sich jedoch nur bei 20% der Patienten erhöhte Werte (89). Als Ursachen werden der Einfluß urämischer Faktoren auf die Dopaminwirkung im Hypothalamus und die herabgesetzte MCR des Prolaktins diskutiert (74). Die

Hyperprolaktinämie infolge einer Niereninsuffizienz ist sowohl nach Transplantation als auch nach Vitamin D_3-Applikation reversibel (89,90). Einen Überblick über physiologische Erhöhungen des Serumprolaktins gibt Tab. 2. In der Tab. 3 sind Medikamente aufgeführt, die einen Einfluß auf die hypophysäre Prolaktin-Sekretion haben.

Tab. 2 physiologische Umstände, die mit einem erhöhten Serumprolaktin einhergehen (85)

Faktoren	Erläuterung
Schlaf	entsprechend dem zirkadianen Rhythmus (siehe Abb. 3)
Mahlzeiten	besonders eiweißreiche Mahlzeiten am Mittag
Physischer und psychischer Streß	Sport, Operationen u.a.
Zyklus	späte follikuläre und Luteal-Phase
Schwangerschaft	(siehe Abb. 4)
Koitus	deutliche Erhöhung im Zusammenhang mit dem Orgasmus
Puerperium	die ersten 3 bis 4 Wochen
Stillen	kurz dauernde PRL-Freisetzung
Fötus	höhere Werte als bei der Mutter nahe dem Geburtstermin
Neugeborenes	die ersten 2 bis 3 Wochen

Tab. 3 Medikamente mit Einfluß auf die PRL-Sekretion

PRL-hemmend	PRL-freisetzend
Dihydroergotamin, Methylergotamin	zentral wirksame Antihypertensiva (Methyldopa, Clonidin, Reserpin)
Migränemittel (Lisurid, Methysergid, Ergotamin)	Antidepressiva
Levodopa, Dopamin, Bromocriptin	Neuroleptika
Appetitzügler, LSD, Amphetamine	Kalziumantagonisten (Verapamil)
Phentolamin	Magen-Darm-Mittel (Metoclopramid, Domperidon, Ranitidin, Cimetidin)
Apomorphin, Naloxon	Morphin
Methyphenidat	Östrogene
Piribedil	Labetalol

Der Einfluß verschiedener Zytokine auf die hypophysäre PRL-Sekretion wird

kontrovers diskutiert. Im Gegensatz zur HPA-Achse, welche durch proinflammatorische Zytokine (IL-1, IL-6 und TNF-α) stimuliert wird, gibt es hinsichtlich der Wirkung dieser Zytokine auf die Prolaktinfreisetzung unterschiedliche Ergebnisse. So wird beobachtet, daß bei chronisch entzündlichen Erkrankungen die Prolaktinproduktion der Hypophysenzellen zurückgeht (91). Werden die Hypophysenzellen jedoch akut mit IL-6 konfrontiert, erhöhen sie ihre Prolaktin-Produktion (92, 93).

1.2.6 Prolaktin in der Schwangerschaft und Stillzeit

In der Schwangerschaft kommt es zu einem Östrogen-bedingten, linearen Anstieg des Prolaktins (94). Dabei ändert sich nicht die Frequenz der Prolaktin-Peaks, jedoch die Amplitudenhöhe (95). Das Verhältnis von nicht-glykosyliertem und glykosyliertem Prolaktin verschiebt sich zu Gunsten der glykosylierten Form (96). Eine Orientierung über die Höhe des Prolaktins im Verlaufe der Schwangerschaft gibt Abb. 4. Dabei wird sowohl die Konzentration im Blut der Mutter und des Fötus als auch die Konzentration im Fruchtwasser berücksichtigt. Über die Funktionen des Prolaktins beim Fötus gibt es verschiedene Spekulationen. Diskutiert werden ein Mitwirken bei der Osmoregulation der Nieren (97) und bei der Lungenreifung (98) und außerdem eine Funktion im Salz- und Wasserhaushalt (99). Es gibt Hinweise darauf, daß Prolaktin bei der Entwicklung des fötalen Immunsystems eine wichtige Rolle spielt (100). Daran kann auf der einen Seite das fötale Serumprolaktin beteiligt sein. Andererseits besteht die Möglichkeit, daß das in der Amnionflüssigkeit in hoher Konzentration enthaltene, zum größten Teil glykosylierte und IgG-gebundene, Prolaktin in den Kreislauf des Fötus gelangt (101, 102). Prolaktin wirkt indirekt an der Entwicklung der T-Vorläuferzellen im Thymus mit. Dies geschieht durch eine Stimulation der Thymus-Epithelzellen, welche nach Kontakt mit Prolaktin ihre IGF-I-Sekretion steigern (103, 104). Welche Funktion dem in der Muttermilch enthaltenen PRL hinsichtlich der Entwicklung des Immunsystems des Neugeborenen zukommt ist Gegenstand der gegenwärtigen Diskussion (105). Auf die detaillierten neuroendokrinen Abläufe beim Saugreflex und die Entwicklung der weiblichen Brustdrüse soll hier nicht näher eingegangen werden.

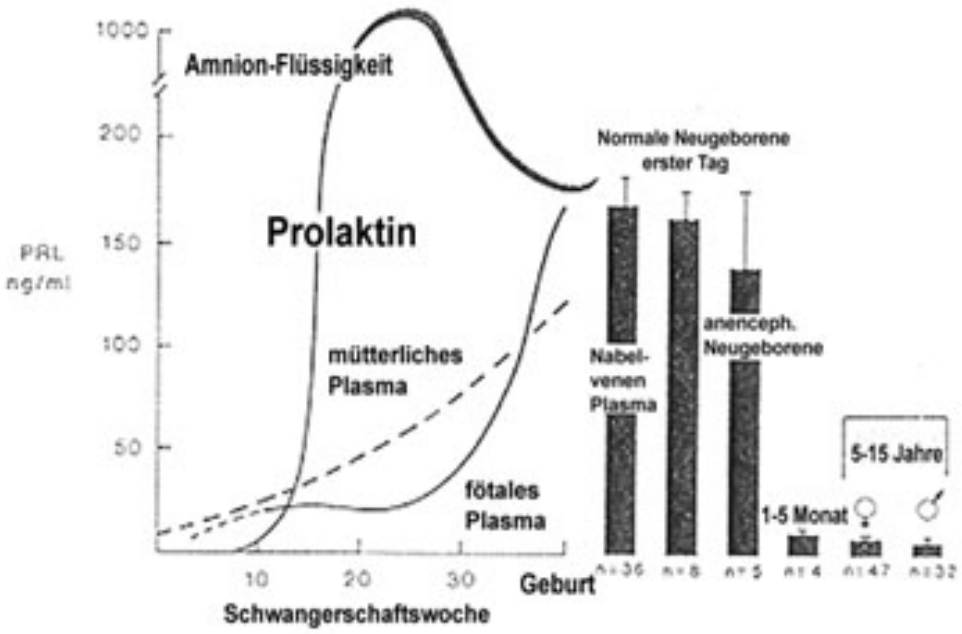


Abb. 4: Übersicht der Prolaktinkonzentrationen im Plasma von Mutter und Fötus und in der Amnionflüssigkeit während der Schwangerschaft und der Verlauf der Prolaktinkonzentration während der postnatalen Entwicklung (85)

1.2.7 Hyperprolaktinämie

Einteilen kann man die Hyperprolaktinämie in eine hypothalamische (durch Dopaminmangel im Hypothalamus verursachte) und eine hypophysäre Form (z.B. bedingt durch ein Adenom). Generell kann jeder Prozeß, der zur Verminderung der Dopaminsynthese, der Behinderung seines Transports zur Hypophyse oder zur Antagonisierung seiner Wirkung am Rezeptor führt, eine Hyperprolaktinämie verursachen. Welche Rolle den hier nicht einzuordnenden hyperprolaktinämischen Zuständen bei Niereninsuffizienz, Hypothyreose oder erhöhter peripherer Prolaktin-Produktion zukommt, ist fraglich. Das PRL ist in diesen Fällen oftmals nur grenzwertig erhöht und verursacht keine typischen Symptome einer Hyperprolaktinämie. Ein weiterer Grund für eine Hyperprolaktinämie ohne klinische Symptome ist das Vorhandensein von Auto-Antikörpern gegen PRL (62, 68, 106). Nach Ausschluß medikamentöser Ursachen (Tab. 3) ist das Adenom die zweithäufigste Ursache für eine Hyperprolaktinämie. Nach der Größe werden die Adenome eingeteilt in Makroadenome (d>10mm) und Mikroadenome (d<10mm),

(107).

Symptome der Hyperprolaktinämie sind (107):

1. Unregelmäßigkeiten der Menstruation (Oligo-, Amennorhoe)
2. Infertilität
3. Galaktorrhoe (30–80 % der betroffenen Frauen, 14–33 % der betroffenen Männer)
4. Verlust der Libido, Impotenz

Als Folge längerer Zeit erhöhter Prolaktinwerte kann es zur Verminderung der Knochendichte kommen (108, 109). Dabei spielt scheinbar neben einer verminderten Östradiolkonzentration auch eine direkt durch Prolaktin verursachte Kalziumfreisetzung aus dem Knochen eine Rolle (110). Ebenso gibt es Hinweise darauf, daß es zur Alteration der Nebennierenfunktion und zur Insulinresistenz sowohl der Hepatozyten als auch der Peripherie kommt (111, 112).

1.3 Der Prolaktinrezeptor

Der ausgehend von Ratten-Hepatozyten klonierte PRL-Rezeptor ist ein Protein, das sich aus 291 Aminosäuren zusammensetzt. Er hat somit einen etwas geringeren Umfang als der GH-Rezeptor (115). Das den PRL-Rezeptor kodierende Gen befindet sich nahe dem GH-Rezeptor-Gen auf Chromosom Nr.5 (113). Es gibt Beweise für die Existenz von mehr als einer PRL-Rezeptor-Form beim Menschen (114). Der PRL-Rezeptor gehört zur Familie der hämatopoetischen Rezeptoren, welche GH, viele Zytokine und einige Wachstumsfaktoren einschließt. Gemeinsames Merkmal dieser Rezeptoren ist eine hydrophobe transmembranöse Domäne, welche den Rezeptor in eine extrazelluläre Liganden-Bindungs-Domäne und eine intrazelluläre Domäne teilt. Während die extrazelluläre Domäne zahlreiche homologe Bausteine enthält, gestaltet sich der intrazelluläre Anteil eher unterschiedlich (siehe Abb. 5) (115). Es wird angenommen, daß die Signaltransduktion durch PRL die Bindung von PRL an zwei Rezeptor-Moleküle erforderlich macht. Dieses Modell der Rezeptor-Dimerisation erklärt den dosis-abhängigen, kurvenförmigen Verlauf, der oft bei PRL-bedingten Effekten beobachtet werden kann (siehe Abb. 6) (116). Einige

Lymphozyten verfügen über die Fähigkeit, PRL zu internalisieren (117). Es wird nukleär angereichert. Dieser Prozeß kann durch IL-2 stimuliert werden (118). Zur Aufklärung der Funktion dieses nukleären PRL sind jedoch weitere Untersuchungen nötig. PRL-Rezeptor ähnliche Strukturen können auch als Transport-Proteine für PRL zwischen unterschiedlichen Kompartimenten des menschlichen Körpers fungieren. So wird z.B. der Transport von PRL aus dem Blut in den Liquor, die Muttermilch oder die Amnionflüssigkeit ermöglicht (119, 120, 121). Die intrazelluläre Signaltransduktion läuft wie bei den meisten Vertretern der Gruppe der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren und Zytokine über die Tyrosin-Kinase JAK (Janus Kinase). Die PRL-Bindung am Rezeptor führt zur Phosphorylierung der JAK2, welche mit dem PRL-Rezeptor assoziiert ist (122). Daraufhin wird eine Kaskade der intrazellulären Signaltransduktion ausgelöst. In deren Verlauf erfolgt die Phosphorylierung sogenannter STAT-Proteine (Signal Transducer and Activator of Transcription), insbesondere STAT1 und STAT5 (123). Nach Translokation der phosphorylierten Proteine in den Zellkern und Bindung an die Promotoren des Ziel-Gens kann der Transkriptionsprozeß auf diese Weise modifiziert werden. Bei T-Lymphozyten kann auch eine Serin-Threonin-Kinase mit dem PRL-Rezeptor assoziiert sein (124).

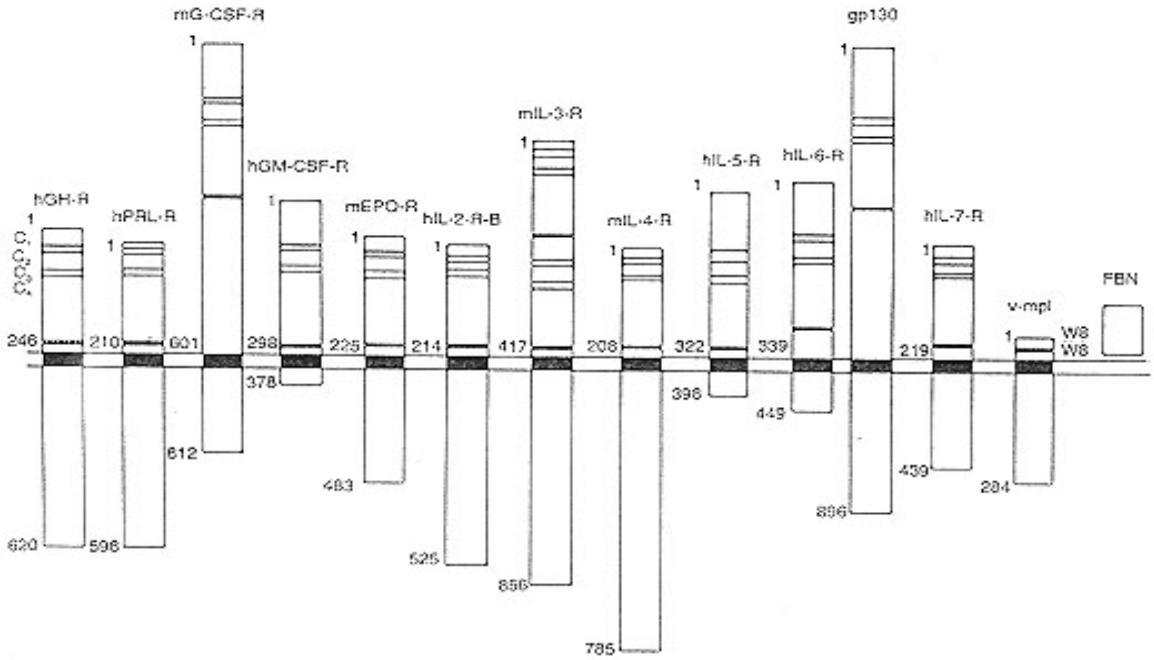


Abb. 5: Rezeptor-Familie der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren und Zytokine (Kelley et al, 113)

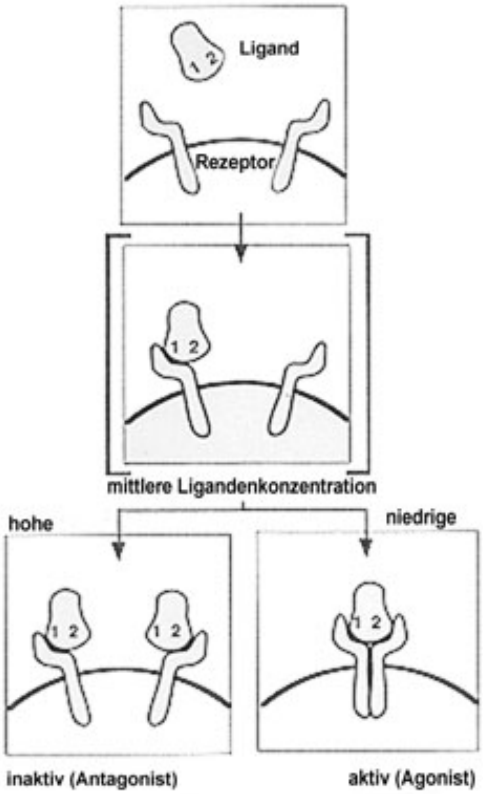


Abb. 6:Modell des PRL-Rezeptors
(„two-step binding and dimerization model“)
basierend auf von Fuh et al durchgefürhten
über Studien zu Struktur und Wirkungsmechanismus
des GH-Rezeptors (125)

1.4 Rolle des Prolaktins im Immunsystem

Prolaktin wird durch verschiedene Zellen des Immunsystems oder verschiedene Tumorzellinien sezerniert. Durch diesen Mechanismus stimulieren sich die Zellen entweder selbst (autokrine Wirkung) bzw. die Zellen ihrer unmittelbaren Umgebung (parakrine Wirkung). Dabei handelt es sich je nach Zellart um unterschiedliche Formen des Prolaktins (siehe Tab. 1). Eine Übersicht über einige Prolaktin–sezernierende Zellinien bietet Tab. 4. Die Prolaktin-Botschaft normaler B-Zellen liegt weit unter der frisch isolierter T-Zellen normaler Individuen (126). Es kann angenommen werden, daß die unterschiedlichen PRL-Formen auch in der Lage sind, unterschiedliche Funktionen zu erfüllen. Ein Beispiel dafür ist, daß IgG-gebundenes, aus humanem Serum gewonnenes PRL selektiv CLL-B-Zellen stimuliert, jedoch keinen Einfluß auf normale B-Zellen oder Nb2-Zellen hat (66). Wahrscheinlich ist für die mitogene Wirkung dieser PRL-Form eine simultane

Besetzung von PRL-R und IgGFc-R sowie eine Interaktion dieser beiden Rezeptoren erforderlich.

Tab. 4: Prolaktin-sezernierende Zellen

Zellen	Prolaktin
humane Thymozyten (127, 128))	23-24kDa PRL und 11kDa PRL (mitogen-stimuliert)
periphere Lymphozyten (127)	27kDa PRL und 11kDa PRL
humane PBMC (126)	23 und 36kDa PRL (spontan)
humane PBMC (129)	60kDa PRL (nach Stimulation mit PHA und Con A)
IM9-P3 (EBV-transformierte humane B-Zell-Linie IM9), (130)	23 und 26,5kDa PRL (glykosyliert)
EBV-negative Burkitt-Zell-Linie (131)	29kDa PRL
Jurkat – humane T-Leukämie-Zell-Linie (132)	23,5 und 25,5kDa PRL
SLE-PBMC (133)	60kDa (mit und ohne Con-A-Stimulation)
SLE-PBMC (134)	11 und 24-27kDa PRL (PWM- oder PHA- stimuliert oder unstimuliert)

Auf der anderen Seite haben viele Zellen des Immunsystems Prolaktin -Rezeptoren oder die Fähigkeit, Prolaktin zu internalisieren und zum Zellkern zu transportieren. Nb2-Zellen besitzen 12 000 (135), B- und T-Zellen 360 (136) und NK-Zellen 660 Rezeptoren / Zelle (137). Ihre Affinität läßt vermuten, daß sie durch PRL in physiologischer Konzentration stimuliert werden können. Die Wirkung des Prolaktins auf die unterschiedlichen Zellen ist neben der Prolaktinform auch vom Zelltyp abhängig (siehe Tab. 5). Weiterhin können verschiedene Faktoren der Umgebung der Zellen, wie zum Beispiel der Hormonstatus (138, 139) oder die gleichzeitige Anwesenheit von Zytokinen (118, 140, 141, 142) sowie mitogen wirkender Substanzen, wie ConA oder PHA (139, 142), die PRL-Wirkung modifizieren. Einen Überblick über einige durch Prolaktin auslösbare Prozesse bietet Tab. 5. Ein Mechanismus der Zellaktivierung durch Prolaktin ist zum Beispiel die Induktion der Ornithin-Dekarboxylase-Aktivität (antagonisierbar durch Cyclosporin A), was eine Steigerung der DNA-Synthese und Zellproliferation bedingt (143, 144). Außerdem ist PRL in der Lage, die Synthese weitererer, das Zellwachstum positiv beeinflussender Faktoren (c-myc, c-fos und IRF-1 (Interferon Regulatory Factor)) zu stimulieren (145, 146).

Tab. 5: unterschiedliche Wirkungen des Prolaktins in Abhängigkeit von der Differenzierung der Zielzelle

Zelltyp	Wirkung des PRL
T-Zellen	IL-2-R-Expression wird gesteigert (Milz-Lymphozyten der Ratte (138)), Proliferation nach Kontakt mit mitogenen Substanzen gesteigert (Milz-Lymphozyten von ovarektomierten Ratten (139)), Synergismus mit IL-2 (118), im Gegensatz zum IL-2 kann PRL auch ohne vorausgegangenen Antigen-Kontakt sezerniert werden (siehe Tab. 4) und auf T-Zellen proliferationsfördernd wirken(132), Förderung der CD4-Expression (144)
B-Zellen	Steigerung der IgM- und IgG-Sekretion humaner, mit Anti-IgM oder IL-2 behandelter B-Zellen in vitro (in einer Konzentration von 0,2 – 100ng/ml) (141)
PBMC	Stimulation der IgG- und IgM- Produktion und der Anti-dsDNA-Produktion und der IgM-RF-Synthese normaler und in geringerem Maße auch der SLE-PBMC (148)
Thymus-Epithelzellen	Steigerung der IGF-I-Sekretion (103, 104)
Makrophagen	Steigerung der Stickoxidradikal- und IL-1-Produktion (149), Steigerung der Phagozytose-Kapazität (150, 151), Steigerung der IFN-γ-Sekretion (152), Steigerung des oxidativen Bursts (153)
NK-Zellen	Bewirkt allein oder gemeinsam mit IL-2 die Differenzierung der NK-Zellen in Lymphokin-aktivierte-Killerzellen (154)

Das Prolaktin wirkt auf die Zellen des Immunsystems jedoch nicht nur durch autokrine und parakrine Mechanismen. Sie können ebenso durch hypophysäres Prolaktin stimuliert werden. Auf der anderen Seite wird die hypophysäre Prolaktin-Freisetzung durch Zytokine der Zellen des Monozyten-Makrophagensystems beeinflußt (siehe Tab. 5). Hier wird die Komplexität des Zusammenhangs zwischen Immunsystem und Endokrinium deutlich.

Die Fehlfunktionen des Immunsystems infolge von Veränderungen des Serumprolaktins im Sinne einer Hypo- bzw. Hyperprolaktinämie ist bereits anhand zahlreicher Untersuchungen (siehe Tab. 6) aufgezeigt worden. In der Regel haben beide Zustände einen supprimierenden Effekt sowohl auf die Entwicklung des Immunsystems als auch auf die Immunantwort. Dem liegt das unter 1.3 erwähnte PRL-Rezeptor-Modell zugrunde. Unter bestimmten Bedingungen kann es jedoch auch zur Auslösung von Autoimmunerkrankungen durch Hyperprolaktinämie kommen. In diesem Fall wirkt PRL, wie andere Zytokine auch, als permissiver

Faktor einer bereits in Gang gekommenen, aberranten Immunantwort. So berichteten z.B. *McMurray et al.* über 4 Patientinnen, bei denen eine über längere Zeit bestehende Hyperprolaktinämie mit dem Auftreten eines SLE einherging (155). Desweiteren stellten *Buskila et al.* ein gehäuftes Auftreten verschiedener Autoantikörper (Anti-dsDNA, Anti-Sm, Anti-PDH und Anti-Ro) bei hyperprolaktinämischen Frauen im Vergleich zu Gesunden fest. Keine der Patientinnen bot jedoch Symptome einer Autoimmunerkrankung (156). Über das Auftreten von Anti-Endothel-Zell-Antikörpern (AECA) bei 76%, von Anti-Cardiolipin-Antikörpern bei 40% und niedrig-titrigen Anti-dsDNA-Antikörpern bei 48% der Patienten eines hyperprolaktinämischen Kollektivs berichteten *Krause et al.*. Auch in diesem Fall lagen bei keinem Patienten klinische Befunde im Sinne einer Autoimmunerkrankung vor (157). Asymptomatische autoimmune Erkrankungen der Schilddrüse treten laut einer Untersuchung von *Ferrari et al.* in einer Gruppe von hyperprolaktinämischen Frauen mit einer Frequenz auf, die die der Gesamtbevölkerung weit überschreitet. Mikrosomale und Thyreoglobulin-Antikörper wurden bei den untersuchten Frauen gehäuft festgestellt (158).

Tab. 6: Beispiele für Defizite des Immunsystems im Falle einer Hypo- bzw. Hyperprolaktinämie

Hypoprolaktinämie	Hyperprolaktinämie
Anämie, Leukopenie und Thrombozytopenie bei Ratten nach Hypophysektomie (159)	Hemmung der zellulären Immunantwort und erhöhtes Tumorwachstum bei Ratten (165)
supprimierte humorale Immunantwort bei hypophysektomierten Ratten (160)	Hemmung der spontanen Anti-Tumor-NK-Zell-Zytotoxizität bei Mäusen (166, 167)
Beeinträchtigung der Immunreaktion vom verzögerten Typ bei hypophysektomierten Ratten (161)	herabgesetzte NK-Zell-Funktion bei Frauen, in vitro nicht reproduzierbar, reversibel nach BCR-Behandlung (168)
verminderte Antikörperproduktion nach Stimulation mit SRBC und LPS und verminderte Kontaktsensibilität für Dinitrochlorobenzen unter Bromocriptin(BRC)-Behandlung (162)	PRL (c=12-25ng/ml) stimuliert und PRL (100-200ng/ml) supprimiert die Proliferation von T-, B- und NK-Zellen nach Kontakt mit PHA, SAC und IL-2 (169)
Veränderungen in der Entwicklung der Oberflächenmarker der Lymphozyten neugeborener Mäuse durch BRC-Behandlung (163)	verminderte IL-2-Konzentration im Blut von Prolaktinompatienten, reversibel nach BRC-Behandlung (170)
verminderte Reaktivität der Lymphozyten in der „mixed lymphocyte reaction“ (164)	Hemmung der CD8+-T-Zellen und Aktivierung Autoantikörper-produzierender B-Zell-Klone (171)

Alle in Tab. 6 aufgeführten Defizite der Immunantwort im Zustand der

Hypoprolaktinämie waren nach Substitution des Prolaktins reversibel.

Bei der Untersuchung der PRL-Werte von Patienten mit Autoimmunerkrankungen fiel mehrfach auf, daß diese im Durchschnitt über denen von Gesunden liegen. Dies trifft unter anderem für Patienten mit Iridozyklitis (172), M. Addison (173) und lymphozytärer Hypophysitis (174) zu. Die Untersuchung einer Gruppe von Patienten mit Sjögren-Syndrom ergab, daß 46% erhöhte PRL-Werte hatten (175). Gleiches traf, laut *Kucharz et al.*, auch auf 59% eines untersuchten Patientenkollektivs mit Sklerodermie zu (176). Auch die PRL-Werte einer Gruppe präpubertärer Mädchen mit ANA-positiver juveniler RA lagen deutlich über den Werten gesunder Altersgenossinnen. Der chronische Verlauf der Arthritis korrelierte besser mit der Hyperprolaktinämie als mit der ANA-Positivität (177). Die Bedeutung des Prolaktins für den Krankheitsverlauf bei SLE-Patienten ist noch immer umstritten. Vor gut 10 Jahren wurden erste Berichte über erhöhte Prolaktin-Werte bei SLE-Patienten veröffentlicht (178, 179). Seitdem gibt es wiederholt Untersuchungen mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen. Eine Gruppe von Autoren berichtet über erhöhte Prolaktin-Werte bei ca. 9-35% der SLE-Patienten (180–185). Ein Teil spricht sich für (182, 183, 179), ein anderer Teil gegen (180, 181, 184, 185) einen Zusammenhang zwischen dem Serumprolaktin und klinischer oder serologischer Krankheitsaktivität aus. Einzelne Autoren konnten keine erhöhten PRL-Werte in ihrem Patienten-Kollektiv feststellen (186, 187). Es gibt Berichte über die Assoziation bestimmter Krankheitsmanifestationen des SLE mit erhöhten PRL-Werten. Dazu gehören die zerebralen Manifestationen (188.), die aktive Lupus-Nephritis (189) oder hämatologische Manifestationen (183, 188.). Momentan wird untersucht, welchen therapeutischen Effekt die medikamentöse Senkung des Prolaktins durch den Dopaminagonisten Bromocriptin für die SLE Patienten hat. Bisher liegen Hinweise dafür vor, daß eine Bromocriptin-Therapie (low dose) langfristig zur Verminderung der Frequenz der Lupus-Schübe führt (190). Es wird über einen Abfall der Krankheitsaktivität (SLEDAI) 5 Monate nach Therapiebeginn berichtet. Anschließend kam es jedoch zu einem „Rebound Phänomen“ mit erhöhter Krankheitsaktivität nach Therapieende (191). Ebenfalls diskutiert wird die Frage des Ursprungs des Serumprolaktins bei SLE-Patienten.

2 Problemstellung

Welche Bedeutung dem Prolaktin in Hinblick auf die Pathogenese und den Krankheitsverlauf des SLE zukommt, ist bisher unklar. Das Ziel dieser Untersuchung war einerseits die Analyse der Prolaktinwerte der Lupuspatienten und andererseits das Aufdecken eventuell vorhandener Zusammenhänge zwischen klinischer und serologischer Krankheitsaktivität und dem Serumprolaktin der Patienten. Es wurden 60 SLE-Patienten in einem Zeitraum von 3,5 Jahren untersucht. Bei jedem zweiten Patienten wurden Wiederhohlungsuntersuchungen vorgenommen. Dies ermöglicht die Betrachtung des Verlaufes von Krankheitsaktivität und Prolaktinwerten bei den SLE-Patienten.

Neben diesen Beobachtungen in vivo, war es Aufgabe der Arbeit, den Effekt des Prolaktins auf Zellen des Immunsystems in vitro zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden PBMC isoliert und mit Prolaktin in physiologischer und erhöhter Konzentration stimuliert. Die Immunglobulin-G-Produktion der PBMC von Gesunden und SLE-Patienten sollte im Vergleich bestimmt werden. Weiterhin war die Untersuchung des PRL-Einflusses auf das Muster der durch Monozyten und Lymphozyten sezernierten Zytokine IL-1, IL-6, IL-10, TNF-α, IFN-γ und IL-4 vorgesehen. Über Eingriffe des Prolaktins in die Prozesse der Immunglobulin- und Zytokinproduktion ist bereits berichtet worden (141, 148, 149, 152, 192). Die dazu vorliegenden Informationen sind jedoch nicht ausreichend, um Aussagen über die Rolle des Prolaktins bei der Initiierung und Perpetuation autoimmuner Prozesse zu machen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit stellt die Untersuchung eines Kollektives von Prolaktinompatienten auf das Vorhandensein klinischer Befunde im Sinne einer Autoimmunerkrankung bzw. von Autoantikörpern im Serum dar. Es sollte dadurch insbesondere festgestellt werden, ob es bei über lange Zeit erhöhten Prolaktin-Werten zur Entwicklung einer Autoimmunerkrankung oder zur Produktion von Autoantikörpern kommt.

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Bestimmung der Serumprolaktinspiegel

3.1.1.1 Charakterisierung der drei untersuchten Gruppen

3.1.1.1.1 SLE – Patienten

Alle SLE-Patienten wurden zum Zeitpunkt der Untersuchung stationär bzw. ambulant, durch Mitarbeiter der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie der Charité betreut. Sie erfüllten mindestens vier der ARA-Kriterien zur Klassifikation des SLE (193). Genaue Angaben über Anzahl, Geschlecht, Alter und Therapie der Patienten sind der Tab. 7 zu entnehmen. Zusätzlich werden auch Medikamente aufgeführt, die möglicherweise die hypophysäre Prolaktinsekretion steigern. 10 Patienten nahmen Ranitidin in einer Dosis, der keine PRL-erhöhende Wirkung zugeschrieben wird (194). Jeweils ein Patient nahm Verapamil bzw. Clonidin ein. In beiden Fällen war PRL jedoch nicht erhöht. Drei SLE-Patientinnen, bei denen keine Anzeichen für die Aktivität der Erkrankung vorhanden waren und die PRL-Werte im unteren Normbereich lagen, betrieben hormonelle Kontrazeption. Aus den genannten Gründen wurden die PRL-Werte dieser 15 Patienten mit in die Auswertung einbezogen.

Kein Patient nahm während der Untersuchung Neuroleptika, Antidepressiva, Domperidon oder Metoclopramid ein. Keine der Patientinnen war schwanger oder stillte. TSH lag mit Ausnahme von drei Patientinnen mit grenzwertig erhöhten Werten im Normbereich. Eine manifeste Hypothyreose konnte hier durch das Fehlen von Symptomen und fT3/fT4–Bestimmung ausgeschlossen werden. Keiner der Patienten war terminal niereninsuffizient.

3.1.1.1.2 Patienten mit anderen Kollagenosen oder Vaskulitiden

Dieser Gruppe gehören ebenfalls Patienten der oben genannten Einrichtung an. Sie setzt sich folgendermaßen zusammen:

Dermatomyositis/Polymyositis: 3 (195)

MCTD: 9 (196)

Sjögren Syndrom: 4 (197)

Sklerodermie: 1 (198)

Wegener´sche Granulomatose: 1 (199)

Zur genauen Charakterisierung der 2. Gruppe dient Tab. 8. Auch für die Patienten dieser Gruppe sind alle Angaben unter 3.1.1.1.1.1, Abs.2 zutreffend.

Tab. 7 SLE-Patienten

Gruppe	männlich	weiblich/ postmeno-pausal	weiblich/ prämeno-pausal	gesamt
n	8	13	39	60
mittleres Alter in Jahren	34,4	54,4	29,6	35,6
ohne Therapie (%)	1 (12,5)	3 (23,1)	4 (10,3)	8 (13,3)
Azathioprin (%)	3 (37,5)	2 (15,4)	12 (30,8)	17 (28,3)
Cyclophosphamid (%)	1 (12,5)	3 (23,1)	15 (38,5)	19 (31,7)
Prednison (%) mittlere Dosis in mg/die	6 (75,0) 15,4	10 (76,9) 14,5	32 (82,1) 11,6	48 (80,0) 12,7
Prednison-Stoß (%)	1 (12,5)	0 (0)	2 (3)	3 (5)
Ranitidin	1	4	5	10
Clonidin	0	0	1	1
Verapamil	0	1	0	1
Östrogene	0	1	2	3

3.1.1.1.3 Gesunde Kontrollgruppe

Die dritte Gruppe besteht aus Blutspendern der Charité. Keiner der Blutspender nahm zum Zeitpunkt der Untersuchung regelmäßig Medikamente ein. Tab.9 enthält genaue Angaben über Anzahl, Alter und Geschlecht der Blutspender.

Tab. 8: Patienten mit Kollagenosen und Vaskulitiden

Gruppe	männlich	weiblich/ postmeno-pausal	weiblich/ prämeno-pausal	gesamt
n	2	9	7	18
mittleres Alter in Jahren	58,0	56,0	33,7	47,6
ohne Therapie (%)	0 (0)	2 (22,2)	3 (42,9)	6 (33,3)
Azathioprin (%)	0 (0)	2 (22,2)	1 (14,3)	3 (16,7)
Cyclophosphamid (%)	1 (50,0)	2 (22,2)	1 (14,3)	4 (22,2)
Prednison (%) mittlere Dosis in mg/die	2 (100,0) 6,2	5 (55,6) 5,3	3 (42,9) 4,4	10 (55,6) 5,0
Ranitidin	0	2	1	3
Östrogene	0	2	1	3

Tab. 9: Gesunde Kontrollgruppe

Gruppe	männlich	weiblich/ prämenopausal	gesamt
n	17	30	47
mittleres Alter	38,47	29,73	32,89

3.1.1.2 Prolaktin-Bestimmung

Die Blutentnahmen erfolgten bei allen Patienten und Blutspendern zwischen 9 und 12 Uhr. Körperlicher und psychischer Streß wurde durch die Blutentnahme unmittelbar nach der Nachtruhe bzw. nach halbstündlicher körperlicher Ruhe vermieden. Außerdem wurde auch unmittelbar nach den Hauptmahlzeiten kein Blut entnommen. Es wurden Serum-Monovetten (Sarstedt) verwendet. Das Serum wurde innerhalb von 4h separiert und bei -20°C bis zur Prolaktinbestimmung

gelagert.

29 Patienten mit SLE stellten sich wiederholt im Rahmen eines festgelegten Therapieregimes oder zu ambulanten Verlaufskontrollen vor. Dies ermöglichte eine Prolaktinbestimmung im Verlauf.

Die Prolaktinwerte der Patienten und einer aus Blutspendern bestehenden Kontrollgruppe wurde mit Hilfe eines kommerziellen ELISAs (Synchron Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, Elias - Medizintechnik GmbH, Freiburg), bzw. IRMAs (Radioisotopic Assay, Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, USA) in der hormonanalytischen Abteilung des Institutes für Experimentelle Endokrinologie der Charité bestimmt. Dabei kam Serum als Untersuchungsmaterial in Doppelbestimmungen zum Einsatz. Um Interferrenzen auszuschließen, wurde nur klares Serum (nicht lipämisch, nicht hämolytisch) verwendet.

3.1.1.2.1 Enzymimmunoassay

Das Besondere am „Synelisa Prolaktin“ ist, daß abweichend von den herkömmlichen ELISAs mit einem transferablen Solid Phase System (TSP-Synelisa Pinplatte) gearbeitet wird, welches nacheinander in drei unterschiedlichen Mikrotiterplatten zum Einsatz kommt. Die immunologische Reaktion findet also nicht an der Wand der mit den verschiedenen Lösungen gefüllten Mikrotiterplatten, sondern an der Pinplatte statt. Auf diese Weise werden Start und Stop sämtlicher Reaktionen synchronisiert. Der Test läuft folgendermaßen ab:

Die Syn elisa Pins werden vor ihrem Eintauchen in die erste Mikrotiterplatte einmalig gewaschen (Waschpufferbad). In der ersten Mikrotiterplatte (Rundboden) kommt es zur Reaktion der Prolaktin-Antigene, enthalten in den Standards und Patientenproben (25µl+100µl Probenpuffer), mit den an den Pins haftenden Prolaktin-Antikörpern. Die Mikrotiterplatte wird mit den Pins 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Pinplatte der ersten Mikrotiterplatte entnommen und nach zweimaligem Waschen in die zweite Mikrotiterplatte getaucht, die bereits 100µl Enzympuffer mit Enzymkonjugat enthält. Es kann nun

die Bildung eines Sandwich-Komplexes an den Synelisa Pins erfolgen (Abb. 7). An den schon vorhandenen Antikörper-Antigen-Komplex haftet sich ein zweiter enzymmarkierter Prolaktin-Antikörper (Konjugat). Nach dem Inkubieren und Waschen unter den oben schon angeführten Bedingungen, wird die Pinplatte dann in die dritte Mikrotiterplatte (Flachboden), in der 200µl Enzymsubstrat und Wasserstoffperoxid enthalten sind, getaucht. Das Substrat wird von dem am Antigen-Antikörper-Komplex haftenden Enzym umgesetzt und verursacht nach 10min lichtgeschützter Inkubation eine Farbentwicklung, die durch anschließende Zugabe von Schwefelsäure (50µl/Kavität) zum Stillstand gebracht wird. Nach weiteren 10min erfolgt die Messung der Extinktionen bei 492nm am Plattenreader (SLT 400 ATX). Die Daten werden unter Verwendung eines PC-Programms der Firma Elias ausgewertet. Nach Angaben der Firma ist der Assay auf eine 95% reine hPRL-Präparation eingestellt, wobei 1ng hPRL/ml 33 µIU/ml entspricht. Die Intraassayvariation liegt bei 3,8 - 6,0% und die Interassayvariation bei 4,4 - 7,7% über den Meßbereich. Der Normalbereich dieses Testes beträgt:

für Männer: 1 - 15ng/ml

für Frauen (nicht schwanger): 2 - 20ng/ml

3.1.1.2.2 Immunradiometrischer Assay (IRMA)

24 der insgesamt 106 Prolaktinwerte der Patienten mit SLE wurden aufgrund einer Umstellung des Verfahrens zur Prolaktinbestimmung mit Hilfe eines IRMAs ermittelt.

Auch im Laufe dieses Testes kommt es zur Bildung eines Sandwich-Komplexes (siehe Abb. 7). Der Komplex besteht aus Prolaktin und drei monoklonalen Antikörpern. Diese besitzen eine hohe Affinität und Spezifität für das Hormon. Zwei der drei Antikörper sind radioaktiv markiert (^{125}I). Der dritte ist an Biotin gekoppelt. Die Antikörper richten sich gegen drei unterschiedliche Epitope.

Zur Formation dieses zunächst löslichen Sandwich-Komplexes werden im ersten Schritt jeweils 50µl Serum und 200µl Antikörperlösung in die Reaktions-Röhrchen pipettiert.

Nach guter Vermischung beider Lösungen wird eine feste Phase zur Bindung des

Sandwich-Komplexes in Form einer Avidin-beschichteten Plastikkugel in jedes Röhrchen eingebracht. Es kommt zu einer hoch affinen und spezifischen Bindung zwischen Biotin und Avidin.

Die Röhrchen werden für 90min auf einem horizontalen Rotationsschüttler bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend werden die ungebundenen Komponenten durch zweimaliges Waschen entfernt.

Schließlich wird die Radioaktivität jedes Röhrchens mit dem automatischen Gammacounter (GammaMaster 1277, Pharmacia Wallac, Freiburg) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Ria Calc Programm der Firma Pharmacia.

Die Intraassayvariation lag bei 3,5 – 4,6% und die Interassayvariation bei 6,7 – 8,0% über den Meßbereich. Der Normalbereich dieses Testes ist mit dem des unter 3.1.2.1. angegebenen Verfahrens nahezu identisch.

für Männer: 1 – 15ng/ml

für Frauen (nicht schwanger): 2 – 23ng/ml

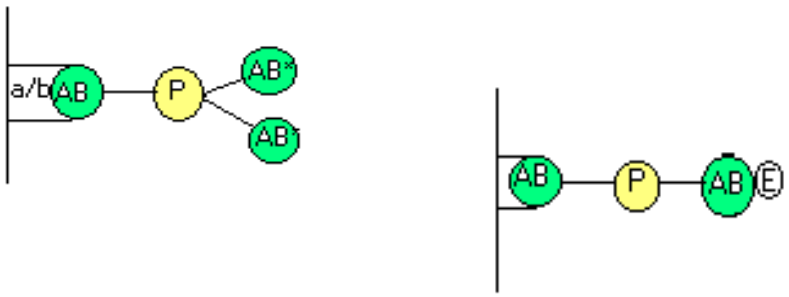


Abb. 7: Verfahren zur Prolaktinbestimmung

links: IRMA, a/b = Komplex aus Avidin und Biotin an der festen Phase in Verbindung mit dem Sandwich-Komplex bestehend aus einem PRL-Molekül (P), zwei ^{125}I-markierten PRL-Antikörpern (AB*) und einem weiteren PRL-Antikörper (AB)
rechts: ELISA mit an der Pinplatte haftendem Sandwich-Komplex bestehend aus einem PRL-Molekül (P) und zwei gegen verschiedene Epitope gerichtete PRL-Antikörper (AB), von denen einer enzymmarkiert ist (E)

3.1.1.3 Ermittlung des Aktivitätsindex bei SLE

Zur Einschätzung der Krankheitsaktivität der SLE–Patienten kam der ECLAM–Score (European Consensus Lupus Activity Measurement score) (200) zur Anwendung. In diesen Score gehen sowohl die vorliegenden klinischen Manifestationen als auch Aussagen über die Blutsenkungsgeschwindigkeit und das Vorliegen eines Komplementverbrauches ein. Eine Übersicht der bei den Patienten vorliegenden SLE–Manifestationen bietet Tab. 10.

3.1.1.4 Bestimmung verschiedener Autoantikörper

Parallel zur Bestimmung der Serumprolaktinwerte erfolgte eine Untersuchung der Patientenseren auf das Vorhandensein verschiedener Autoantikörper. Dieses geschah im Rahmen der Routine-Diagnostik im Rheumatologischen Labor der Charité. Es kamen folgende Verfahren zum Einsatz:

1. ANA: indirekte Immunfluoreszenz auf Hep-2-Zellen (im Rahmen der Routine-Diagnostik der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie der Charité)
2. Anti-dsDNA: ELISA (IgG) (im Rahmen der Routine-Diagnostik der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie der Charité) Chrithidia lucilliae-Immunofluoreszenz (bei Patienten mit entsprechend hoher Anti-dsDNA-Antikörperkonzentration)
3. Anti-Cardiolipin-Antikörper (IgG,IgM): ELISA (Imtec Immundiagnostic GmbH, Berlin)
4. Zirkulierende Immunkomplexe (IgG-haltig): ELISA (Imtec Immundiagnostic GmbH, Berlin)

Als pathologisch wurden dabei gewertet:

1. ANA > 1:80;
2. Anti-dsDNA > 5,97 U/ml;

   Antikörper gegen Crithidien-DNS ab einem Titer von 1:2;

3. Anti-Cardiolipin-Antikörper(IgG) > 48 U/ml;

   Anti-Cardiolipin-Antikörper (IgM) > 44 U/ml;

4. zirkulierende Immunkomplexe > 55 µg/ml.

Tab. 10: Krankheitsmanifestationen der SLE-Patienten

* renale Manifestationen mit Proteinurie und Hämaturie und Verminderung der Kreatininclearance bzw. Erhöhung der Retentionsparameter (bis Krea=2mg/dl)

SLE – Manifestation	Anzahl der betroffenen Patienten	Prozentualer Anteil (%)
allgemeine Krankheitszeichen (Fieber/Müdigkeit)	24	40
Gelenkmanifestationen	22	37
Aktive Haut- und Schleimhautmanifestationen	23	38
Myositis	0	0
Perikarditis	1	2
Intestinale Manifestationen	0	0
Lungenmanifestationen	7	12
Neuropsychiatrische Manifestationen	12	20
Renale Manifestationen	31	52
Renale Manifestationen *	12	20
Anämie	24	40
Leukopenie	18	30
Thrombopenie	4	7
Anämie + Leukopenie	11	18
BSG > 25 mm in der ersten h	39	65
C3 erniedrigt	34	57
C3 + C4 erniedrigt	19	32
BSG > 25 mm/h + C3 +C4 erniedrigt	15	25

3.1.1.5 Statistische Methoden

Die statistischen Analysen erfolgten mit dem nicht-parametrischen U-Test nach Mann und Whitney (Vergleich der untersuchten Gruppen hinsichtlich ihrer Serumprolaktinwerte auch in Abhängigkeit von der Manifestationsform,

Krankheitsaktivität und Therapie des SLE und Vergleich der Krankheitsaktivität der SLE-Patienten mit und ohne erhöhte PRL-Werte), dem Chiquadrat – Test (Häufigkeit des Auftretens spezifischer SLE-Manifestationen bei Patienten mit erhöhten PRL-Werten). Eine statistische Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. Für die Überprüfung des Vorhandenseins einer Korrelation (Autoantikörperkonzentration bzw. ECLAM-Score und Serumprolaktinwert) wurde der nicht parametrischer Test nach Spearman gewählt. Die Durchführung aller angeführten statistischen Tests erfolgte unter Zuhilfenahme der Software GraphPad Prism 2.01 für Windows 95.

3.1.2 Effekte von Prolaktin auf die PBMC

3.1.2.1 Charakterisierung der untersuchten Gruppen

3.1.2.1.1 SLE-Patienten

Bei 11 Patienten, der unter 3.1.1.1.1 beschriebenen Patienten mit systemischem Lupus erythematodes, wurde Blut (jeweils um 3ml bzw. 20ml Citratblut) für die Anfertigung von Zellkulturen entnommen. Mit einer Ausnahme handelt es sich dabei um Patienten, die sich wegen eines Schubes der Grunderkrankung bzw. im Rahmen eines festgelegten Therapieregimes stationär vorstellten. 3 der 11 Patienten waren männlich, 8 weiblich. Die Aktivität des SLE der einzelnen Patienten war verschieden zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Zur Beschreibung dieser Aktivität kam der ECLAM-Score zum Einsatz (ECLAM: 1 - 10; mean ECLAM=5,18; SD=2,9). Alle für die Einschätzung der Krankheitsaktivität notwendigen Informationen stammen aus den Krankenunterlagen oder von den behandelnden Ärzten. Weiterhin wurden Aufzeichnungen über die immunsuppressive und sonstige medikamentöse Therapie der Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme angefertigt. Keiner der Patienten nahm Medikamente ein, die das Serumprolaktin beeinflussen könnten. 6 Patienten wurden mit einer Kombination von Cyclophosphamid und Prednison, 3 mit einer Prednison-Stoß-Therapie und einer mit Azathioprin behandelt. Ein Patient war zum Untersuchungszeitpunkt ohne Therapie. Die Prolaktinwerte der Patienten lagen zwischen 6,4 und 39,5ng/ml mit einem Mittelwert von 19,3ng/ml (SD=10,5). Bei 6 der 11 Patienten war das Serumprolaktin zum Zeitpunkt der Untersuchung erhöht.

Das Durchschnittsalter der Patienten betrug zum Zeitpunkt der Untersuchung 31,7 Jahre (SD=12,8).

3.1.2.1.2 Gesunde Kontrollgruppe

Diese Kontrollgruppe setzt sich aus 13 Blutspendern zusammen (7 weiblich, 6 männlich). Um hormonelle Einflüsse bei den weiblichen Spendern von vornherein auszuschließen, wurden nur Spenderinnen ausgewählt, die keine hormonellen Kontrazeptiva oder andere Hormonpräparate einnahmen. Von allen 13 Probanden wurden die Zellkulturen zur Zytokinproduktion auf die gleiche Art und Weise wie bei den SLE-Patienten hergestellt. Von 8 der 13 Gesunden (3 männlich, 5 weiblich) sind zusätzlich PBMC zur Untersuchung der Immunglobulin-G-Produktion isoliert worden. Das Durchschnittsalter dieser Gruppe (n=8) betrug 32,7 Jahre (SD=11,8).

3.1.2.2 Zellkulturen

3.1.2.2.1 Lymphozytenkultur zur Immunglobulinproduktion

Zur Gewinnung der Lymphozyten wurden entweder Vollblut (Patienten) oder Buffy coats (Kontrollgruppe) verwendet. Die Blutproben der SLE-Patienten (Citratzusatz zur Gerinnungshemmung) wurden morgens entnommen und unverzüglich weiterverarbeitet. Sowohl die PBMC der Blutspender als auch die der Patienten wurden nach Überschichten von Ficoll (seromed, Berlin) mit dem Blut bzw. 1:2 verdünnten Buffy coats (PBS (seromed, Berlin)) mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert (201). Der durch die Zentrifugation entstandene Lymphozytenring (PBMC) wurde mit Hilfe einer Saugpipette abgenommen. Aus der so gewonnenen Lymphozytensuspension wurden die noch enthaltenen Serumimmunglobuline und Thrombozyten durch dreimaliges Waschen in PBS entfernt. Die PBMC wurden resuspendiert, ausgezählt und mit Kulturmedium (RPMI 1640, versetzt mit 5% FKS und Streptomycin/Penicillin, 10U/ml, alles seromed, Berlin) und den in RPMI 1640 gelösten Stimulationszusätzen PRL (Endkonzentration = 20 und 100ng/ml) bzw. LPS (Endkonzentration = 2pg/ml) so verdünnt, daß sie am Ende in einer

Endkonzentration von $1x10^6$ Zellen/ml in der Kultur vorlagen. Die Zellkulturen mit den unterschiedlichen Zusätzen zur Stimulation wurden auf eine 96er Rundboden-Mikrotiterplatte (Greiner Labortechnik) zu je 200µl/Well aufgebracht und über 7 Tage bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

Im Verlauf der Untersuchungen fand aufgrund des hohen Endotoxingehaltes des anfangs verwendeten Prolaktins (human; Paesel+Lorei GmbH & Co-Hanau) (1,1EU/µg, bestimmt mittels Limulus Amoebocyte Lysate, BIO WHITTAKER) der Wechsel zu einem rekombinanten humanen Prolaktin (genzyme diagnostics, Cambridge, USA) statt. Für das rekombinante PRL ist vom Hersteller ein Endotoxingehalt von 0,02ng/µg angegeben worden. Die spezifische Aktivität des Prolaktins ist von den Herstellern durch unterschiedliche Verfahren bestimmt worden und deshalb nicht direkt vergleichbar:

PRL (Paesel+Lorei): 20 IU/mg bestimmt durch einen RIA

R-PRL (genzyme): $5*10^6$ U/mg bestimmt durch den Nb2-Proliferations-Assay

Die Zellen von 4 Patienten und 6 Gesunden wurden mit dem PRL (Paesel+Lorei), die übrigen mit dem r-PRL (genzyme) stimuliert. In der IgG-Produktion unterschieden sich diese beiden Gruppen nicht voneinander.

Die nach der Inkubation abpipettierten Zellkulturüberstände wurden bei -20°C aufbewahrt und anschließend der IgG-Messung mittels ELISA zugeführt.

3.1.2.2.2 Zellkultur zur Zytokinproduktion

Die von den Patienten und Blutspendern gewonnenen Blutproben wurden mit Citratzusatz abgenommen und sofort weiterverarbeitet. Zu den Vollblutproben von je 20µl wurden je 180µl Kulturmedium mit Prolaktin (Paesel+Lorei) zugesetzt. Die Endkonzentration des Prolaktins betrug 20 und 100ng/ml. Als Positivkontrolle fungierte LPS (Sigma) in einer Endkonzentration von 2-100pg/ml.

Im Laufe der Untersuchungen wurde dann aufgrund des Vedachtes einer Kontamination des verwendeten Prolaktins durch Endotoxin sowohl den PRL- als auch den LPS- stimulierten Zellen der monoklonale Monozytenantikörper Anti-CD14 (big 14 biometec, Greifswald) in einer Konzentration von 50µg/ml zugesetzt.

Nach 24 stündiger Inkubation (37°C, 5%CO_2) wurden alle Überstände abpipettiert und bis zur Zytokinmessung bei -70°C aufbewahrt.

3.1.2.3 Messungen

3.1.2.3.1 IgG-Bestimmung in den Kulturüberständen

Bei der Quantifizierung des Gesamt-IgG kam der „Human IgG SURALISA“ (Seramun Diagnostika GmbH-Dolgenbrot) zur Anwendung. Bei diesem 1-Schritt ELISA, liegt folgendes Testprinzip zugrunde: Das an die Festphase gebundene Anti-Human-IgG (isotypenspezifischer hoch-affiner polyklonaler Antikörper vom Schaf) kommt mit den Zellüberständen und dem Konjugat (POD-gekoppeltes Anti-IgG) zur Reaktion. Nach fünfmaligem Waschen und darauffolgender Substratzugabe (Tetrabenzylbenzidin und Wasserstoff-peroxid) wird die Reaktion mit Schwefelsäure gestoppt und der Test mit der Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 450nm abgeschlossen. Die Zellüberstände (50µl) werden 1:10 (Patienten) bzw. 1:5 (Blutspender) verdünnt und danach zusammen mit dem Konjugat (Anti-human IgG-POD; 50µl; Verdünnung 1:100) auf die vorher einmalig gewaschenen Mikrowell-Streifen aufgetragen und dann für 20min bei 20°C inkubiert. Nach wiederholtem Waschen werden dann 100µl gebrauchsfertige Substratlösung/Well hinzugegeben und eine Substratreaktion von 10min (bei 20°C, im Dunkeln) angeschlossen. Die Reaktion wird dann durch den Zusatz von 1M Schwefelsäure zum Stillstand gebracht und die Messung, wie oben beschrieben, angeschlossen. Anhand der hergestellten Standard-Verdünnungsreihe kann eine Standardkurve ermittelt werden, mit deren Hilfe die Berechnung der einzelnen absoluten Werte erfolgt.

Der bestimmte Kontrollwert lag in den vom Hersteller angegebenen Grenzen.

3.1.2.3.2 Zytokinbestimmung

Die Zytokine IL-1β, IL-6 und TNF-α in den Vollblutüberständen wurden mittels kommerzieller ELISAs (human IL-1β Immunoassay und human IL-6 Immunoassay, Quantikine™ R&D Systems,TNF-α EASIA™, Medgenix

Diagnostics, Fleurus, Belgien) in der Abteilung für Klinische Immunologie der Charité bestimmt. Alle verwendeten Assays sind laut Hersteller nur für Forschungszwecke zugelassen. Zur Eingrenzung der Zahl der Zytokine, welche hinsichtlich der Einflußnahmen von PRL auf ihre Produktion von Intresse sein könnten, wurden anfänglich weitere Zytokine (IFN-γ, IL-10, IL-1RA und IL-4) mittels kommerzieller ELISAs bestimmt (IFN-γ EASIA™ - Medgenix Diagnostics, Human IL-10 ELISA - Biosource international, Human IL-1RA-Immunoassay Quantikine™ - R&D Systems, IL-4 ELISA US - Laboserv).

Prinzip:

Die an der Mikrotiterplatte haftenden monoklonalen Anti-Zytokin-Antikörper bilden mit den in den zwei darauffolgenden Arbeitsschritten zugegebenen Zytokinen (enthalten in Standards und Proben) und den enzymmarkierten polyklonalen Anti-Zytokin-Antikörpern des Konjugates sogenannte Sandwich-Komplexe. Die nach abgeschlossener Inkubation nicht gebundenen Anteile werden durch interponierte Waschschritte eliminiert. Die am Ende gebundene Enzymmenge und deren zur Farbentwicklung führender Substratumsatz stehen in direktem Zusammenhang mit der Zytokinkonzentration der Proben.

Im TNF-α-Immunoassay kam eine Mischung verschiedener monoklonaler Anti-TNF-α-Antikörper, gerichtet gegen unterschiedliche Epitope des TNF-α-Moleküls, zum Einsatz. Auf diese Weise wurde eine Hyperspezifität des Testes vermieden und gleichzeitig die Sensitivität erhöht.

3.1.2.3.2.1 IL-6

Die Proben wurden abhängig vom erwarteten IL-6-Gehalt 1:10 bzw. 1:20 verdünnt und als Doppelwerte bestimmt.

Durchführung:

1. 100µl Verdünnungspuffer (RD1A) und 100µl Standard bzw. vorverdünnte Probe/Kavität (2h bei Raumtemperatur inkubiert und 4 mal gewaschen)

2. 200µl IL-6-Konjugat/Kavität (2h bei Raumtemperatur inkubiert und 4 mal gewaschen)
3. 200µl Substratlösung/Kavität (20min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 2N Schwefelsäure gestoppt)
4. innerhalb von 30min Messung der Extinktion am Spektrophotometer (anthos labtec instruments) bei 450 nm Wellenlänge

Es wurde eine Eichkurve aus 6 Werten (Doppelwertbestimmung) erstellt. Als Standard wurde in diesem Assay rekombinantes IL-6 eingesetzt. Laut Hersteller liegt die Intraassayvariation bei 1,7 – 4,4% und die Interassayvariation bei 1,9 – 3,6%.

3.1.2.3.2.2 IL-1β

Die Proben wurden abhängig vom erwarteten IL-1β-Gehalt in einer Verdünnung von 1:2 oder unverdünnt als Doppelwerte gemessen.

Durchführung:

1. 200µl verdünnter Standard oder Probe/Kavität (2h bei Raumtemperatur inkubiert und dreimal gewaschen)
2. 200µl IL-1β-Konjugat/Kavität (1h bei Raumtemperatur inkubiert und dreimal gewaschen)
3. 200ml Substratlösung/Kavität (20min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 2N Schwefelsäure gestoppt)
4. innerhalb von 30min Messung der Extinktion am Spektrophotometer (anthos labtec instruments) bei 450nm Wellenlänge

Es wurde eine Eichkurve aus 7 Werten (Doppelwertbestimmung) erstellt. Als Standard wurde „mature“ (biologisch aktives) IL-1β verwendet. Aus diesem Grunde ist es möglich, daß das nicht prozessierte IL-1β-Molekül, welches auch in den Proben enthalten sein kann, nicht erkannt wird. Da diese Form quantitativ jedoch nicht dominiert und außerdem biologisch inaktiv ist, stellt der Immunoassay eine zufriedenstellende Meßmethode für IL-1β dar. Die Intraassayvariation ist vom Hersteller mit 2,3 – 3,4% angegeben. Die Interassayvariation liegt bei 3,4 – 7,1%.

3.1.2.3.2.3 TNF-α

Die Proben wurden 1:2 verdünnt als Doppelwerte gemessen.

Durchführung:

1. 50µl Inkubationspuffer und 200µl vorverdünnte Probe/Standard pro Kavität (2h Inkubation bei Raumtemperatur und dreimaliges Waschen)
2. 100µl Verdünnungspuffer und 50µl TNF-α-Konjugat /Kavität (2h Inkubation bei Raumtemperatur und dreimaliges Waschen)
3. 200µl Substratlösung/Kavität (30min Inkubation, anschließend mit 50µl 1,8N H_2SO_4 gestoppt)
5. innerhalb von 3h Messung der Extinktion am Spektrophotometer (anthos labtec instruments) bei 450nm Wellenlänge

Es wurde eine Eichkurve aus sechs Werten (Doppelwertbestimmung) erstellt. Die Intraassayvariation liegt bei 3,7 – 5,2%, die Interassayvariation bei 8 – 9,9% über den Meßbereich.

3.1.2.4 Statistische Methoden

Zum Vergleich der Gesamt-IgG-Produktion der SLE Patienten im unstimulierten bzw. stimulierten Zustand kam der nicht parametrische Wilcoxon-Test mit Bonferroni-Adjustierung zum Einsatz. Die Bewertung der IgG-Konzentration von Patienten und Gesunden im Vergleich erfolgte mit Hilfe des nicht parametrischen U-Tests nach Mann und Whitney. Ein möglicherweise vorhandener Zusammenhang zwischen Aktivität des SLE und Stimulierbarkeit der PBMC durch PRL wurde unter Einsatz des nicht parametrischen Testes nach Spearman untersucht.

3.1.3 Untersuchung einer Gruppe von Prolaktinompatienten auf das Vorhandensein von klinischen oder serologischen Anzeichen für einen Autoimmunprozeß

3.1.3.1 Charakterisierung der zwei untersuchten Gruppen

3.1.3.1.1 Prolaktinompatienten

Die Gruppe der Prolaktinompatienten setzt sich aus 39 ambulanten Patienten der Endokrinologischen Sprechstunde der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Gastroenterologie und Endokrinologie der Charité zusammen, die dort zwischen Oktober 1994 und Mai 1998 medizinisch betreut worden sind. 6 Patienten sind männlich, 33 weiblich. Das mittlere Alter der Patienten beträgt 44,5 (SD=12,8) Jahre (27 – 68 Jahre). Zum Zeitpunkt der Untersuchung lagen die PRL-Werte zwischen 0,5 und 1000ng/ml, 21 Patienten hatten einen erhöhten und 18 Patienten einen normalen PRL-Wert.

3.1.3.1.2 Gesunde Kontrollgruppe

Die Gruppe der Gesunden besteht aus 39 Blutspendern des Blutspendezentrums Berlin-Marzahn. Das Alter der Blutspender lag zwischen 19 und 64 mit einem mittleren Alter von 38,5 (SD=11,4) Jahren. Hinsichtlich der Geschlechterverteilung gab es keinen Unterschied zur Patienten-Gruppe.

3.1.3.2 Bestimmung der Autoantikörper

Das zur Autoantikörperbestimmung erforderliche Blut wurde in Serum-Monovetten (Sarstedt) entnommen. Das anschließend durch Zentrifugation gewonnene Serum wurde bei – 20°C bis zur Bestimmung der Autoantikörper gelagert.

3.1.3.2.1 Antinukleäre Antikörper

Für die Bestimmung der ANA mittels indirekter Immunfluoreszenz erfolgte zunächst die Verdünnung der Seren (1:80) mit PBS (pH: 7,2). Je nach der Konzentration, der in den Seren enthaltenen ANA, wurden ggf. weitere

Verdünnungen nötig (1:160 – 1:10240). Anschließend erfolgte das Auftragen der verdünnten Seren und einer Positiv- und Negativkontrolle/Objektträger. Verwendet wurden mit Hep-2-Zellen beschichtete Objektträger (Bios GmbH, Gräfelfing). Nach Inkubation der Objektträger über 30min in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur wurden diese abgespült und für 10min in ein Bad aus Spühllösung (PBS) gestellt. Dieser Vorgang des Waschens wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Danach erfolgte das Aufbringen des FITC-markierten Konjugates (Anti-Human IgGAM, The binding site, Birmingham, UK) und eine erneute Inkubation in der feuchten Kammer (30min) mit anschließendem Waschen (siehe oben), unter Vermeidung direkter Lichteinwirkung. Zur Konservierung der Präparate wurde mit PBS versetztes Glycerol (1:5) aufgetragen und der Objektträger mit einem Deckplättchen versiegelt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Olympus AX70 PROVIS).

3.1.3.2.2 Anti-dsDNA-Antikörper

Die Bestimmung der Anti-dsDNA-Antikörper bei den Prolaktinompatienten wurde im Routine-Labor der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie, vergleichbar mit der normalerweise bei SLE-Patienten vorgenommenen Bestimmung, durchgeführt (siehe 3.1.1.4).

3.1.3.2.3 Immunoblot

Die Hälfte der Seren der Prolaktinompatienten wurden im Immunoblot als Referenzmethode der Differenzierung der ANA untersucht. Dabei wurde in Anlehnung an vorausgegangene Untersuchungen MOLT-4-Zellextrakte als Antigenquelle verwendet (202). Nach elektrophoretischer Auftrennung des MOLT-4-Zellextraktes im Polyacrylamid-Gel (15%ig) und anschließendem Westernblotting auf Nitrozellulose erfolgte eine 30-minütige Blockierung der Nitrozellulosestreifen mit 5%iger Trockenmilch in PBS (0,1% Tween) und anschließend das Auftragen der 1:100 verdünnten Patientenseren (200µl/Streifen). Nach 30-minütiger Inkubation bei RT wurden die Streifen 3 mal 5min gewaschen. Das an die Streifen gebundene IgG konnte anschließend durch POD-gekoppeltes Anti-human-IgG (Kaninchen, Imtec Immundiagnostic GmbH,

Berlin), (200µl/Streifen) und mittels Chemolumineszenz durch den Einsatz von ECL-Reagenz (Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL), (200µl/Streifen) detektiert werden.

3.1.3.3 Statistische Methoden

Zum Vergleich der Häufigkeit des Auftretens bestimmter Autoantikörper und Symptome bei Prolaktinom-Patienten und Gesunden kam der Chiquadrat-Test (χ^2 –Test) zum Einsatz. Eine statistische Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Verhalten der Serumprolaktinwerte bei SLE

3.2.1.1 Vergleich der Serumprolaktinwerte von SLE-Patienten und Gesunden

Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der Serumprolaktinwert-Bestimmung der SLE-Patienten und der unter identischen Bedingungen untersuchten Blutspender und Patienten mit anderen Kollagenosen bzw. Vaskulitiden dargestellt. In der Tab. 11 sind die Mittelwerte der Serumprolaktinomwerte der drei untersuchten Gruppen aufgeführt. In die Betrachtung geht die Zusammensetzung der Gruppen hinsichtlich Geschlecht und Alter der Patienten ein.

Tab. 11: Serumprolaktinwerte im Vergleich

SD=Standardabweichung, n=Anzahl, M = männlich, F = weiblich/prämenopausal, F* = weiblich/ postmenopausal, Pat.* = Patienten mit Vaskulitiden und Kollagenosen (nicht SLE)

Gruppe	SLE – Patienten				Gesunde			Pat.*
	M	F*	F	G	M	F	G	G
n	8	13	39	60	17	30	47	18
Mittelwert – PRL in ng/ml (SD)	12,79 (7,53)	12,63 (6,96)	19,99 (17,52)	17,43 (15,05)	5,52 (3,17)	6,71 (3,23)	6,28 (3,22)	13,12 (10,30)

Die Serumprolaktinwerte der SLE-Patienten unterschieden sich signifikant von denen der Gesunden ($p < 0,0001$). Gleiches trifft auch für die Prolaktinwerte der Patienten mit sonstigen Kollagenosen zu ($p = 0,001$). Zwischen den zwei Patientengruppen gibt es hinsichtlich der Prolaktinwerte jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,1727$). Die Prolaktinwerte der SLE – Patienten lagen zwischen 3,1 und 89,5ng/ml mit einem Mittelwert von 17,43ng/ml (SD=15,05). 20 Patienten hatten einen erhöhten PRL-Wert (33,3%). Hier muß hinzugefügt werden, daß die PRL-Werte postmenopausaler Frauen bereits ab >15ng/ml als erhöht eingestuft wurden (siehe unter 1.2.5) (76, 77). Drei der Patienten mit erhöhten PRL-Werten waren männlich. Die PRL-Werte der postmenopausalen weiblichen und der männlichen Patienten unterschieden sich nicht wesentlich voneinander (MW=12,79ng/ml (SD=7,53) und 12,63ng/ml (SD=6,96)). Deshalb bot es sich an, diese Patienten für die folgende Betrachtung

hinsichlich der Krankheitsaktivität zusammenzufassen. Die Prolaktinwerte der Patientinnen im gebärfähigen Alter lagen höher (MW=19,99ng/ml (SD=17,52)). Die Krankheitsaktivität in den unterschiedlichen Gruppen war zwar vergleichbar (ECLAM-MW=4,38 (SD=3,01) vs. 4,90 (SD=2,82)), lag aber bei den Patientinnen im gebärfähigen Alter durchschnittlich höher.

Die Prolaktinwerte der Patienten mit verschiedenen Kollagenosen und Vaskulitiden lagen zwischen 3 und 44,2ng/ml mit einem Mittelwert von 13,12ng/ml (SD=10,30). In dieser Gruppe hatten 2 Patienten erhöhte PRL-Werte (beide weiblich). Keiner der Blutspender hatte einen erhöhten PRL-Wert. Alle Werte lagen in der Blutspender-Gruppe zwischen 1,90 und 16,40ng/dl mit einem Mittelwert von 6,28ng/ml (SD=3,22). Die Ergebnisse sind in Abb. 8 dargestellt.

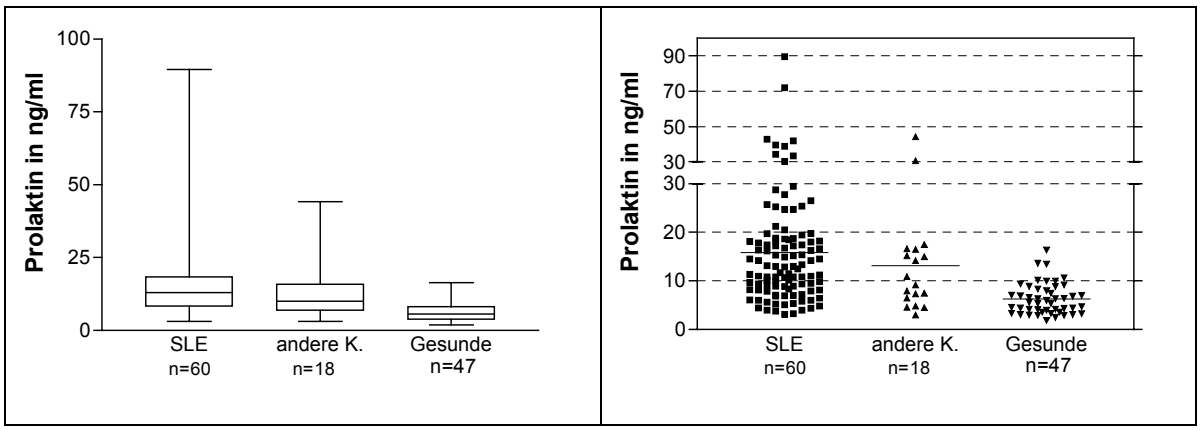


Abb. 8:Prolaktinwerte im Vergleich

K.= Kollagenosen

3.2.1.2 *Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität und der Höhe der Serumprolaktinwerte der SLE-Patienten*

Es konnte ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität, ausgedrückt durch den ECLAM-Score und den Serumprolaktinwerten der SLE – Patienten nachgewiesen werden (nicht-parametrischer Test (Spearman);r = 0,5445; p<0,0001). Zur Veranschaulichung dient Abb. 9.

Nach Einteilung der 60 untersuchten SLE-Patienten, hinsichtlich der Höhe der Krankheitsaktivität (ECLAM>4 und ECLAM≤4), ergaben sich zwei gleich große

Gruppen mit unterschiedlich hohen PRL-Werten (nicht parametrischer U-test nach Mann und Whitney; p = 0,003) (Abb. 10). Der Mittelwert der PRL-Serumkonzentration der Patienten mit hoher Krankheitsaktivität liegt bei 22,06ng/ml (SD=18,16), der Mittelwert der Patienten mit weniger stark ausgeprägter Aktivität bei 12,82ng/ml (SD=9,35).

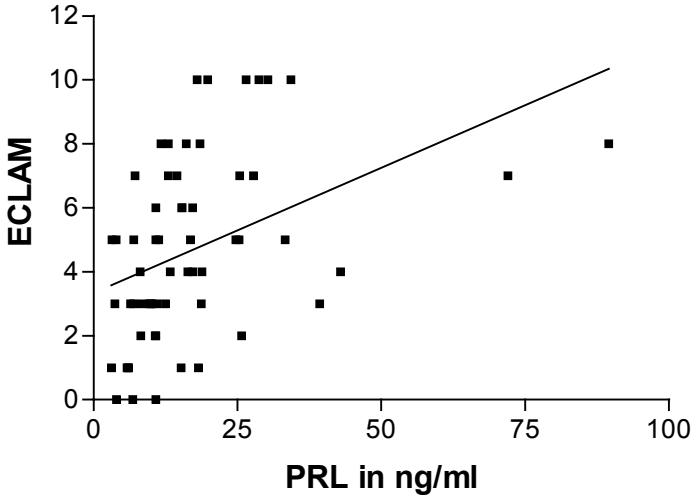


Abb. 9: Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität und dem PRL-Wert

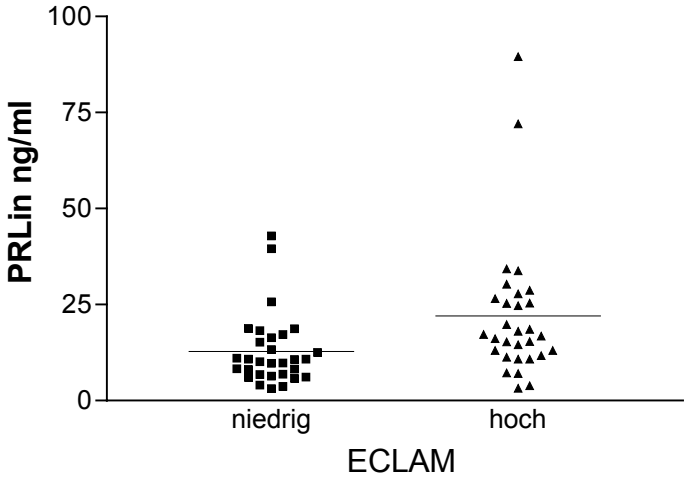


Abb. 10: Verteilung der PRL-Werte in zwei Gruppen mit niedriger (ECLAM≤4) und hoher Krankheitsaktivität (ECLAM>4)

Bildet man jeweils eine Gruppe mit normalen und erhöhten Serumprolaktinwerten und betrachtet deren durchschnittliche Krankheitsaktivität, so stellt man ebenfalls

einen signifikanten Unterschied fest. Nach der Zuordnung von 4 PRL-Werten postmenopausaler Frauen zwischen 18 und 19,8ng/ml (siehe Festlegung S.47) zur Gruppe mit erhöhten PRL-Werten, ergibt sich folgendes:

Der Mittelwert der Krankheitsaktivität liegt in der Gruppe mit erhöhtem PRL (n=20) bei 6,80 (SD=2,78) und in der Gruppe mit normalem PRL (n=40) bei 3,82 (SD=2,43), (nicht-parametrischer U-Test nach Mann und Whitney; p=0,0005).

Es besteht also ein statistisch signifikannter Unterschied in der Krankheitsaktivität der zwei Gruppen. Dies gillt auch für den Fall der Zuordnung der oben erwähnten vier Werte zur Gruppe der Patienten mit normalen PRL-Werten (p=0,0073). Genauere Informationen zur Verteilung der Werte bietet Abb. 11.

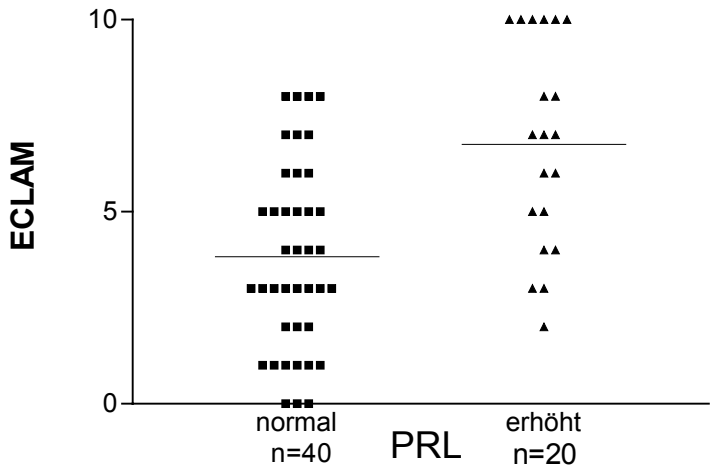


Abb. 11: Verteilung der Krankheitsaktivität bei SLE-Patienten mit normalen und erhöhten PRL-Werten

3.2.1.3 *Zusammenhang zwischen der Art der SLE-Manifestation und der Höhe des Serumprolaktins*

Zunächst wurde untersucht, ob es Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens einzelner SLE-Manifestationen bei Patienten mit normalen bzw. erhöhten Prolaktinwerten gibt. Es ist festzustellen, daß die Häufigkeit jeder hier untersuchten SLE-Manifestation, mit Ausnahme der Thrombozytopenie und der Leukopenie, bei Patienten mit erhöhtem PRL-Werten höher ist als bei den übrigen Patienten. Die Unterschiede sind jedoch nicht statistisch signifikant (χ^2-Test; p

zwischen 0,0987 und 0,9979). Einen genauen Überblick über die Häufigkeit der unterschiedlichen SLE-Manifestationen bei hyper- und normoprolaktinämischen SLE-Patienten bietet Tab. 12.

Tab. 12: Häufigkeit bestimmter Krankheitsmanifestationen bei SLE-Patienten mit erhöhten bzw. normalen PRL-Werten

SLE – Manifestation	PRL erhöht		PRL normal		p
	n	%	N	%	χ^2-Test
allgemeine Krankheitszeichen	13	65	11	27,5	0,0987
Gelenkmanifestationen	9	45	13	32,5	0,925
Aktive Haut- und Schleimhautmanifestationen	10	50	13	32,5	0,7857
Perikarditis	1	5	0	0	0,7295
Lungenmanifestationen	4	20	3	7,5	0,7318
Neuropsychiatrische Manifestationen	6	30	6	15	0,7587
Renale Manifestationen	15	75	17	42,5	0,2261
Renale Manifestationen *	8	40	10	25	0,1117
Anämie	12	60	11	27,5	0,2023
Leukopenie	8	40	10	25	0,8392
Thrombopenie	1	5	3	7,5	0,9979
Anämie + Leukopenie	6	30	5	12,5	0,6045
BSG > 25 mm in der ersten h	16	80	23	57,5	0,5634
C3 erniedrigt	14	70	20	50	0,7042
C3 + C4 erniedrigt	7	35	12	30	0,9972
BSG > 25 mm/h + C3 +C4 erniedrigt	7	35	8	20	0,8088

N = Anzahl, % = prozentualer Anteil, renale Manifestationen*: mit Proteinurie und Hämaturie und Verminderung der Kreatininclearance bzw. Erhöhung der Retentionsparameter

Anschließend erfolgte die Einteilung der SLE-Patienten nach dem Merkmal des Vorhandenseins bzw. Nichtvorhandenseins der untersuchten Krankheitsmanifestationen in zwei Gruppen, deren PRL-Werte dann miteinander verglichen werden konnten. Wie aus Tab. 13 hervorgeht, lag der Mittelwert der PRL-Werte der Patienten mit den jeweils untersuchten SLE-Manifestationen (Thrombozyto- und Leukopenie ausgenommen) höher als der der Patienten ohne die untersuchten SLE-Manifestationen. Signifikante Unterschiede waren hier bei

Patienten mit bzw. ohne allgemeine Krankheitszeichen (Fieber und Müdigkeit) (p=0,0056), renale Manifestationen (p=0,0447), Anämie (p=0,0135), erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit (>25mm/h) (p=0,0181) und Komplementverbrauch (p=0,0091) zu finden (nicht-parametrischer U-test nach Mann und Whitney). Am deutlichsten war der Unterschied zwischen den PRL-Werten der Patienten mit aktiver Lupusnephritis (Proteinurie von >0,5g/d, Hämaturie, verminderte Kreatininclearance, erhöhten Retentionswerten bis Krea=2mg/dl) und der Patienten ohne diese Manifestation (p=0,005).

Tab. 13: Mittelwerte der Serumprolaktinwerte der SLE Patienten mit bzw. ohne bestimmte Krankheitsmanifestationen

SLE – Manifestation	mit		ohne		P (Mann-Whitney)
	PRL-Mittelwert (SD)	n	PRL-Mittelwert (SD)	n	
Allgemeine Krankheitszeichen	23,44 (19,72)	24	13,43 (9,223)	36	0,0056 **
Gelenkmanifestationen	21,05 (20,57)	22	15,35 (10,42)	38	0,2661 ns
Aktive Haut- u.Schleimhautmanif.	19,79 (17,79)	23	15,97 (13,11)	37	0,2737 ns
Perikarditis	27,91 (28,76)	1	16,05 (12,03)	59	n.u.
Lungenmanifestationen	30,3 (0)	7	17,22 (15,08)	53	n.u.
Neuropsychiatrische Manif.	20,17 (10,41)	11	16,75 (16,02)	49	0,0891 ns
Renale Manifestationen	20,14 (16,31)	31	14,34 (13,08)	29	0,0447 *
Renale Manifestationen *	22,81 (9,256)	12	16,09 (15,97)	48	0,005 **
Anämie	22,63 (19,60)	24	14,21 (10,41)	36	0,0135 *
Leukopenie	17,22 (7,358)	18	17,53 (17,42)	42	0,1357 ns
Thrombopenie	12,4 (5,083)	4	17,79 (15,48)	56	n.u.
Anämie + Leukopenie	18,23 (6,102)	11	17,26 (16,45)	49	0,0928 ns
BSG > 25 mm in der ersten h	20,38 (17,35)	39	11,96 (6,918)	21	0,0181 *
C3 erniedrigt	21,41 (17,99)	34	12,23 (7,587)	26	0,0091 **
C3/C4 erniedrigt	23,96 (22,14)	19	14,41 (9,155)	41	0,0608 ns
BSG > 25 mm/h/C3/C4 erniedrigt	27,44 (23,78)	15	14,1 (8,845)	45	0,0113 *

Renale Manifestationen* = Proteinurie, Hämaturie und Verminderung der Kreatininclearance bzw. Erhöhung der Retentionsparameter

3.2.1.4 Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Autoantikörpern, deren Konzentration und den Serumprolaktinwerten

3.2.1.4.1 Anti-dsDNA-Antikörper

Zwischen der Höhe der mittels ELISA bestimmten Antikörper (IgG) gegen Doppelstrang-DNA und dem Serumprolaktin der SLE-Patienten besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang (nicht-parametrischer Test (Spearman); r=0,2685; p=0,0381). Für die Patienten, bei denen auch Anti-dsDNA-Antikörper mittels Crithidien-Immunfluoreszenztest untersucht worden sind, wird ebenfalls ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe des ermittelten Titers und dem Serumprolaktin deutlich (r=0,5184; p=0,0017). Die Ergebnisse sind in Abb. 12. dargestellt.

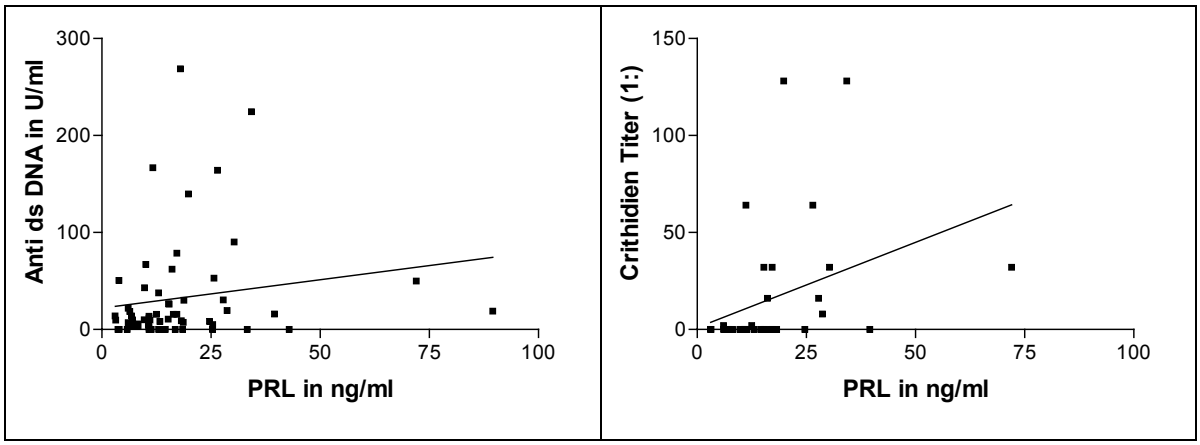


Abb. 12: Zusammenhang zwischen dem Auftreten von DNS-Antkörpern und dem Serumprolaktin bei SLE-Patienten

links: Anti-dsDNA-Konzentration (IgG) gemessen durch einen ELISA
rechts: Anti-DNS-Antikörper-Titer – bestimmt mittels Crithidia-lucilliae-Immunofluoreszenz

3.2.1.4.2 Anti-Cardiolipin-Antikörper

Sowohl die Anti-Cardiolipin-Antikörper vom IgG-Typ als auch vom IgM-Typ wurden bei einem Teil der Patienten bestimmt. Sie korrelierten positiv mit den Serumprolaktinwerten. Für Antikörper vom IgG-Typ ist dieser Zusammenhang statistisch signifikant (nicht-parametrischer Test (Spearman); r=0,3192; p=0,0326), für Antikörper vom IgM-Typ hingegen nicht (r=0,2872; p=0,0619). Die Darstellung dieser Ergebnisse erfolgte in Abb. 13.

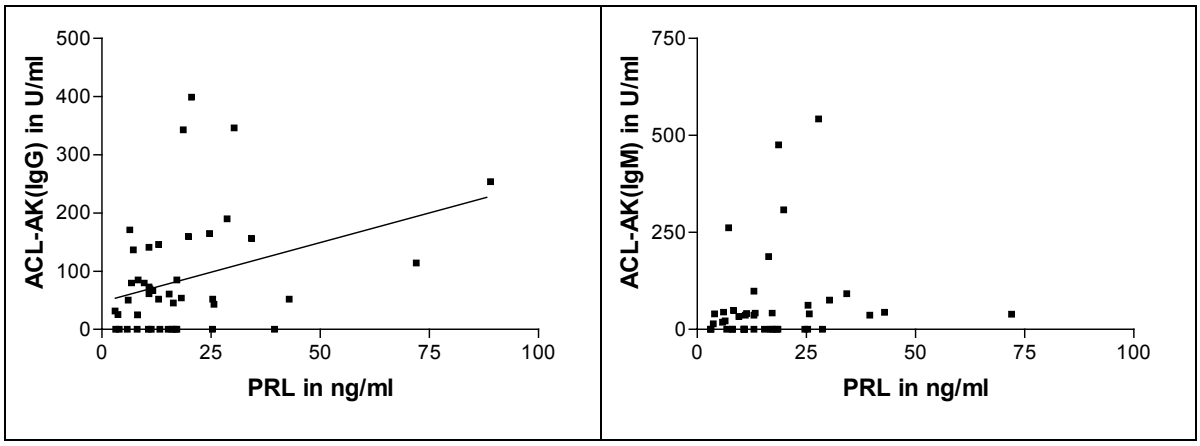


Abb. 13: Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Anti-Cardiolipin-Antikörpern (ACL-AK) (links IgG, rechts IgM) und den Serumprolaktinwerten der SLE-Patienten

3.2.1.4.3 Zirkulierende Immunkomplexe

Die Konzentration der zirkulierenden Immunkomplexe und die des Serumprolaktins sind bei den SLE-Patienten positiv korreliert, es besteht jedoch kein statistisch signifikannter Zusammenhang (nicht-parametrischer Test (Spearman); r=0,09881; p=0,5185).

3.2.1.5 Zusammenhang zwischen der immunsuppressiven Therapie der SLE-Patienten und den Serumprolaktinwerten

In die Betrachtung (Tab.14) gehen fünf unterschiedliche Gruppen ein, wobei ein Patient aufgrund einer Kombinationstherapie mit zwei Medikamenten in zwei Gruppen vertreten sein kann. Die Mittelwerte der Patienten ohne bzw. mit weniger intensiver Therapie (Azathioprin) (n=25) liegen signifikant niedriger als die der Patienten unter Prednison- und Cyclophosphamidtherapie (n=19) (nicht-parametrischer U-test nach Mann und Whitney; p=0,001) (siehe Abb. 14 und Tab. 14.).

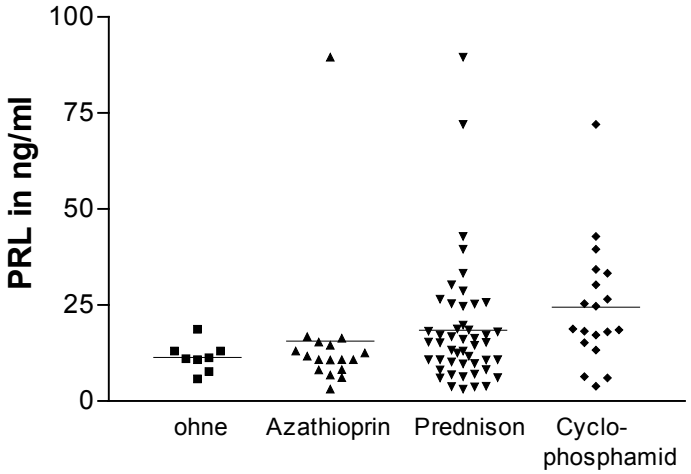


Abb. 14: Verteilung der PRL-Werte in den Patientengruppen ohne Therapie und mit Therapie mit den Mittelwerten

Tab. 14: Prolaktinmittelwerte (MW-PRL) in ng/ml in Abhängigkeit von der Therapie der SLE-Patienen

		männlich	weiblich/post-menopausal	weiblich/prä-menopausal	gesamt
ohne Therapie	MW-PRL (SD) n	11 (0) 1	12,25 (9,12) 2	11,16 (2,17) 5	11,41 (3,86) 8
Azathioprin	MW-PRL (SD) n	8,20 (4,42) 3	12,65 (2,62) 2	17,94 (22,83) 12	15,60 (19,40) 17
Cyclo-phosphamid	MW-PRL (SD) n	6,4 (0) 1	20,63 (4,14) 3	26,41 (17,07) 15	24,44 (15,8) 19
Prednison	MW-PRL (SD) n	10,58 (5,28) 6	13,12 (7,31) 10	21,66 (18,43) 32	18,49 (16,07) 48
Prenison-Bolus	MW-PRL (SD) n	27,8 (0) 1	0	18,75 (21,99) 2	21,77 (16,4) 3

3.2.1.6 *Verlaufsbeobachtung von SLE-Patienten hinsichtlich Krankheitsaktivität, Anti-dsDNA-Antikörper-Titer und Serumprolaktin*

Um zu untersuchen, ob im Krankheitsverlauf Schwankungen der Aktivität mit gleichsinnigen Veränderungen des Serumprolaktins einhergehen, wurde bei ca. 50% der Patienten die Prolaktinbestimmung zu einem, zwei bzw. drei späteren

Zeitpunkten wiederholt. Zur Einschätzung der Krankheitsaktivität wurden jeweils der ECLAM-Score und die Anti-dsDNA-Antikörper-Konzentration (IgG) verwendet. In Abb. 15a/b sind Veränderungen dieser Parameter und des Serumprolaktins im Krankheitsverlauf von 10 SLE-Patienten (2 männlich, 8 weiblich) dargestellt. Kriterium für die Auswahl dieser 10 Patienten war eine unterschiedlich hohe Krankheitsaktivität zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten. Der Mittelwert der Serumprolaktinwerte der Patienten beträgt 17,49ng/ml (SD=7,32) und die mittlere Krankheitsaktivität liegt bei ECLAM=6,81 (SD=2,42).

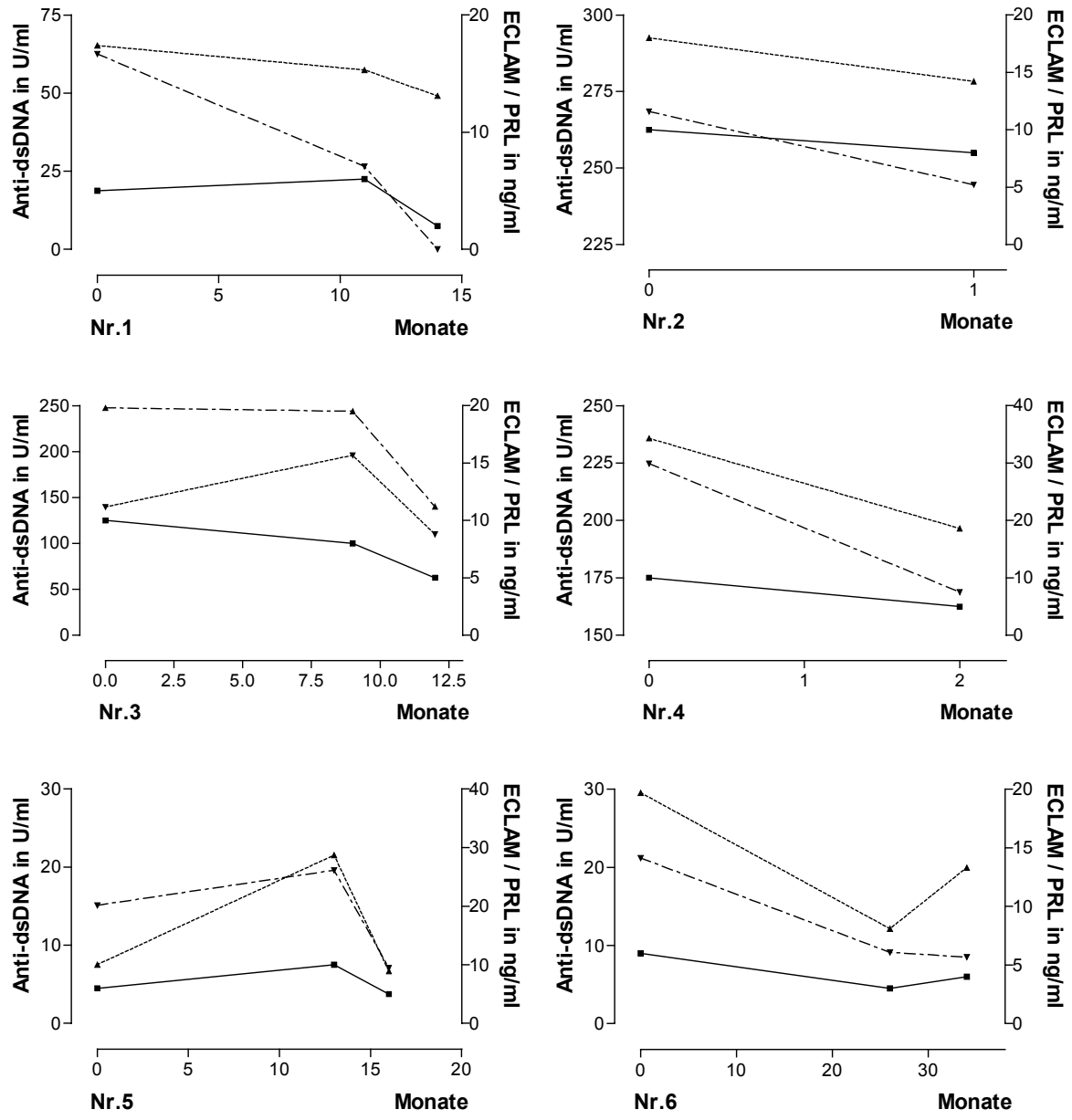


Abb. 15a: Verläufe der Anti-dsDNA-Antikörper (_._._), Serumprolaktinwerte (.....), und der Krankheitsaktivität (ECLAM: _____) von 10 SLE-Patienten mit schwankender Krankheitsaktivität

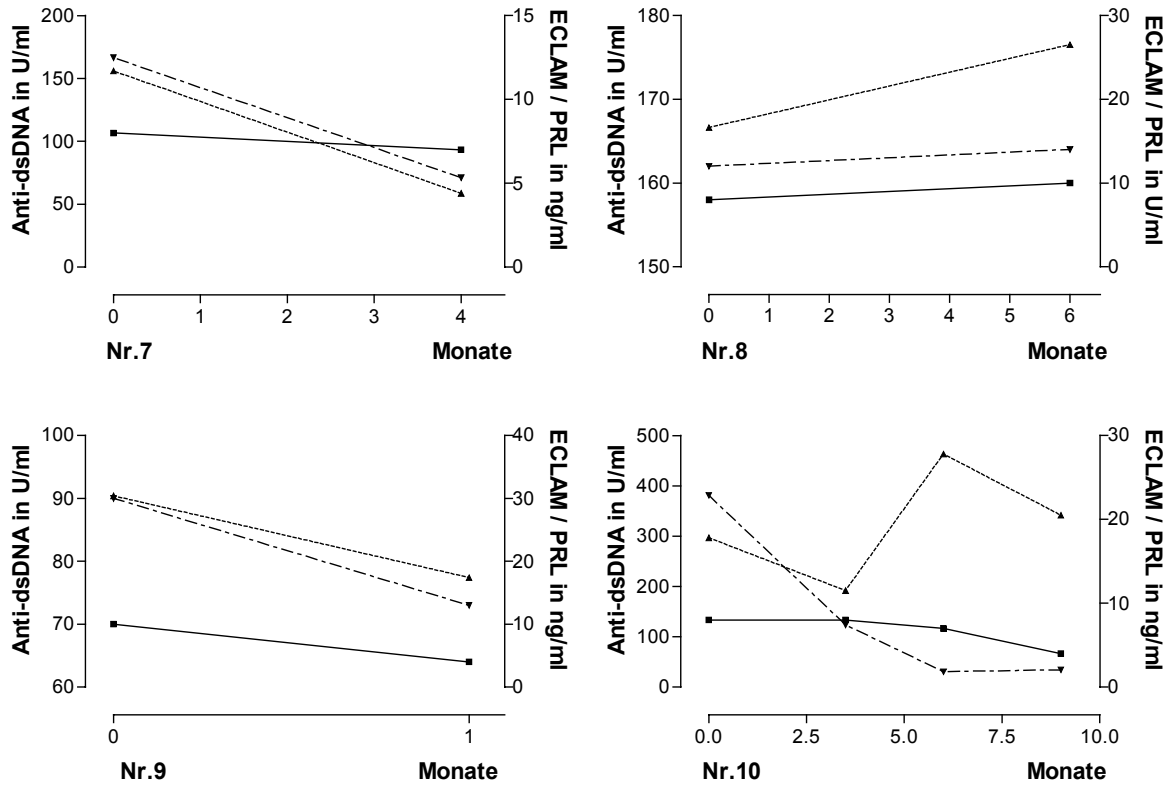


Abb. 15b: Verläufe der Anti-dsDNA-Antikörper (_._._), Serumprolaktinwerte (.....), und der Krankheitsaktivität (ECLAM: _____) von 10 SLE-Patienten mit schwankender Krankheitsaktivität

Wie anhand von Abb. 15a/b erkennbar, zeigte sich bei 9 der 10 untersuchten SLE-Patienten, daß sich das Serumprolaktin ähnlich den Anti-dsDNA-Antikörpern, abhängig von der Krankheitsaktivität veränderte. Diese neun Patienten wiesen einen mehrjährigen Krankheitsverlauf auf. Bei Patient Nr.10 hingegen, handelt es sich um einen ca. 4 Wochen vor der ersten Bestimmung diagnostizierten SLE mit hämatologischer und renaler Manifestation. Bei diesem Patienten zeigte sich das Serumprolaktin erst nach ca. 6 Monaten, ungeachtet der zu diesem Zeitpunkt schon rückläufigen Krankheitsaktivität, als deutlich erhöht (27,8ng/ml) und lag auch nach 8 Monaten, bei weiterhin abnehmender Krankheitsaktivität, mit 20,3ng/ml noch deutlich über dem Normbereich. Es zeigte sich, daß 7 von 10 SLE-Patienten mit schwankender Krankheitsaktivität eine mäßige (7-20ng/ml) und 2 weitere eine geringfügige (ca.5ng/ml) Veränderung der Prolaktinkonzentration im Laufe der Untersuchungen aufwiesen. Diese war gleichsinnig zu den Veränderungen von Anti-ds-DNA-Antikörper-Konzentration und ECLAM-Score ausgerichtet. Bei Patient 10 hingegen erhöhte sich die

Serumprolaktinkonzentration unwesentlich (2,5ng/ml) bei fallendem ECLAM-Score.

Auch bei SLE-Patienten mit über den Untersuchungszeitraum konstantem Krankheitsaktivitätsindex (n=10, 8 weiblich, 2 männlich) lassen sich Schwankungen des Serumprolaktins feststellen. Diese sind jedoch im Unterschied zu denen, die bei den Patienten mit schwankender Krankheitsaktivität registriert wurden, in der Mehrzahl der Fälle (7 von 10) unwesentlich (<2,5ng/ml), in zwei Fällen geringfügig (ca. 5ng/ml) und nur in einem Fall mäßig (18ng/ml). Die Ergebnisse der Verlaufsbeobachtung von Serumprolaktinwerten, ECLAM-Score und Anti-dsDNA-Antikörperkonzentration bei Patienten mit über den Untersuchungszeitraum konstanter Krankheisaktivität sind in Abb. 16a/b dargestellt.

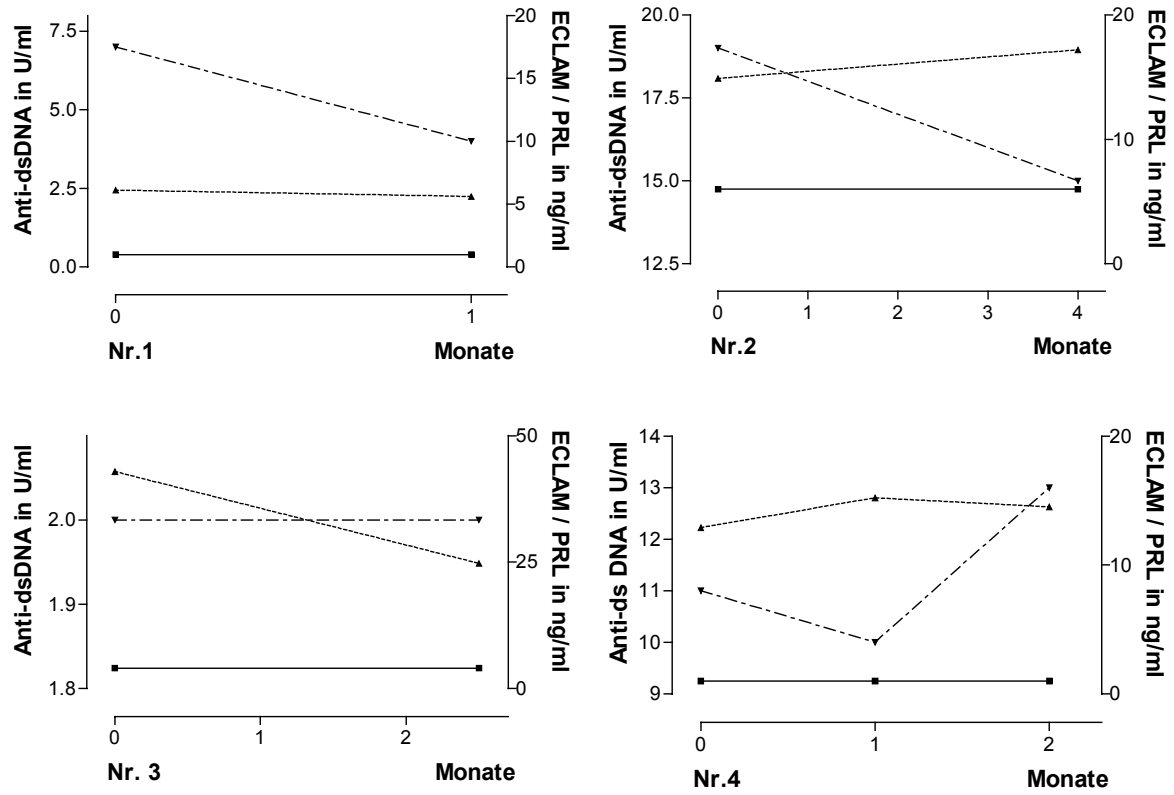


Abb.16a: Verläufe der Anti-dsDNA-Antikörper (_._._), Serumprolaktinwerte (.....), und der Krankheitsaktivität (ECLAM: _____) von 10 SLE-Patienten mit konstanter Krankheitsaktivität

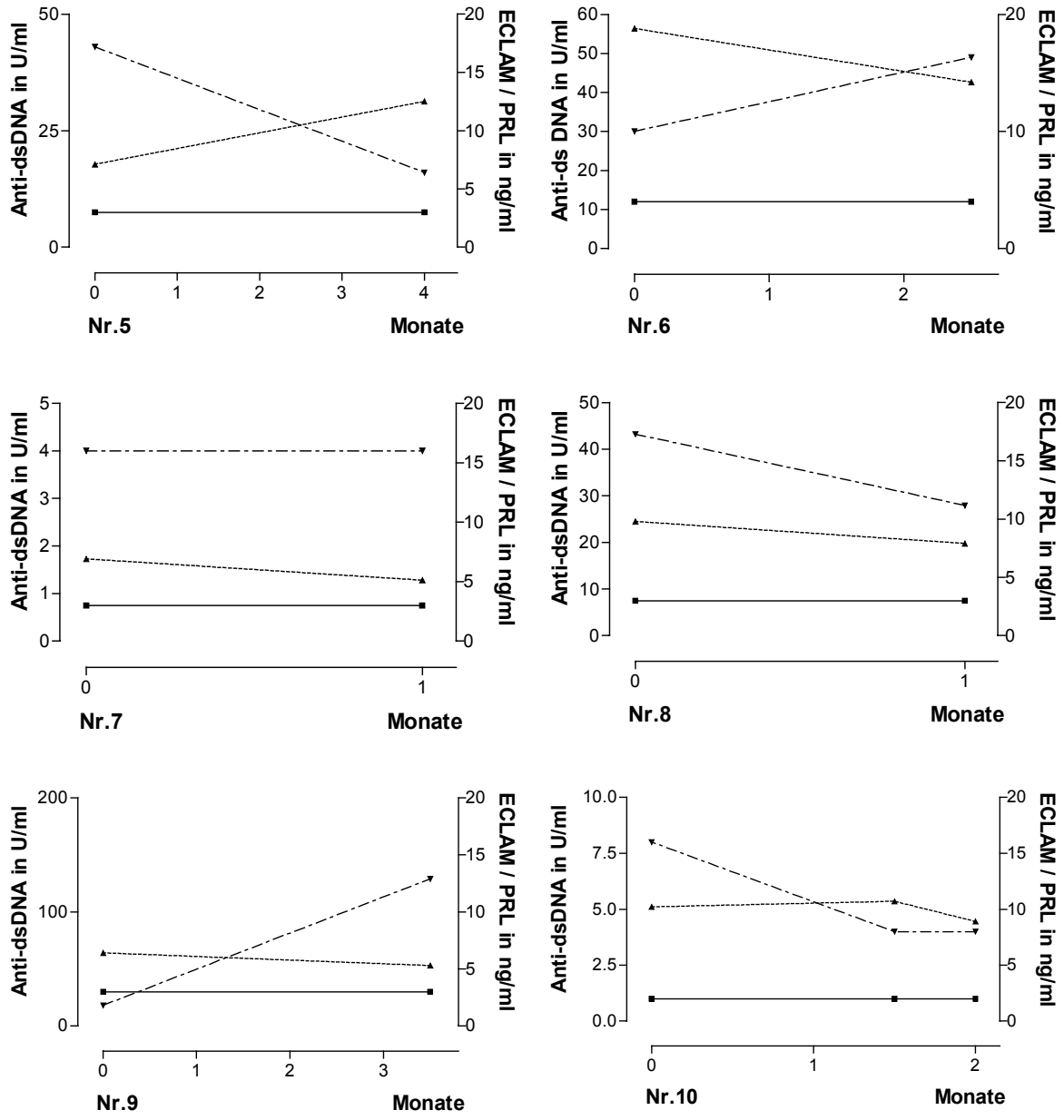


Abb. 16b: Verläufe der Anti-dsDNA-Antikörper (_._._), Serumprolaktinwerte (.....), und der Krankheitsaktivität (ECLAM: _____) von 10 SLE-Patienten mit konstanter Krankheitsaktivität

Der mittlere Krankheitsaktivitätsindex liegt bei diesen Patienten niedriger als bei den Patienten mit schwankender Krankheitsaktivität (ECLAM=2,86 (SD=1,46)). Ebenso verhält es sich mit dem Mittelwert der Serumprolaktinwerte (12,63ng/ml (SD=8,44)).

3.2.2 In-vitro-Effekte von Prolaktin auf PBMC

3.2.2.1 IgG-Produktion

Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der Stimulation von SLE- und normalen PBMC mit PRL dargestellt. Die IgG-Konzentration in den Zellkulturüberständen der SLE-PBMC war nach 7-tägiger Inkubation ohne Zusätze signifikant höher (Mittelwert=579,3ng/ml (SD=476,4)) als die der PBMC der Blutspender, welche unter der Nachweisgrenze (150ng/ml) lag (nicht-parametrischer U-Test nach Mann und Whitney, p<0,001). Nach Stimulation mit PRL in der noch physiologischen Konzentration von 20ng/ml kam es bei den SLE-PBMC zu einer Steigerung der IgG-Produktion (siehe Tab. 15, und Abb. 17). Die mittlere IgG-Konzentration der Zellkulturüberstände lag für diesen Fall mit 1084ng/ml (SD=601,3) signifikant höher als die im unstimulierten Zustand (Wilcoxon - Test; p=0,001). Nach Inkubation mit PRL in der unphysiologisch hohen Konzentration von 100ng/ml lag die mittlere IgG-Konzentration der Zellkulturüberstände der SLE-PBMC mit 982,5ng/ml (SD=615,2) zwar signifikant höher als im unstimulierten Zustand (Wicoxon - Test; p=0,002), war jedoch niedriger als nach Stimulation mit PRL in physiologischer Konzentration. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant (Wilcoxon-Test; p=0,042). Bei den PBMC der Gesunden kam es weder nach Stimulation mit PRL in der physiologischen noch in der unphysiologisch hohen Konzentration zur Steigerung der IgG-Produktion. Bis auf einen Fall lag die IgG-Konzentration der Zellüberstände stets unter der Nachweisgrenze. Ein Blutspender wies eine leichte Steigerung der IgG-Produktion nach Stimulation mit PRL auf (IgG-Konzentration=272 und 264ng/ml).

Tab. 15: mittlere IgG-Konzentrationen in den Zellüberständen von SLE-PBMC nach 7-tägiger Stimulation mit PRL und ohne Stimulation

	IgG in ng/ml					
	Unstimuliert		+ PRL (20 ng/ml)		+PRL (100 ng/ml)	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
SLE-Patienten	579,3	476,4	1084	601,3	982,5	615,2
Gesunde	150,0	0	165,5	43,84	164,3	40,31

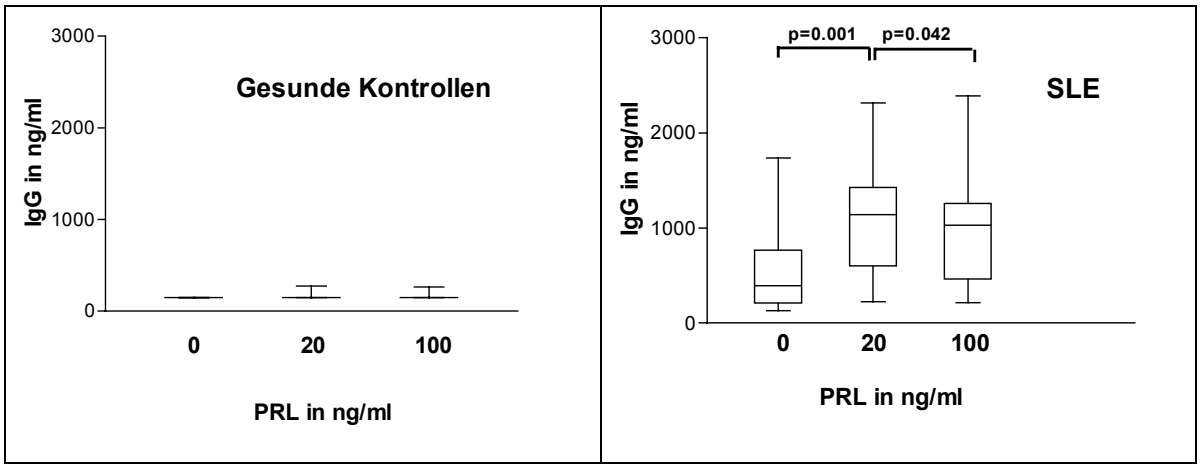


Abb. 17: IgG-Konzentration in den Zellüberständen von SLE-PBMC und normalen PBMC

(n=11) nach 7-tägiger Stimulation mit PRL in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (20 und 100ng/ml) und ohne Stimulation (0), mit Angabe SEM
Signifikante Unterschiede wurden beobachtet zwischen der IgG-Produktion der PBMC der gesunden Kontrollen und der SLE-PBMC (spontan und nach Stimulation mit PRL) (U-Test nach Mann und Whitney; p<0,001) sowie zwischen der spontanen IgG-Produktion der SLE-PBMC und der IgG-Produktion nach Stimulation mit PRL (20 und 100ng/ml) (Wilcoxon-Test, Bonferroni-Adjustierung: p=0,043).

3.2.2.1.1 Abhängigkeit der durch PRL stimulierbaren IgG-Produktion der SLE-PBMC vom Prolaktinwert der Patienten

Nach Einteilung der Patienten in eine Gruppe mit erhöhtem und eine weitere Gruppe mit normalem Prolaktinwert zum Zeitpunkt der Blutentnahme, läßt sich feststellen, daß die Mittelwerte der IgG-Konzentrationen (unstimuliert, nach Stimulation mit PRL in physiologischer und unphysiologisch hoher Konzentration) in der erstgenannten Gruppe höher liegen als in der zweiten (siehe Tab. 16). Aufgrund der geringen Patientenzahl der beiden betrachteten Gruppen (n=6 bzw. 5) sind jedoch keine signifikanten Unterschiede ersichtlich.

Zwischen dem PRL-Wert und der durch PRL stimulierbaren bzw. spontanen IgG-Produktion der PBMC besteht kein statistisch signifikanter Zusammenhang (r=0,5727 und p=0,0655 für c_{PRL}=20ng/ml; r=0,4182 und p=0,2006 für c_{PRL}=100ng/ml und r=0,0636 und p=0,8525 ohne Stimulation; nicht parametrischer Test nach Spearman).

Tab. 16: Abhängigkeit der durch PRL stimulierbaren IgG-Produktion vom PRL-Wert der Patienten

	Prolaktin erhöht	Prolaktin normal
n	6	5
MW-IgG (unstimuliert) in ng/ml (SD)	687,7 (550,8)	449,2 (386,7)
MW-IgG (PRL 20 ng/ml) in ng/ml (SD)	1375* (561,9)	734,7* (479,8)
MW-IgG (PRL 100 ng/ml) in ng/ml (SD)	1226 (668)	690,3 (438,8)

*p=0,0519 (U-Test nach Mann und Whitney)

3.2.2.1.2 Zusammenhang zwischen der durch PRL stimulierten IgG-Produktion der SLE-PBMC und der Krankheitsaktivität

Zwischen der Krankheitsaktivität der 11 untersuchten Patienten und der spontanen IgG-Produktion ihrer PBMC war kein statistisch signifikanter Zusammenhang festzustellen (nicht-parametrischer Test (Spearman); r=0,5208; p=0,1003). Im Gegensatz dazu, sind Krankheitsaktivität und die durch PRL stimulierbare IgG-Produktion der PBMC positiv korrelliert. Das trifft sowohl für den Fall der Stimulation mit PRL in physiologischer (r=0,6452; p=0,0368) als auch in erhöhter (r=0,6729; p=0,0277) Konzentration zu (siehe Abb. 18).

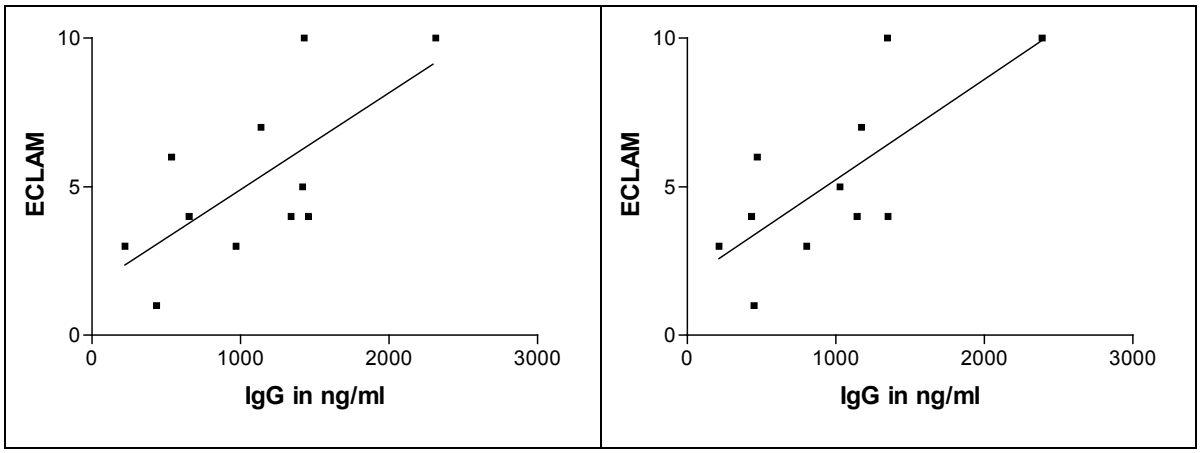


Abb. 18: Zusammenhang zwischen Krankheitsaktivität und der durch PRL stimulierbaren IgG-Produktion von SLE-PBMC

links: nach Stimulation mit Prolaktin in einer Konzentration von 20ng/ml
rechts: nachStimulation mit Prolaktin in einer Konzentration von 100ng/ml

3.2.2.1.3 Vergleich der verwendeten Prolaktine

Die folgende Betrachtung soll verdeutlichen, daß die gewonnenen Ergebnisse hinsichtlich der IgG-Konzentration der PBMC unabhängig vom verwendeten PRL und damit vergleichbar sind. Zwischen den mit PRL (Paesel+Lorei) und r-PRL (genzyme) gewonnenen Ergebnissen gibt es quantitativ keine Unterschiede. Die Mittelwerte für die IgG-Konzentration der Zellkulturüberstände der SLE-PBMC unterscheiden sich nicht wesentlich.

Tab. 17: Abhängigkeit der IgG-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen von dem zur Stimulation verwendeten PRL

	Immunglobulin G in ng/ml		
	unstimuliert	Stimuliert (PRL 20 ng/ml)	Stimuliert (PRL 100 ng/ml)
PRL (Paesel+Lorei) n=4	656 (312,4)	1033 (553,3)	969,5 (511,0)
r-PRL (genzyme) n=7	535,4 (568,7)	1113 (668,5)	989,9 (707,1)

Eine Stimulation der PBMC mit LPS in einer Konzentration, die der Endotoxinkonzentration des r-PRL, bei Stimulation in einer Konzentration von 100ng/ml, gleichkommt (2pg/ml), führte weder bei den Gesunden noch bei den SLE-Patienten zu einem Anstieg der IgG-Konzentration in den Zellkulturüberständen. Auch nach Einsatz von LPS in höherer Konzentration (10pg/ml) war die bestimmte IgG-Konzentration nicht bzw. nicht wesentlich höher als die der Zellüberstände unstimulierter PBMC. Das gilt sowohl für die SLE-PBMC als auch für die PBMC Gesunder.

3.2.2.2 Zytokin-Produktion

Der bei Stimulation unter Verwendung des PRL (Paesel+Lorei) nach 24-stündiger Inkubation aufgetretene Anstieg der Konzentration der Zytokine IL-6, IL-10, TNF-α und IL-1RA in den Zellkulturüberständen soll hier in seinem Ausmaß am Beispiel von drei gesunden Probanden dargestellt werden (Abb. 19). Ein ähnliches Ergebnis ergab sich für IL-1β. Die bei SLE-Patienten und Gesunden in gleich starkem Maße beobachtete konzentrationsabhängige Steigerung der Produktion dieser proinflammatorischen Zytokine nach Inkubation mit PRL, legte die

Vermutung einer Kontamination des Prolaktins durch Endotoxin nahe.

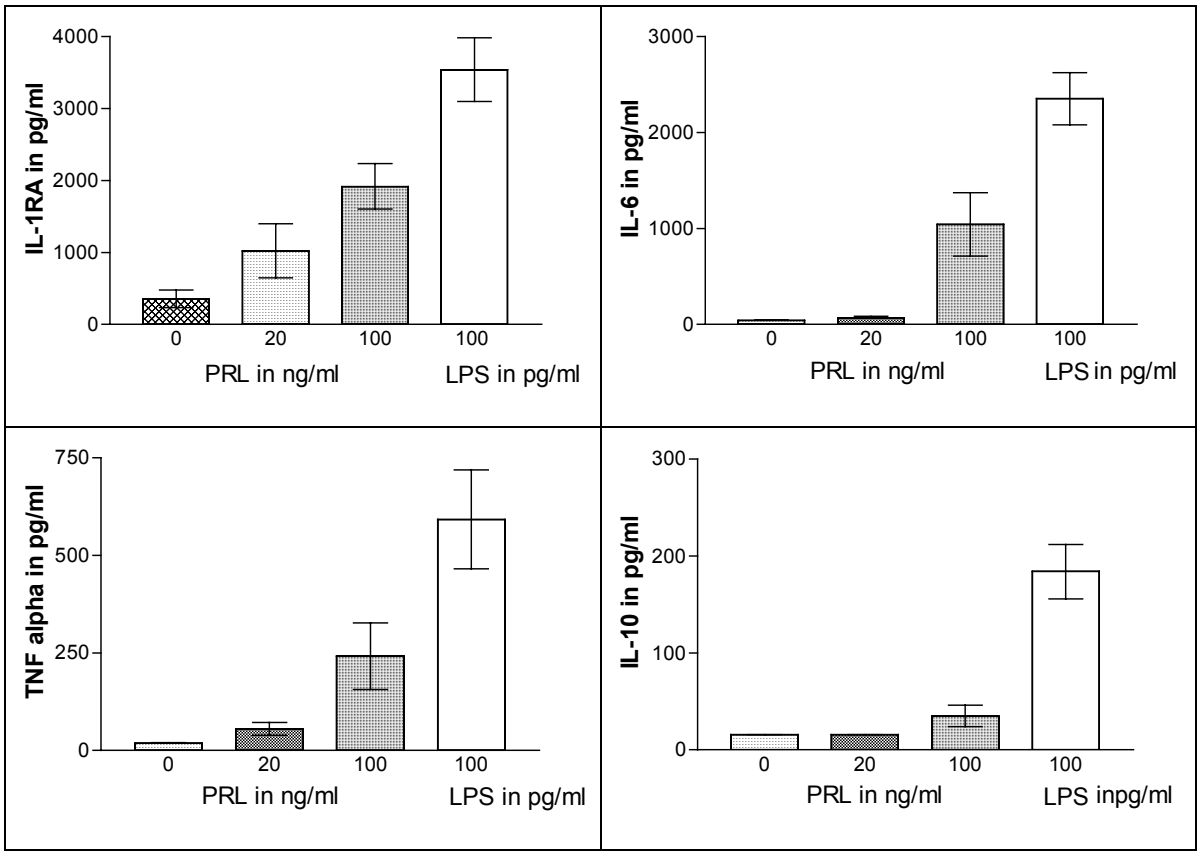


Abb. 19: Zytokinkonzentration in den Zellkulturüberständen von drei Gesunden nach 24-stündiger Inkubation mit PRL oder LPS

Am Beispiel von IL-6 wurde mit Hilfe von Anti-CD14-Antikörpern untersucht, ob die unter PRL-Inkubation aufgetretene Stimulation der Zytokinproduktion auf eine direkte Wirkung des Prolaktins über einen u. U. vorhandenen PRL-Rezeptor oder auf Endotoxin-Wirkung über den CD14-Rezeptor der Monozyten zurückzuführen ist. Die hier demonstrierte Stimulierbarkeit der IL-6-Produktion durch PRL konnte durch den Zusatz der Anti-CD14-Antikörper vollständig aufgehoben werden. Außerdem war sie unter Verwendung des r-PRL (genzyme) nicht reproduzierbar. Die IFN-γ- und IL-4-Konzentrationen in den Zellüberständen waren nach Stimulation mit PRL im Vergleich zum Ausgangszustand nicht erhöht.

3.2.3 Das Auftreten von Autoantikörpern und klinischen Befunden im Sinne einer Kollagenose bei Prolaktinompatienten

3.2.3.1 Autoantikörper bei Prolaktinompatienten

3.2.3.1.1 ANA

3.2.3.1.1.1 Häufigkeit von ANA und ANA-Muster

Im folgenden Abschnitt soll auf die Ergebnisse des fluoreszenzmikroskopischen ANA-Nachweises auf Hep-2-Zellen eingegangen werden. Es werden dabei eine Gruppe von Prolaktinompatienten und eine gleich große in Geschlechts- und Altersstruktur dem Patientenkollektiv entsprechende Kontrollgruppe verglichen. In der Gruppe der Prolaktinom-Patienten lag der Anteil der ANA-positiven Personen (59%) signifikant über dem in der aus Blutspendern bestehenden Vergleichsgruppe (18%) (χ^2-Test; p=0,0077, siehe Tab. 18).

Tab. 18: Anzahl (N) und Prozentsatz (%) der ANA-positiven Prolaktinompatienten und Gesunden

ANA-POSITIV	PATIENTEN	GESUNDE
N	23	7
%	59	18

Der höchste in der Gruppe der Gesunden gefundene ANA-Titer liegt bei 1:640. In der Gruppe der Prolaktinompatienten dagegen finden sich auch ANA-Titer, die deutlich darüber liegen (siehe Abb. 18). Betrachtet man die bei den Prolaktinom-Patienten auftretenden ANA-Muster im Vergleich zu den Mustern der Gesunden (siehe Tab19), so muß man folgendes feststellen:

1. Die Häufigkeit des Auftretens nukleolärer und homogen/dicht feingranulärer ANA-Muster ist in den beiden Gruppen vergleichbar
2. Feingranuläre ANA-Muster sind in der Patientengruppe signifikant häufiger vertreten als in der Gruppe der Blutspender (χ^2-Test; p=0,0039).

3. In der Gruppe der Prolaktinompatienten finden sich Fluoreszenzmuster, die in der Gruppe der Blutspender nicht vorkommen (zytoplasmatische und nukleäre Dots, siehe Abb.21)

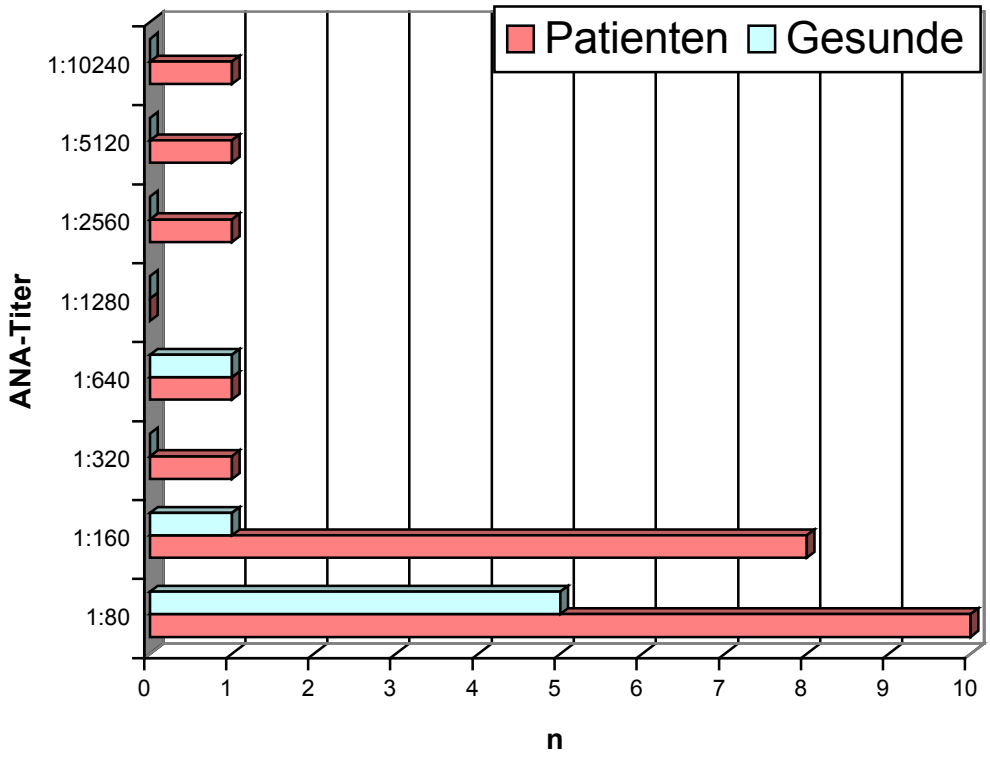


Abb.20: Höhe der bei Prolaktinompatienten und gesunden Kontrollen beobachteten ANA-Titer

Tab. 19: Unterschiede in der Verteilung der verschiedenen ANA-Muster bei Prolaktinompatienten und Gesunden

Fluoreszenz – Muster	Prolaktinom-patienten n=39	Gesunde N=39	p (χ2-Test)
nukleolär	4	5	ns
homogen/dicht feingranulär	5	2	ns
feingranulär	15	1	0,0039 **
zytoplasmatische dots	4	0	ns
nukleäre dots	2	0	ns

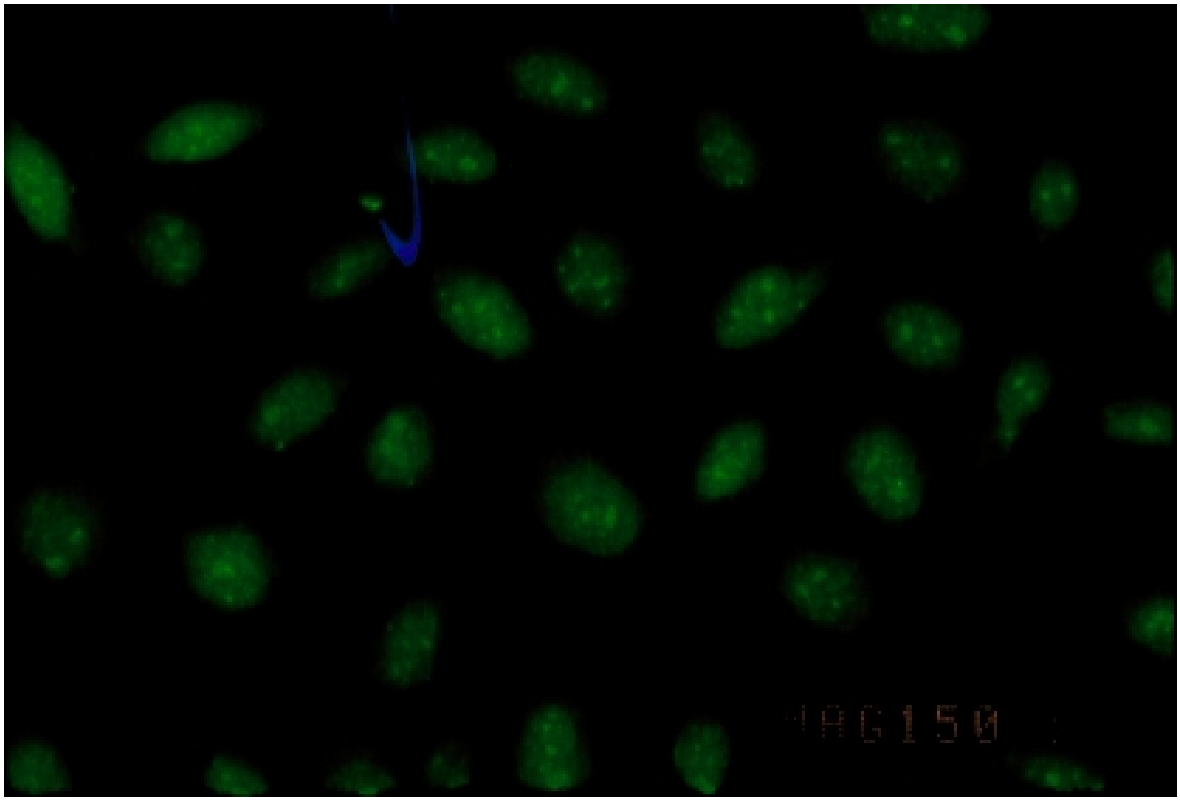


Abb. 21 Nukleoläres Immunfluoreszenzmuster mit vereinzelten zytoplasmatischen und nukleären dots (Prolaktinompatient, Serum 1:80 verdünnt)

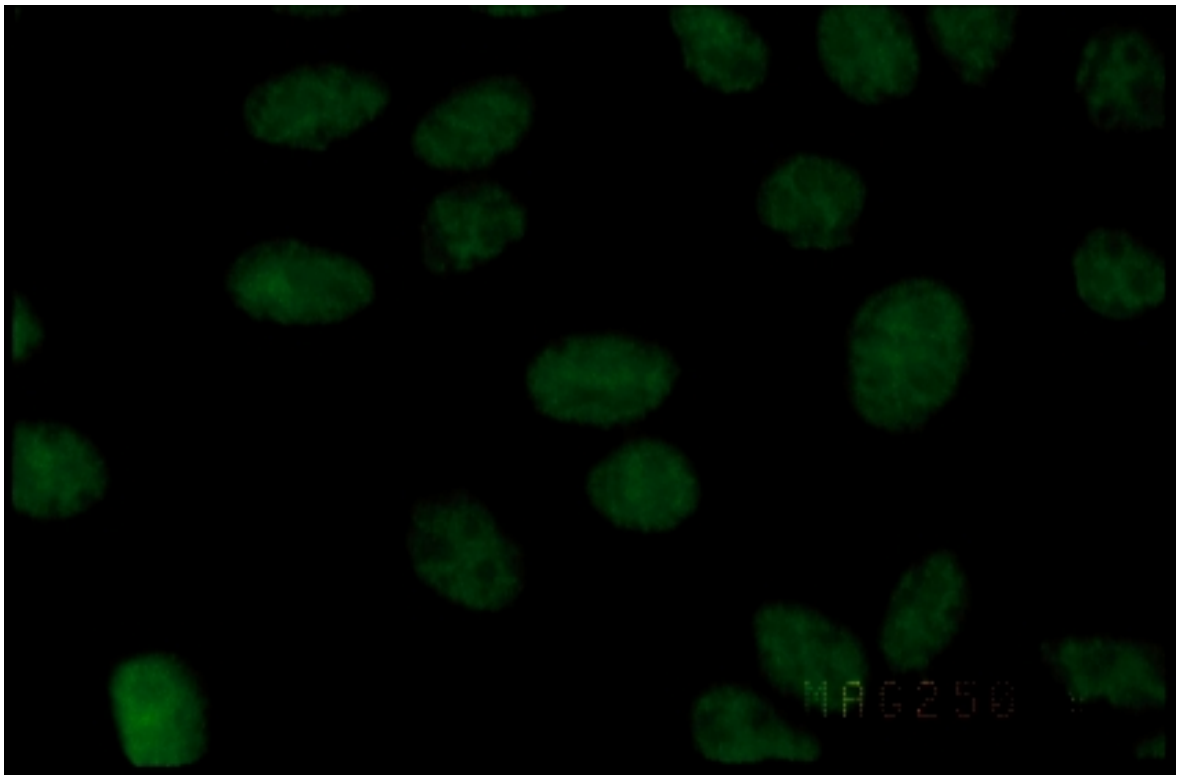


Abb. 22: Feingranuläres Immunfluoreszenzmuster (Prolaktinompatient, Serum 1:80 verdünnt)

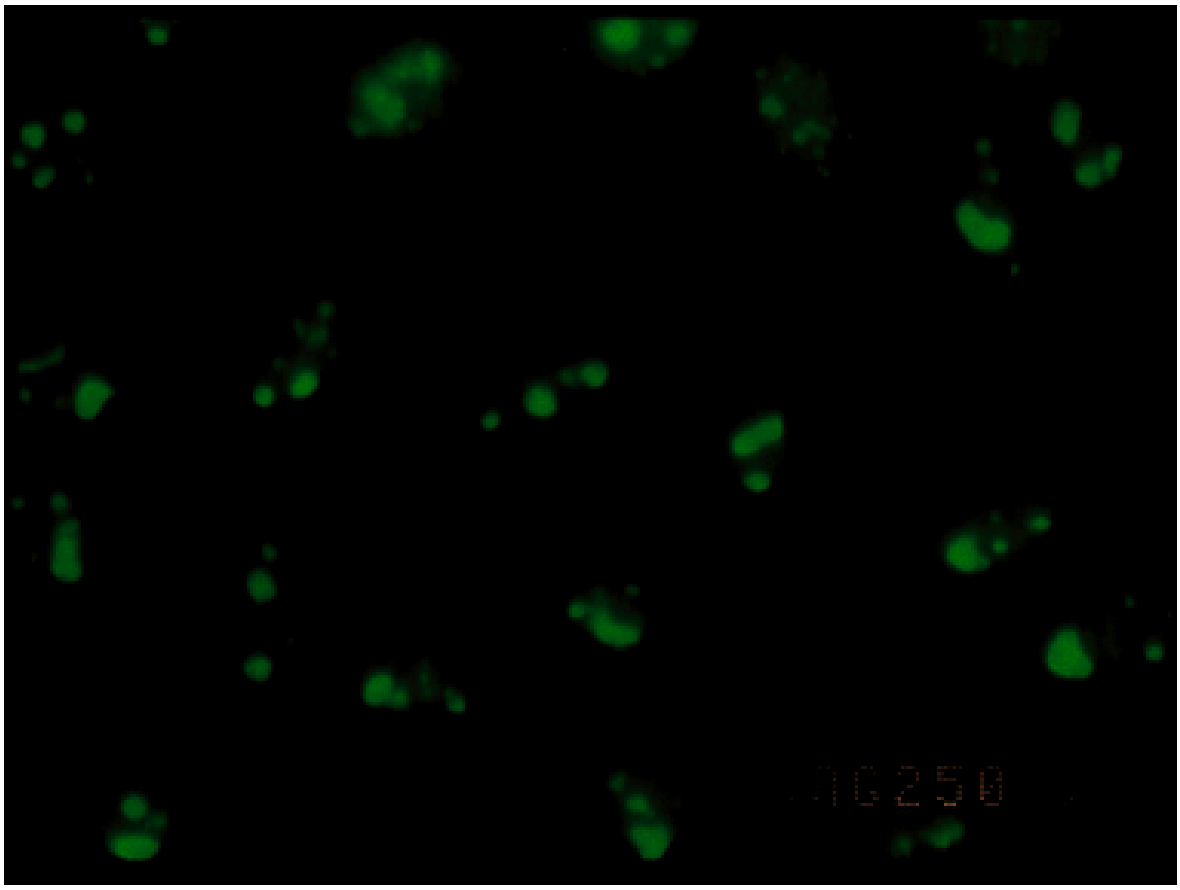


Abb. 23: Nukleoläres Immunfluoreszenzmuster (Prolaktinompatient, Serum 1:80 verdünnt)

3.2.3.1.1.2 Einfluß des Serumprolaktins auf die ANA

Die Häufigkeit des Auftretens antinukleärer Antikörper bei den Prolaktinompatienten ist nicht von der Höhe des Serumprolaktins zum Untersuchungszeitpunkt abhängig. Bei 11 der 21 (52%) Patienten mit erhöhtem PRL (>20ng/ml) und 12 der 18 (67%) Patienten mit normalem PRL ließen sich antinukleäre Antikörper finden. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant (χ^2-Test; p=0,9361). Ebenso unabhängig vom Prolaktinwert zum Untersuchungszeitpunkt ist die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen ANA-Muster bei den Prolaktinompatienten (siehe Tab. 20).

Tab. 20: Häufigkeit des Auftretens verschiedener ANA-Muster bei Prolaktinom-Patienten in Abhängigkeit vom Serumprolaktinwert zum Untersuchungszeitpunkt

Fluoreszenz – Muster	Patienten mit erhöhtem PRL n=21	Patienten mit normalem PRL n=18	P (χ^2-Test)
nukleolär	4	0	ns
homogen/dicht feingranulär	2	3	ns
feingranulär	6	9	ns
nukleäre dots	1	1	ns
zytoplasmatische dots	1	3	ns

3.2.3.1.1.3 Einfluß der Krankheitsdauer auf die ANA

Nach Ermittlung der Krankheitsdauer der Prolaktinompatienten (n=33) erfolgte eine Einteilung in zwei Gruppen. Patienten, bei denen eine Krankheitsdauer von 10 Jahren mit Sicherheit nicht erreicht ist (n=11), und Patienten, bei denen das Prolaktinom seit mindestens 10 Jahren bekannt ist (n=22), werden unterschieden. In der ersten Gruppe finden sich bei 6 Patienten (55%) antinukleärer Antikörper. In der zweiten Gruppe haben relativ mehr Patienten (n=16; 73%) antinukleäre Antikörper. Dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant (χ^2-Test; p=0,8957).

3.2.3.1.1.4 ANA-Differenzierung

Keiner der 20 mittels MOLT-4-Blot untersuchten Prolaktinompatienten bot ein positives Ergebnis.

3.2.3.1.2 Anti-dsDNA-Antikörper

Bis auf eine Patientin, liegen alle Prolaktinompatienten unter der Grenze des Normwertbereiches (-5,97U/ml) des ELISA zur Anti-dsDNA (IgG)-Bestimmung. Mit 8,5U/ml ist der Wert dieser Patientin allerdings nur leicht erhöht. Ihr Prolaktinwert ist mit 31,5ng/ml ebenfalls leicht erhöht.

3.2.4 Klinische Befunde im Sinne einer Kollagenose bei Prolaktinompatienten

Bei der Suche nach Hinweisen für das Vorliegen von Autoimmunerkrankungen im Zusammenhang mit der Hyperprolaktinämie fiel auf, daß sich zwei Patientinnen von allen anderen dadurch abhoben, daß ihre Anamnesen bezüglich dieser Hinweise positiv waren. Beide Fälle sollen in diesem Kapitel kurz geschildert werden.

Eine 31-jährige Patientin mit positiven ANA (1:10240, nukleoläres Muster) klagte zum Zeitpunkt der Diagnose ihres Prolaktinoms über seit ca. ½ Jahr bestehende, schmerzlose Schwellungen der Finger. Im weiteren Krankheitsverlauf zeigten sich, trotz der immer deutlich positiven ANA, keine weiteren klinischen Befunde im Sinne einer Kollagenose.

Anders verhielt es sich bei einer 51 jährigen Patientin mit positiven ANA (1:2560, feingranulär). Diese klagte im Verlauf ihrer Erkrankung über Arthralgien, rezidivierende Gelenkschwellungen unterschiedlicher Lokalisation und Schmerzen im LWS-Bereich. Eine außerdem bestehende Fotosensibilität, das positive Raynaud-Phänomen und eine wiederhohlt erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit ließen an eine Erkrankung des rheumatischen Formkreises denken. Es wurde festgestellt, daß die Patientin Antikörper gegen Ro und La hat. Der durchgeführte Schirmertest war pathologisch. Eine gezielte Befragung erbrachte, daß die Patientin unter Mund- und Augentrockenheit und wiederhohlt auftretenden entzündlichen Veränderungen der Augen litt. Es wurde ein Sjögren-Syndrom diagnostiziert. Der Befund der Lippenbiopsie bestätigte die Diagnose. Bei der Kapillarmikroskopie fanden sich vereinzelte Megakapillaren. Die Fotoplethysmographie ergab den Befund einer akralen Minderdurchblutung bei erhaltener vaskulärer Reserve. Hand- und Fußskelett wiesen röntgenologisch keine arthritischen Direktzeichen auf. Die Patientin berichtete zusätzlich über eine vor mehreren Jahren diagnostizierte Hashimoto-Thyreoiditis.

Bei den übrigen Prolaktinompatienten fanden sich keine Hinweise für das Vorliegen einer Kollagenose.

3.3 Diskussion

3.3.1 Verhalten der Serumprolaktinwerte bei SLE

3.3.1.1 Vergleich der Serumprolaktinwerte von SLE-Patienten und Gesunden

Exakt ein Drittel der 60 untersuchten SLE-Patienten hatte einen über dem Normwertbereich liegenden Serumprolaktinwert. Dieses Ergebnis stimmt mit dem verschiedener vorausgegangener Studien überein (180-185). Im Vergleich mit diesen ist der ermittelte Anteil von Patienten mit erhöhten PRL-Werten jedoch relativ hoch (33,3% vs. 9-35%). Auffällig ist der Unterschied zwischen den PRL-Werten der Patientinnen im gebärfähigen Alter auf der einen und der männlichen Patienten bzw. postmenopausalen Patientinnen auf der anderen Seite (20ng/ml vs. 12,6 bzw. 12,8ng/m). Die Frage nach der Ursache läßt hier zwei Vermutungen zu. Erstens kann dies auf unterschiedlich hohe Östrogenspiegel zurückgeführt werden (76, 77, 78, 80, 81). Zweitens kann nicht ausgeschlossen werden, daß die im Durchschnitt etwas höher liegende Krankheitsaktivität der Patientinnen im gebärfähigen Alter, unter der Voraussetzung der Annahme der Existenz einer positiven Korrelation zwischen Krankheitsaktivität und Serumprolaktin, dem zugrunde liegt. Die durchschnittlichen Prolaktinwerte der weiblichen und männlichen Blutspender unterscheiden sich nicht in dem Maße wie die weiblicher und männlicher SLE-Patienten (6,7 vs. 5,5). Da jedoch bei Gesunden eine vergleichbare hormonelle Konstellation zu vermuten ist, muß angezweifelt werden, daß sich der bei den Patienten festgestellte Unterschied allein auf den Östrogeneinfluß zurückführen läßt.

Auch in der Gruppe der Patienten mit anderen Kollagenosen als dem SLE lagen die Serumprolaktinwerte durchschnittlich höher als in der Gruppe der Blutspender. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen von *Gutiérrez, Kucharz und Picco* (175, 176, 177).

Bei der Suche nach möglichen Ursachen der Hyperprolaktinämie bei SLE-Patienten müssen in erster Linie zahlreiche physiologische und pathologische PRL-erhöhende Faktoren in Betracht gezogen werden. Um ein Überlappen verschiedener PRL-erhöhender Einflüsse auszuschließen, wurden in die Auswertung dieser Arbeit nur Patienten ohne erkennbare Ursachen für eine

Hyperprolaktinämie mit einbezogen. Die bei den SLE-Patienten beobachtete Hyperprolaktinämie ist somit als idiopathisch einzuordnen. Patienten mit Hypothyreose (erhöhtem TSH), terminaler Niereninsuffizienz oder schwangere Patientinnen wurden aus dem Patientenkollektiv ausgeschlossen. Ein weiteres Ausschlußkriterium war die Einnahme von Psychopharmaka, Cimetidin oder Metoclopramid. Das häufig von SLE-Patienten in niedriger Dosis eingenommene Ranitidin bzw. Kalziumantagonisten (Nifedipin) stellen, aufgrund der Erkenntnisse von *Müller* und *D'Armiento et al.* (194, 203), keine Ausschlußkriterien dar. Ebenfalls wurden Patienten mit Lupusnephritis, ohne das Vorliegen eines fortgeschrittenen Stadiums der Niereninsuffizienz (89), nicht von der Teilnahme ausgeschlossen. Drei Patienten, die hormonelle Kontrazeptiva einnahmen, wurden ebenso wie zwei weitere Patienten, die unter Therapie mit Clonidin bzw. Verapamil standen, in die Studie miteinbezogen, da das Serumprolaktin in diesen Fällen nicht erhöht war. Keiner der Patienten bot Hinweise für das Vorliegen eines Prolaktinoms.

Bei Einhalten dieser Vorraussetzungen, kann man davon ausgehen, daß bei den untersuchten SLE-Patienten weitere Ursachen für erhöhte Prolaktinwerte im Serum vorliegen müssen.

Zu diesen gehört möglicherweise die erhöhte Ausschüttung hypophysären Prolaktins durch eine erhöhte Zytokinkonzentration im Hypothalamus, wie sie z.B. im Falle einer zerebralen Manifestation des SLE zu erwarten wäre. *El-Graf et al.* berichteten über eine Assoziation zwischen Hyperprolaktinämie und ZNS-Manifestation in ihrem Kollektiv von SLE-Patienten (188.). In Übereinstimmung damit, berichteten *Jara et al.* (204) über eine intrathekale IL-6- und Prolaktin-Synthese bei SLE-Patienten mit zerebraler Manifestation. Es gibt Hinweise für einen die PRL-Sekretion begünstigenden Einfluß des IL-6 auf die Hypophysenzellen (92, 93). Bei SLE Patienten steht eine Störung des Regelkreises der PRL-Sekretion auf der Ebene von Hypothalamus und Hypophyse zur Diskussion. *Gutiérrez et al.* (205) stellten fest, daß unbehandelte aktive (SLEDAI: 5-25; mean: 12) SLE-Patienten neben einer Störung der HPA-Achse, mit verminderter Cortisolsekretion nach Hypoglykämie, auch eine Veränderung im Muster der PRL-Sekretion (nach TRH-Stimulation) aufwiesen. Obwohl sich der Zeitpunkt und die Höhe des PRL-Spitzenwertes bei Patienten und

Gesunden nicht unterschieden, lag die PRL-Sekretion der Patienten jedoch nach 60 und sogar nach 90 min noch höher als die der Gesunden. Dieser Unterschied war statistisch signifikant. Eine andere Gruppe (206) untersuchte SLE-Patienten mit im durchschnittlich niedrigerer Krankheitsaktivität (ECLAM: 0-3, mean:1,5) hinsichtlich ihrer PRL-Antwort nach TRH-Stimulation und nach Streß (Hypogykämie). In beiden Fällen konnte aber kein Unterschied zwischen der PRL-Sekretion von Patienten und Gesunden festgestellt werden. Die Stimulation der hypophysären PRL-Sekretion durch zirkulierende, in ihrer Konzentration von der Krankheitsaktivität abhängige Zytokine kann als mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse dieser beiden Untersuchungen herangezogen werden (92, 93).

Desweiteren wäre auch eine erhöhte Produktion von Prolaktin in der Peripherie durch Zellen des Immunsystems vorstellbar. So ist es denkbar, daß primär autokrin bzw. parakrin wirksames PRL, das im Rahmen eines lokalisierten Entzündungsprozesses von Lymphozyten sezerniert wird, in den Blutkreislauf gelangt und unter Umständen sogar endokrin wirksam werden kann. *Montgomery et al.* berichteten über ein von humanen Lymphozyten sezerniertes PRL-ähnliches Protein (207). *Larrea et al.* wiesen nach, daß SLE-PBMC nach Con-A-Stimulation aber auch spontan mehr PRL (60kDa) produzieren als normale PBMC (133). Auch *Gutiérrez et al.* konnten zeigen, daß die spontane PRL-Produktion der SLE-PBMC (11, 24-27kDa) signifikant über der normaler PBMC lag. Ebenfalls nach Stimulation mit PHA und PWM produzierten SLE-PBMC mehr PRL als normale. Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (134). *Miranda et al.* untersuchten Serum- und Urin-Prolaktin-Werte von Patienten mit Lupusnephritis und kamen zu dem Schluß, daß neben dem Serum-Kreatinin, der Albuminausscheidung/24h und dem Komplementverbrauch, die Prolaktinkonzentration im Urin als bedeutender prognostischer Parameter einzuordnen ist. Sie formulierten die Vermutung, daß die in der Niere am Entzündungsprozeß beteiligten Lymphozyten das im Urin erscheinende PRL produzieren, welches möglicherweise den lokalen Entzündungsprozeß gemeinsam mit anderen Botenstoffen unterhält (189). Die aufgeführten Untersuchungen legen die Möglichkeit nahe, daß ein Teil des bei den SLE-Patienten bestimmten Serumprolaktins lymphozytären Ursprunges sein könnte.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Hyperprolaktinämie der SLE-Patienten sind Antikörper gegen PRL. Diese binden PRL und verhindern auf diesem Wege eine suffiziente Rückkopplung im Regelkreis. *Hattori et al.* fanden bei 16% der von ihnen untersuchten Patienten mit idiopathischer Hyperprolaktinämie Autoantikörper gegen Prolaktin (62). Nachdem eine positive Korrelation zwischen der Serumprolaktin- und der Anti-PRL-Antikörperkonzentration nachgewiesen werden konnte (66), lag die Vermutung nahe, daß die Antikörper die Ursache der Hyperprolaktinämie sein könnten. Durch das hohe Molekulargewicht ist es dem PRL-AB-Komplex nicht möglich, zum Hypothalamus vorzudringen und dort das negative Feed-Back in Hinblick auf die hypophysäre PRL-Sekretion auszulösen. Im Vergleich zu *Hattori* wiesen *Leanos et al.* (208) nach, daß 40,7% ihrer untersuchten SLE-Patienten mit idiopathischer Hyperprolaktinämie Antikörper gegen Prolaktin hatten. Erklärt werden kann dieser verhältnismäßig hohe Anteil möglicherweise durch die Neigung der SLE-Patienten, eine Vielfalt verschiedener Autoantikörper zu produzieren. Es gibt zwei denkbare Mechanismen, durch welche Anti-PRL-Antikörper das Serumprolaktin erhöhen können. Einerseits ist das bereits erwähnte Versagen des Feed-Back-Mechanismus auf der Ebene des Hypothalamus anzuführen. Andererseits muß an eine Retention der PRL-AB-Komplexe im Blutkreislauf.gedacht werden. Die herabgesetzten renalen Clearance des antikörpergebundenen Prolaktins, im Vergleich zur Clearance des freien Prolaktins, kann als Ursache dafür betrachtet werden.

3.3.1.2 Zusammenhang zwischen dem Serumprolaktin und der Krankheitsaktivität bei SLE

Zur Frage, nach einem Zusammenhang zwischen dem Serumprolaktin eines SLE-Patienten und seiner Krankheitsaktivität, gibt es unterschiedliche Ansichten. Die meisten Autoren lehnen jedoch die Existenz eines solchen Zusammenhanges ab (180, 181, 184, 185). Das Ergebnis dieser Arbeit bestätigt eindeutig das Vorhandensein einer positiven Korrelation zwischen den PRL-Werten und der klinischen und serologischen Krankheitsaktivität und stimmt somit mit den Ergebnissen von *Jara* und *Neidhart* überein (183, 179). Patienten mit einer Krankheitsaktivität von ECLAM<4 hatten niedrigere PRL-Werte (MW=12,82ng/ml)

als die mit höherer Aktivität (MW=22,06ng/ml). Die Gruppe der Patienten mit über dem Normwertbereich liegenden PRL-Werten hatten im Durchschnitt einen höheren ECLAM-Score (MW=6,8) als die Patienten mit normalen PRL-Werten (MW=3,8). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit dem Verhalten der Autoantikörper der SLE-Patienten in dieser Untersuchung. Sowohl für die Anti-dsDNA-Antikörper als auch für die Anti-Cardiolipin-Antikörper vom IgG-Typ konnte aufgezeigt werden, daß ihre Konzentration im Patienten-Serum positiv mit der des Serumprolaktins korreliert. Allerdings konnte eine solche Korrelation für die Anti-Cardiolipin-Antikörper vom IgM-Typ und auch für die Konzentration der zirkulierenden Immunkomplexe nicht nachgewiesen werden. *Neidhart et al.* haben bereits über einen Zusammenhang zwischen Anti-dsDNA-Antikörpern und Anti-Cardiolipin-Antikörpern (IgG) und Prolaktinwerten bei SLE- Patienten berichtet (183). Einen weiteren Rückschluß auf den Zusammenhang zwischen Krankheitsaktivität und PRL-Wert läßt die Betrachtung der Therapie der SLE-Patienten zu. So haben Patienten ohne oder mit wenig intensiver SLE-Therapie (Azathioprin) im Durchschnitt niedrigere Serumprolaktinwerte (MW=11,4 und 15,6ng/ml) als Patienten mit intensiveren Therapie-Formen, wie Glukokortikoid- (besonders nach Applikation als Prednison-Stoß-Therapie) oder der Kombinationstherapie von Glukokortikoiden und Cyclophosphamid (MW=18,5; 21,8 und 24,4ng/ml). Ähnliches konnten *Rovenský et al.* in dem von ihnen untersuchten Patientenkollektiv feststellen (209). Eine Steigerung der hypophysären PRL-Sekretion durch Glukokortikoide beim Menschen ist nicht bekannt. Im Gegenteil, einige Autoren wiesen supprimierende Effekte der Glukokortikoide an den Hypophysenzellen hinsichtlich der PRL-Sekretion nach. Diesem Mechanismus soll eine Beeinflussung des Prolaktin-Promotors Pit –1 zugrunde liegen (210).

Als Ursache für diese widersprüchlichen Ergebnisse kommen in erster Linie die Anti-PRL-Autoantikörper (PRL-AB), die bei einem großen Teil der Lupuspatienten nachzuweisen sind (208), in Frage. *Leanos et al.* stellten fest, daß Lupuspatienten mit idiopathischer Hyperprolaktinämie und Anti-PRL-Antikörpern eine niedrigere Krankheitsaktivität aufwiesen als die entsprechenden Patienten ohne diese Antikörper. Die biologische Aktivität des Antikörper-gebundenen Prolaktins ist nicht geringer als die der ungebundenen 23 kDa-Form (siehe Tab. 1). Es kann

jedoch aufgrund des hohen Molekulargewichtes nicht ungehindert bis zum Zielgewebe vordringen. Die Wirkung in vivo ist demnach herabgesetzt.

Es muß außerdem beachtet werden, daß Anti-PRL-Antikörper einen Einfluß auf das Ergebnis der unterschiedlichen Methoden der PRL-Bestimmung im Serum haben können (58). So zeigten *Hattori et al.*, daß durch verschiedene RIAs nur etwa 40–52% des im Serum enthaltenen Prolaktins von 10 hyperprolaktinämischen Patienten mit PRL-Antikörpern registriert wurden. Im Gegensatz dazu, konnte durch einen IRMA das gesamte, im Serum enthaltene Prolaktin erkannt werden. Möglicherweise wurden in den vorausgegangenen Untersuchungen des Zusammenhangs zwischen Serumprolaktinwert und Krankheitsaktivität der SLE-Patienten unterschiedliche Methoden der Prolaktinbestimmung verwendet. Dies könnte eine von vielen möglichen Erklärungen für die unterschiedlichen Ergebnisse sein.

Bei unseren Untersuchungen kamen ein nach dem Sandwich-Prinzip arbeitender ELISA und ein IRMA zum Einsatz. Da beiden Methoden ein vergleichbares Prinzip zugrunde liegt (siehe Abb. 7), muß angenommen werden, daß auch an Antikörper gebundenes Prolaktin bei der Bestimmung erkannt wurde.

Zusätzlich müssen auch Unterschiede der Alters- und Geschlechtszusammensetzung der Gruppen berücksichtigt werden. Es ist nicht auszuschließen, daß dem PRL, in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Vorraussetzungen der einzelnen Patienten, eine mehr oder weniger große Bedeutung im Sinne einer möglichen Einflußnahme auf die Krankheitsaktivität zukommt. Außerdem unterscheiden sich die Untersuchungen durch eine unterschiedlich hohe Teilnehmerzahl. Durch das Vermeiden PRL-erhöhender Umstände, wie Medikamenteneinnahme (siehe Tab. 3), Mahlzeiten, Streß, Niereninsuffizienz (Krea>2mg/dl), Hypothyreose oder Schwangerschaft und die Durchführung der Blutentnahmen am Vormittag, wurde das Vorliegen weiterer Faktoren, die ein unterschiedliches Ergebnis bedingen könnten, vermieden.

Bei den bisherigen Untersuchungen handelt es sich um Momentaufnahmen des Prolaktinwerts, der Anti-dsDNA-Antikörper-Konzentration oder der klinischen Krankheitsaktivität der SLE-Patienten. Bei der Untersuchung dieser Parameter im Verlauf konnte bei den Patienten mit langjähriger SLE-Erkrankung und über den

Untersuchungszeitraum schwankender Krankheitsaktivität eine gleichsinnige Veränderung der erwähnten Parameter festgestellt werden. Bei einem Patienten mit Erstmanifestation stieg jedoch das Prolaktin erst 6 Monate nach dem Auftreten erster Symptome an. Dies verdeutlicht die Abhängigkeit der Ergebnisse dieser und anderer Untersuchungen von der Wahl des Untersuchungszeitpunktes. In der Gruppe der SLE-Patienten, bei denen es über den Untersuchungszeitraum nicht zu einer Änderung des Krankheitsaktivitätsindexes kam, fand sich in der Mehrzal der Fälle (7 von 10) auch keine wesentliche Schwankung des Serumprolaktins (>2,5ng/ml). In dieser Gruppe war zudem kein gleichsinniges Verhalten von PRL- und Anti-dsDNA-Antikörper-Konzentration der Patientenseren festzustellen. Die Mittelwerte der Prolaktin- und Anti-dsDNA-Antikörper-Konzentration und des ECLAM-Scores lagen in dieser Gruppe niedriger als bei den Patienten, die Schwankungen der Krankheitsaktivität über den Untersuchungszeitraum boten. Dies verdeutlicht die Bedeutung der Auswahlkriterien der Patienten für Verlaufsuntersuchungen. Patienten mit hoher und schwankender Krankheitsaktivität und mehrjährigem Krankheitsverlauf, scheinen für die Untersuchung der hier diskutierten Frage besonders geeignet zu sein. Hinzugefügt werden sollte an dieser Stelle, daß die Anzahl der im Verlauf untersuchten Fälle zu gering ist, um formulieren zu können, daß PRL ein Parameter ist, der die Krankheitsaktivität der SLE-Patienten zuverlässig widerspiegelt. In jedem Fall untermauert das Ergebnis der Verlaufsuntersuchungen jedoch die bei der Betrachtung der Gesamtheit aller SLE-Patienten gewonnene Erkenntnis. Prolaktinwert und Krankheitsaktivität der SLE-Patienten sind positiv korreliert.

Es wird die Frage nach dem zeitlichen Zusammenhang zwischen der Entwicklung einer Hyperprolaktinämie und der Manifestation des SLE und nach den Konsequenzen erhöhter Serumprolaktinwerte für den Krankheitsverlauf aufgeworfen. Zu deren Beantwortung ist die Durchführung weiterer Verlaufsbeobachtungen, insbesondere die verstärkte Untersuchung von Patienten mit Neumanifestationen des SLE, nötig.

3.3.1.3 Assoziation der Hyperprolaktinämie mit bestimmten Manifestationen des SLE

Für einen Zusammenhang zwischen den Serumprolaktinwerten und dem Auftreten verschiedener klinischer Krankheitsmanifestationen und pathologischer Veränderungen der Laborparameter bei SLE-Patienten und Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen gibt es in der Literatur zahlreiche Hinweise. *Miranda et al.* stellten bei Patienten mit Lupusnephritis nicht nur erhöhte Serumprolaktinwerte, sondern auch eine zum Krankheitsverlauf parallel verlaufende Erhöhung der Prolaktinkonzentration im Urin fest (189). Anti-dsDNA-positive Patienten waren häufiger hyperprolaktinämisch als Anti-dsDNA-negative Patienten. *El-Graf et al.* berichten über eine Assoziation von erhöhten Serum-PRL-Werten und ZNS-Manifestation des SLE. Sie konnten außerdem eine positive Korrelation zwischen Prolaktinwert und BSG und eine inverse Korrelation zwischen Prolaktinkonzentration und Leukozyten- sowie Lymphozytenzahl bei ihren Patienten nachweisen (188.). *Neidhart et al.* zeigten ebenfalls die negative Korrelation von Leukozytenzahl und Erythrozytenzahl und dem Serumprolaktin und eine positive Korrelation von Serumprolaktin-, Anti-dsDNA-Antikörper- und anti-Cardiolipin-Antikörperkonzentration (beide Antikörper vom IgG-Typ) bei SLE-Patienten (183). Bei dieser Untersuchung fiel auf, daß SLE-Patienten mit allgemeinen Krankheitszeichen (Fieber, Müdigkeit), renalen Manifestationen (insbesondere bei gleichzeitigem Vorhandensein von Hämaturie, Proteinurie und Verminderung der Kreatininclearance bzw. Erhöhung der Retentionsparameter), Anämie, erhöhter BSG und C3-Verminderung signifikant höhere PRL-Werte hatten als Patienten ohne diese Manifestationen. Das Vorliegen einer zerebralen Manifestation des SLE war bei dieser Untersuchung nicht mit einer Hyperprolaktinämie assoziiert.

3.3.2 In-vitro-Effekte von Prolaktin auf PBMC

3.3.2.1 IgG-Produktion

Die spontane IgG-Produktion der SLE-PBMC, welche unabhängig von der Krankheitsaktivität und dem Serumprolaktin der Patienten war, ließ sich durch

Prolaktin in physiologischer Konzentration (20ng/ml) steigern. Bei Einsatz von Prolaktin in einer Konzentration von 100ng/ml konnte die IgG-Produktion im Vergleich zum Ausgangszustand zwar ebenfalls gesteigert werden, das Ergebnis war jedoch nur suboptimal. Die durch Prolaktin-Stimulation erreichbare IgG-Produktionssteigerung der SLE-PBMC war zudem von der Krankheitsaktivität der Patienten abhängig. Die PBMC der Patienten mit höherer Krankheitsaktivität waren am besten durch Prolaktin stimulierbar. Die normalen PBMC produzierten sowohl spontan als auch nach Stimulation mit Prolaktin keine meßbaren IgG-Mengen.

Diese Ergebnisse bestätigen vorangegangene Untersuchungen von *Lahat et al.* (141) und *Gutiérrez et al.* (148), welche über die Eigenschaft des Prolaktins, die Immunglobulinproduktion von mit Anti-IgM und IL-2 inkubierten B-Zellen und von SLE-PBMC zu stimulieren, Aufschluß gaben. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Stimulierbarkeit der PBMC von Patienten mit SLE hinsichtlich ihrer IgG-Produktion durch Prolaktin in physiologischer Konzentration wurde bisher jedoch nicht beschrieben.

Abweichend von den vorangegangenen Untersuchungen, war in dieser die IgG-Produktion der normalen PBMC nicht durch Prolaktin stimulierbar. Dies liegt möglicherweise an der gewählten PRL-Konzentration. *Gutiérrez et al.* konnten einen stimulierenden Effekt des Prolaktins auf normale PBMC nachweisen. Sie berichteten sogar über eine bessere Stimulierbarkeit der IgG- und IgM-Produktion bei normalen PBMC im Vergleich zu SLE-PBMC. Diese war biphasisch, bei einer PRL-Konzentration von 10^{-7} und 10^{-4}M zu beobachten. Ob diese Konzentrationen den in dieser Untersuchung gewählten PRL-Konzentrationen nahekommen, läßt sich nicht eindeutig sagen, da PRL, wie in Tab. 1 erläutert, eine heterogene Substanz ist, für die kein einheitliches Molekulargewicht angegeben werden kann. Nur bei Annahme eines Molekulargewichtes von 23kDa an, läßt sich ermitteln, daß die von *Gutiérrez* angegebene Konzentration zwischen 400ng/ml und 400µg/ml liegt. Als Begründung für ihr Ergebnis führten *Gutiérrez et al.* die bei SLE-Patienten bestehende Fehlfunktion der B-Zellen an.

Das Ergebnis dieser Untersuchung spricht dafür, daß für die überschießende IgG-Produktion der PBMC von SLE-Patienten nicht allein Prolaktin verantwortlich sein

kann, sondern ein zusätzlicher Defekt der Zellen an sich bzw. ihrer Interaktion eine Rolle spielen muß. Prolaktin kann also den Vorgang der Immunglobulinproduktion nicht initiieren, wohl aber unterhalten oder verstärken. Hinzu kommt, daß das Prolaktin diesen Effekt in seiner physiologischen Konzentration zeigt. Das spricht für das Dimerisationsmodell des Prolaktin-Rezeptors. Ligandenüberschuß führt zur Verhinderung der Rezeptordimerisation (siehe Abb. 6). SLE-Patienten mit PRL-Werten, die im oberen oder leicht oberhalb des Normbereiches liegen, weisen nach diesem Ergebnis also optimale Bedingungen für die Immunglobulin-Produktion in vivo auf. Möglicherweise ist dies eine Erklärung für den therapeutischen Nutzen der BRC-Behandlung bei normoprolaktinämischen SLE-Patienten (191). Die durch PRL-Stimulation erreichbare IgG-Produktion hängt von der Krankheitsaktivität der Patienten ab. Dies könnte bedeuteten, daß die Rolle, die dem Prolaktin bei der Verstärkung der beim SLE ablaufenden pathologischen Prozesse zukommt, ganz wesentlich von der Aktivität der Erkrankung abhängt. Inwieweit PRL jedoch an dieser bereits Anteil hat, ist schwer einzuschätzen. Deutlich wird jedoch, daß PRL-Werte im unteren Normwertbereich bei SLE-Patienten erstrebenswert sind.

Das Ergebnis eröffnet die Frage nach der Ursache des beobachteten Unterschiedes in der IgG-Produktion der PBMC gesunder Probanden und der SLE-PBMC. Eine mögliche Erklärung wäre eine bessere Ansprechbarkeit der SLE-PBMC auf Prolaktin. Eventuell haben diese durch ihre in vivo Aktivierung eine erhöhte Anzahl von Prolaktinrezeptoren exprimiert, oder sie haben, ähnlich den CLL-B-Zellen, die Fähigkeit mit Hilfe besonderer Rezeptoren und Signaltransduktionswege, auf durch PRL-IgG-Komplexen übermittelte Signale (gleichzeitige Aktivierung von Fc- und PRL-R nötig (64)) reagieren zu können. Denkbar ist ebenfalls der Eingriff des Prolaktins in die Vorgänge der Apoptose der SLE-PBMC über das Hochregulieren des Anti-Apoptose-Proteins Bcl-2. Auf diesem Weg könnte die Apoptose Autoantikörper-produzierender SLE-Plasmazellen durch Prolaktin verhindert werden. Diese antiapoptotische Wirkung des Prolaktins ist in der Literatur bereits für verschiedene Nb2-Lymphomzellinien beschrieben (211, 212). Von Interesse wäre die Frage, ob SLE-PBMC unter den in dieser Untersuchung gewählten Bedingungen (c_{PRL}=20ng/ml) vermehrt Bcl-2 exprimieren.

3.3.2.2 Zytokin-Produktion

Die bei den SLE-Patienten und Gesunden nach Stimulation mit Prolaktin aufgetretene, dosisabhängige Erhöhung der Zytokinkonzentration in den Zellüberständen sind, nach den hier durchgeführten Untersuchungen, nicht auf den Effekt des Prolaktins, sondern wahrscheinlich auf Verunreinigungen dieser Substanz zurückzuführen. Eine Erhöhung der proinflammatorisch wirksamen Zytokine (IL-1β, TNF-α, IL-6) sowie von IL-10 und IL-1RA konnte nach Stimulation mit Prolaktin nachgewiesen werden. Dies machte die Unterscheidung eines möglicherweise durch PRL ausgelösten Effektes von einem durch eine Endotoxinkontamination der verwendeten Substanz verursachten Anstieg der Zytokinproduktion notwendig. Am Beispiel des Zytokins IL-6 wurden deshalb weitere Untersuchungen durchgeführt. Durch den Zusatz von Anti-CD14-Antikörper zu den mit PRL stimulierten PBMC war der oben beschriebene Effekt vollständig aufhebbar. Außerdem war er nach dem Wechsel des zur Stimulation verwendeten Prolaktins nicht reproduzierbar. Auch die quantitative Endotoxin-Bestimmung ergab eine Kontamination. Diese Ergebnisse zeigen, daß PRL unter den gewählten Bedingungen wahrscheinlich keinen Einfluß auf die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine (IL-1β, IL-6 und TNF-α) hat. Auf den Einsatz von Anti-PRL-Antikörpern zum Nachweis einer möglichen Antagonisierbarkeit der anfänglich beobachteten Zytokinproduktion wurde hier verzichtet, da unklar ist, ob nicht möglicherweise eine Ansprechbarkeit der Monozyten auf PRL-/Anti-PRL-Komplexe hinsichtlich der Aktivierung zur Zytokinproduktion besteht. Prolaktin zeigte, unter den hier gewählten Versuchsbedingungen, ebenfalls keinen verstärkenden Effekt hinsichtlich der Produktion der T-Zell-Zytokine IL-4 und IFN-γ.

In der Literatur gibt es Hinweise für eine Einflußnahme des Prolaktins auf das Muster der sezernierten Zytokine einzelner Zellen des Immunsystems. Zur Diskussion steht die Bedeutung dieses Aspektes hinsichtlich der Rolle des Prolaktins für den Verlauf von Autoimmunerkrankungen (149, 152, 192). Es mangelt bisher jedoch an Untersuchungen zu diesem Thema. Der in vivo Langzeiteffekt des Prolaktins wurde anhand eines Prolaktinompatienten-Kollektivs von *Clodi et al.* untersucht (213). Dies erfolgte vor und nach Beginn der BRC-

Therapie. Die Serumzytokinwerte (IL-1, 6, IFNγ, TNFα) unterschieden sich zu diesen beiden Zeitpunkten nicht. Es liegen bisher keine in vitro-Studien zum Effekt des PRL auf die Zytokinsekretion von normalen oder SLE-PBMC vor. Als Problem der in vitro-Untersuchungen stellt sich die klare Trennung des PRL-Effektes von den durch mögliche Endotoxinverunreinigungen bedingten Effekten dar. Die Rolle des Prolaktins in Hinblick auf die Beeinflussung des Zytokinmusters ist unklar. Aufgrund der Bedeutung der Überexpression verschiedener Zytokine, wie z.B. IL-6 oder IL-10, für die Pathogenese des SLE, ist ihre Klärung jedoch von großem Wert.

Betrachtet man das Ergebnis der in-vitro-Untersuchung der IgG- und der Zytokinproduktion unter PRL-Einfluß, läßt sich schlußfolgern, daß die durch PRL erreichte Steigerung der IgG-Produktion der SLE-PBMC nicht auf den indirekten Effekt einiger Zytokine (IL-6, IL-10), sondern wahrscheinlich auf den direkten Einfluß des PRL auf die PBMC zurückzuführen ist.

Weiterhin kann ein Zusammenhang zwischen der durch PRL in physiologischer Konzentration ausgelösten Steigerung der IgG-Produktion der SLE-PBMC und der Endotoxinkontamination eines der verwendeten Prolaktine weitgehend ausgeschlossen werden, denn die Ergebnisse waren unabhängig vom verwendeten PRL. Desweiteren ließ sich durch den Einsatz einer dem Endotoxingehalt des verwendeten Prolaktins entsprechenden LPS-Konzentration (c=2pg/ml) kein vergleichbares Ergebnis erzielen.

3.3.3 Das Auftreten von Autoantikörpern und klinischen Befunden im Sinne einer Kollagenose bei Prolaktinompatienten

Der Prolaktinompatient stellt ein gut geeignetes Studienobjekt zur Klärung der Frage des Einflusses einer langzeitig erhöhten Serumprolaktinkonzentration auf die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung Autoantikörper-produzierender B-Zell-Klone oder sogar der Manifestation einer Autoimmunerkrankung dar. *McMurray et al.* berichteten über die Manifestation eines SLE bei Prolaktinompatienten (155) und *Buskila et al.* sowie *Krause et al.* über das gehäufte Vorkommen verschiedener Autoantikörper bei diesen Patienten (156, 157). Ganz im Einklang mit diesen bisherigen Erkenntnissen steht das Ergebnis dieser Untersuchung.

Differenzierter betrachtet, läßt sich feststellen, daß zwar die Häufigkeit Antinukleärer-Antikörper bei den Prolaktinompatienten signifikant höher liegt als bei Gesunden, die Häufigkeit der Autoimmunerkrankungen in den beiden Gruppen jedoch nicht unterschiedlich ist. Nur bei einer Prolaktinompatientin konnten sich Autoimmunerkrankungen in Form eines Sjögren-Syndroms und einer Hashimoto-Thyreoiditis manifestieren. Hier sollte hinzugefügt werden, daß in diesem Fall eine zufällige Koinzidenz dieser Erkrankungen durchaus denkbar ist. Nicht nur die Häufigkeit des Auftretens von ANA war bei Prolaktinompatienten höher als bei Gesunden, sondern auch die Titer. Das vorherrschende Muster war das feingranuläre. Außerdem fanden sich bei der Fluoreszenzmikroskopie zytoplasmatische und nukleäre dots bei einigen Prolaktinompatienten. Diese ließen sich keinem der bisher bekannten Immunfluoreszenzmuster zuordnen. Bei keinem der Prolaktinompatienten fanden sich Anti-dsDNA-Antikörper in erwähnenswerter Konzentration. Diese Punkte weisen darauf hin, daß Prolaktin auf der einen Seite die Aktivität und möglicherweise auch die Anzahl Autoantikörper-produzierenden Zellen zwar erhöhen, andererseits aber für die klinische Manifestation einer Autoimmunerkrankung nicht der allein ausschlaggebende Faktor sein kann. Auch *Buskila et al.* und *Krause et al.* konnten bei den von ihnen untersuchten Prolaktinompatienten keine Symptome im Sinne einer Autoimmunerkrankung feststellen.

Wider Erwarten war die ANA-Positivität in der Gruppe der Prolaktinompatienten weder vom Serumprolaktinwert noch von der Krankheitsdauer der Patienten abhängig.

3.3.4 Die Rolle des Prolaktins bei SLE-Patienten

Die Prolaktinwerte der Lupuspatienten liegen häufig über den Werten Gesunder. Die Erhöhung ist zwar oft nur unwesentlich, ihr kommt jedoch offensichtlich, ungeachtet ihrer Ursache, eine große Bedeutung hinsichtlich der Erhöhung der Krankheitsaktivität zu. Die Untersuchung hat gezeigt, daß sich PBMC Gesunder in ihrer Aktivität, die Immunglobuliproduktion betreffend, nicht von Prolaktin in physiologischer Konzentration beeinflussen lassen und auch durch eine erhöhte PRL-Konzentration nicht ansprechbar sind. Anders verhält es sich bei den SLE-

Patienten. Die Aktivität ihrer PBMC läßt sich durch Prolaktin deutlich erhöhen. Es erscheint daher sinnvoll, bei der Therapie des SLE nicht nur hormonelle Risikofaktoren wie Östrogen-, DHEA- oder Cortisol-Serumkonzentrationen der Patienten zu berücksichtigen und zu korrigieren, sondern auch die Prolaktinkonzentration im Serum möglichst gering zu halten. Die Rolle des Prolaktins, als ein den SLE-begünstigender hormoneller Faktor, sollte nicht unterschätzt werden. So konnten z.B. *Elbourne et al.* am NZB/NZW F1-Maus-Modell des SLE nachweisen, daß hohe Östrogenspiegel den Krankheitsverlauf nicht akzellerieren, wenn die Prolaktin-stimulierende Eigenschaft der Östrogene durch Bromocriptin antagonisiert wird (214). Es ist nachgewiesen worden, daß Prolaktin die Glukokortikoid-induzierte Apoptose blocken kann (211, 212). Möglicherweise begünstigt es auf diesem Wege das Überleben oder sogar die Entstehung Autoantikörper-produzierender Plasmazellen und hebt die therapeutische Wirkung der Glukokortikoide teilweise auf. Dies weist auf die Bedeutung eines niedrigen Prolaktinspiegels für den Erfolg der medikamentösen SLE-Therapie hin. In Zukunft kommt es darauf an, den therapeutischen Nutzen Prolaktinspiegel-senkender Medikamente, wie z.B. des Dopaminagonisten Bromocriptin, mittels Plazebo-kontrollierter Studien zu untersuchen. Die bisherigen Ergebnisse auf diesem Gebiet sind sehr vielversprechend (190, 191). Auch die Nebenwirkungen einer low-dose-BRC-Therapie sind anscheinend verschwindend gering im Vergleich zu denen anderer SLE-Therapieformen. *Alvarez-Nemegyei et al.* kamen durch eine Plazebo-kontrollierte Studie zu dem Ergebnis, daß eine zusätzliche Therapie mit 2,5mg BRC/die eine nebenwirkungsarme und effektive Methode zur Senkung der Schubhäufigkeit bei SLE-Patienten darstellt (190).

4 Zusammenfassung

Der Aufgabenschwerpunkt dieser Arbeit bestand in der Untersuchung der Serum-Prolaktin-Werte von Patienten mit systemischem Lupus erythematodes (SLE) (n=60) und anderen Kollagenosen bzw. Vaskulitiden. Es konnte gezeigt werden, daß ein Teil der SLE-Patienten erhöhte PRL-Werte hat (33,3%). Bei den Patienten mit sonstigen Kollagenosen und Vaskulitiden lag dieser Anteil bei 11,1%. Es handelt sich dabei um eine (idiopathische) Hyperprolaktinämie mit meist nur geringfügigen Erhöhungen des Prolaktins. Von besonderem Interesse war die Frage nach der Existenz eines Zusammenhanges zwischen dem Serum-Prolaktin-Wert und der klinischen bzw. serologischen Krankheitsaktivität bei SLE-Patienten. Diesbezüglich gab es bisher zahlreiche Untersuchungen mit widersprüchlichen Ergebnissen. Als Ergebnis dieser Studie ließ sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Serumprolaktin und sowohl dem ECLAM-Score als auch der Anti-dsDNA- und Anti-Cardiolipin (IgG)-Antikörperkonzentration der SLE-Patienten nachweisen. Diese Ergebnisse bestätigten sich bei Verlaufsuntersuchungen, bei denen die klinische Krankheitsaktivität, die Anti-dsDNA-Antikörper- und die Prolaktinkonzentration der SLE-Patienten korrelierten.

Um der Frage der Bedeutung des Prolaktins für den Krankheitsverlauf des SLE auf den Grund zu gehen, wurden periphere mononukleäre Zellen (PBMC) der Patienten (n=11) mit PRL in vitro inkubiert und ihre Aktivität hinsichtlich der Produktion von Gesamt-IgG und Zytokinen untersucht. Eine Einflußnahme des Prolaktins auf die Zytokinproduktion konnte nicht beobachtet werden. Anders verhielt es sich mit der IgG-Produktion der SLE-PBMC. Diese ließ sich, im Gegensatz zu der normaler PBMC, durch Prolaktin in erhöhter (100ng/ml) und sogar in physiologischer (20ng/ml) Konzentration steigern. Dabei konnte eine Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität der SLE-Patienten festgestellt werden. Das Ergebnis verdeutlicht, daß Prolaktin möglicherweise schon in einer physiologischen Konzentration aktivitätssteigernd auf SLE-PBMC wirkt. Bei Annahme der Übertragbarkeit dieser in vitro-Ergebnisse auf in vivo-Verhältnisse, läßt sich die Bedeutung der Höhe der Serum-Prolaktin-Konzentration für die Krankheitsaktivität der SLE-Patienten abschätzen. Gleichzeitig stellt sich die Frage

nach dem therapeutischen Nutzen der medikamentösen Kontrolle des Serumprolaktins, insbesondere bei SLE-Patienten mit hoher Krankheitsaktivität.

Neben der Frage, ob PRL Autoimmunprozesse unterhält, sollte aber auch interessieren, ob es sie möglicherweise sogar initiiert. Diesbezüglich gibt es unterschiedliche Vermutungen. Als Modell für die Untersuchung dieser Frage dient der Prolaktinompatient, dessen Immunsystem lange Zeit erhöhten PRL-Konzentrationen ausgesetzt ist. In dieser Studie wurden 39 Prolaktinompatienten auf das Vorhandensein von Autoantikörpern (ANA, Anti-dsDNA) im Serum und von klinischen Befunden im Sinne einer Autoimmunerkrankung untersucht. Dabei wurde ein erhöhtes Vorkommen von Antinukleären-Antikörpern (ANA) bei Prolaktinompatienten im Vergleich zu Gesunden festgestellt (59 vs. 18%). Allerdings hatte sich nur bei einer Patientin eine Autoimmun-Erkrankung (Sjögren-Syndrom und Hashimoto-Thyreoiditis) manifestiert. Es kann also festgestellt werden, daß Prolaktin allein anscheinend nicht in der Lage ist, die klinische Manifestation von Autoimmunerkrankungen herbeizuführen, obwohl es die Produktion von Autoantikörpern begünstigt.

5 Literatur

1. Munves EF, Schur PH. Autoantibodies to Sm and RNP. Prognosticators of disease involvement. Arthritis Rheum. 1983; *26:* 848 - 53.

2. Smith HR, Steinberg AD. Autoimmunity – a perspective. Ann Rev Immunol. 1983; *1:* 175 - 210.

3. Kunkel HG, Tan EM. Autoantibody and disease. Adv Immunol. 1964; *4:* 351 - 95.

4. Fauci AS, Steinberg AD, Haynes BF, Wahlen G. Immunoregulatory aberrations in systemic lupus erythematosus. J Immunol. 1978; *121:* 1473 - 9.

5. Hughes GRV. Autoantibodies in lupus and its variants: experience in 1000 patients. Br Med J. 1984; *289:* 339 - 42.

6. Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers of autoimmune diseases and probes for cell biology. Adv Immunol. 1989; *4:* 93 - 151.

7. Klinman DM, Steinberg AD. Systemic autoimmune disease arises from polyclonal B cell activation. J Exp Med. 1987; *165:* 1755 - 60.

8. Sakane T, Suzuki S, Takada Y, Ueda Y, Murkawa T, Tsuchida Y, Yamauchi Y, Kishimoto T. B cell hyperactivity and its relation to distinct clinical features and the degree of disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1988; *31:* 80 - 7.

9. Becker TM, Lizzo EF, Merchant LP, Reeves JP, Steinberg AD. Increased multiclonal antibody-forming cell activation in the peripheral blood of patients with SLE. Int Arch Allerg Appl Immunol. 1981; *66:* 293 – 303.

10. Blaese RM, Grayson J, Steinberg AD. Elevated immunoglobulin secreting cells in the blood of patients with active systemic lupus erythematosus: correlation of laboratory and clinical assessment of disease activity. Am J Med. 1980; *69:* 345 - 50.

11. Tan PLJ, Pang GTM, Wilson JD, Cullinane G. Immunoglobulin secreting cells in SLE: correlation with disease activity. J Rheumatol. 1980; *7:* 807 - 13.

12. Al-Janadi M, Raziuddin S. B cell hyperactivity is a function of T cell derived

cytokines in systemic lupus erythematosus. J Rheumatol. 1993; *20:* 1885 - 91.

13. Linker-Israeli M, Deans R. Dysregulated lymphokine production in systemic lupus erythematosus. Ann NY Acad Sci. 1989; *557:* 567 -9.

14. Alcocer-Varela J, Alarcon´-Segovia D. Decreased production of and response to interleukin-2 by cultured lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. J Clin Invest. 1982; *69:* 1388 - 92.

15. de Waal Melefyt R, Yssel H, de Vries. Direct effect of IL-10 on subsets of human CD4+ T cells clones and resting T cells. Specic inhibition of IL-2 production and proliferation. J Immunol. 1993; *150:* 4754 - 65.

16. Llorente L, Richaud-Patin Y, Wijdenes J et al. Spontaneous production of Interleukin-10 by B lymphocytes and monocytes in systemic lupus erythematosus. Eur Cytokine Netw. 1993; *4:* 421 - 30.

17. Kitani A, Hara M, Hirose M et al. Autostimulatory effects of IL-6 on exessive B cell differetiation in patients with systemic lupus erythematosus: analysis of IL-6 production and IL-6R expression. Clin exp Immunol. 1992; *88:* 75 - 83.

18. Hagiwara E, Gourley MF, Lee S, Klinman DM. Disease severity in patients with systemic lupus erythematosus correlates with an increased ratio of Interleukin-10: Interferon-gamma-secreting cells in the peripheral blood. Arthitis Rheum. 1996; *39:* 379 - 85.

19. Mossman TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Ann Rev Immunol. 1989; *7:* 145 -73.

20. Horwitz DA. Impaired delayed hypersensitivity in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1972; *15:* 353 - 9.

21. Charpentier B, Carnoud C, Bach JF. Selective depression of the xenogeneic cell mediated lympholysis in systemic lupus erythematosus. J Clin Invest. 1979; *64:* 351 - 60.

22. Stohl W. Impaired generation of polyclonal T cell-mediated cytolytic activity

despite normal polyclonal T cell proliferation in systemic lupus erythematosus. Clin Immunol Immunopathol. 1992. *63:* 163 - 72.

23. Cohen PL, Litvin DA, Winfield JB. Association between endogenously activated T cells and immunoglobulin-secreting B cells in patients with active systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1982; *25:* 168 - 73.

24. Gharavi AE, Chu J-L, Elkon KB. Autoantibodies to intracellular proteins in human systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1988; *31:* 1337 - 45.

25. Rajagopalan S, Zordan T, Tsokos GC, Datta SK. Pathogenic anti-DNA autoantibody-inducing T helper cell lines from patients with active lupus nephritis: Isolation of CD4-8-T helper cell lines that express that theta delta T cell antigen receptor. Proc Natl Acad Sci USA. 1990; *87:* 7020 - 4.

26. Linker-Israeli M, Quismorio FP Jr, Horwitz DA. CD8+ lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus sustain rather than suppress, spontaneous polyclonal IgG production and synergize with CD4+ cells to support antibody synthesis. Arthritis Rheum. 1990; *33:* 1216 - 25.

27. Portales-Peres D et al. Abnormalities in CD69 expression,cytosolic ph and Ca2+ during activation of lymphocytes from patients with sysremic lupus erythematosus. Lupus. 1997; *6:* 48 - 56.

28. Raziuddin S, al-Jandi MA, Alwabel AA. T-cell receptor alpha/beta chain-CD3 Protein complex defect in systemic lupus erythematosus: T-cell function. Am J Med. 1992; *93:* 461 - 6.

29. Desai-Mehta A, Lu L, Ramsey-Goldman R, Datta SK. Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production. J Clin Invest. 1996; *97:* 2063 - 73.

30. ter Borg EJ, Horst G, Hummel EJ et al. Measurement of increase in anti-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1990; *33:* 634 - 43.

31. Guilbert B, Dighiero G, Avrameas S. Naturally occuring antibodies against nine common antigens in human sera. I. Detection, isolation and characterization. J Immunol. 1982; *128:* 2779 - 87.

32. Gaillard RC. Neuroendocrine-immune system interactions. The immune hypothalamo-pituitary-adrenal axis. Trends in endocrinology and metabolism. 1994; *Vol.5, Nr.7:* 303 - 9.

33. Estes D, Christian CL. The natural history of systemic lupus erythematosus by prospective analysis. Medicine (Baltimore). 1971; *50:* 85 - 95.

34. Deapen D et al. A revised estimate of twin concordance in systemis lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1992; *35:* 311 - 8.

35. Schur PH, Sandson J. Immunologic factors and clinical activity in systemic lupus erythematosus. New Engl J Med. 1968; *278:* 533.

36. Sabbatini A, Bombardieri S, Migliorini P. Autoantibodies from patients with systemic lupus erythematosus bind a shared sequence of SmD and Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA 1. Eur J Immunol. 1993; *23:* 1146 - 52.

37. Granholm NA, Cavallo T. Autoimmunity, polyclonal B cell activation and infection. Lupus. 1992; *1:* 63 - 74.

38. Lahita RG. Sex and age in systemic lupus erythematosus. In: Systemic Lupus Erythematosus; Wiley, New York. 1986; 523 - 39.

39. Kanda N et al. Testosterone suppresses anti-DNA antibody production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1997; *40:* 1703 - 11.

40. Suzuki T, Suzuki N, Engelman EG, Mizushima Y, Sakane T. Low serum levels of dehydroepiandrosterone may cause deficient IL-2 production by lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). Clin Exp Immunol. 1995; *99:* 251 - 5.

41. Dayan M, Zinger H, Kalush F et al. The beneficial effects of treatment with tamoxifen and anti-oestradiol antibody on experimental systemic lupus erythematosus are associated with cytokine modulations. Immunology.

1997; *90:* 101 - 8.

42. Nicoll CS. Physiological actions of prolactin. In: Handbook of physiology, section 7: Endocrinology Vol IV, part 2, Washington, DC. 1974; 253 - 92.

43. Stricker P, Grueter R. Action du lobe anterieur de l´hypophyse sur la montee laiteuse. Compt Rend Soc Biol (Paris). 1928; *99:* 1978 - 80.

44. Riddle O, Bates RW, Dykshorn SW. A new hormone of the anterior pituitary. Proc Soc Exp Biol Med. 1932; *29:* 1212 - 5.

45. Lewis UJ, Singh RNP, Seavey BK. Human prolactin: Isolation and some properties. Biochem Biophys Res Commun. 1971; *44:* 1169 - 76.

46. Cooke NE, Coit D, Weiner RI et al. Structure of cloned DNA complementary to rat prolactin messenger RNA. J Biol Chem. 1980; *255:* 6502 - 10.

47. Rosenfeld MG. POU-domain transcription factores: Pou-er-ful developmental regulators. Genes Dev. 1991; *5:* 897 - 907.

48. Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M. The prolactin /growth hormone receptor family. Endocr Rev. 1991; *12:* 235 - 51.

49. Sinha YN. Prolactin variants. Trends Endocrinol Metab. 1992; *3:* 100 - 6.

50. Horseman ND, Yu-Lee LY. Transcriptional regulation by the helix bundle peptide hormones: growth hormone, prolactin and hematopoetic cytokines. Endocr Rev. 1994; *15:* 627 - 49.

51. Owerbach D et al. The prolactin gene is located on chromosome 6 in humans. Science. 1981; *212:* 815 - 6.

52. Miller WL, Eberhardt NL. Structure and evolution of the growth hormone family. Endocr Rev. 1983; *4:* 97 - 130.

53. Sinha YN. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. Endocr Rev. 1995; *16:* 354 - 69.

54. Powers CA, Hatala MA. Prolactin proteolysis by glandular kallikrein: in vitro reaction requirements and cleavage sites, and detection of processed prolactin in vitro. Endocrinology. 1990; *127:* 1916 - 27.

55. Baldocchhi RA, Tan L, Nicoll CS. Processing of rat prolactin by rat tissue explants and serum in vitro. Endocrinology. 1992; *130:* 1653 - 9.

56. Cohen H, Cohen O, Gagnon J. Serum prolactin-binding protein (PRL-BP) of human and rat are identified as IgG. C R Aca Sci III. 1994; *317:* 293 - 8.

57. Bonhoff A, Vuille JC, Gomez F, Gellersen B. Identification of macroprolactin in a patient with asymptomatic hyperprolactinemia as a stable PRL-IgG complex. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 1995; *103:* 252 - 5.

58. Hattori N, Ikekubo K, Ishihara T, Moridera K, Hino M, Kurahachi H. Effects of anti-prolactin autoantibodies on serum prolactin measurements. Eur J Endocrinol. 1994; *130:* 434 - 7.

59. Ben-Jonathan N et al. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. Endocr Rev. 1996; *17:* 639 - 69.

60. Jackson RD,Wortsman J, Malarkey WB. Characterization of a large molecular weight prolactin in women with ideopathic hyperprolactinemia and normal menses. J Clin Endocrinol Metab. 1985; *61:* 258 - 64.

61. Carlson HE, Markhoff E, Lee DW. On the nature of serum prolactin in two patients with makroprolactinemia. Fertil Steril. 1992; *58:* 78 - 87.

62. Hattori N, Ishihara T, Ikekubo K, Moridera K, Hino M, Kurahachi H. Autoantibody to human prolactin in patients with ideopathic hyperprolactinemia. J Clin Endocrinol Metab. 1992; *75:* 1226 - 9.

63. Leite V, Cosby H, Sobrinho LG, Fresnoza A, Santos MA, Friesen HG. Characterization of big, big prolactin in patients with hyperprolactinemia. Clin Endocrinol (Oxf). 1992; *37:* 365 - 72.

64. Walker AM et al. Prolactin-immunglobulin G complexes from human act as costimulatory ligands causing proliferation of malignant B lymphocytes. Proc Natl Acad Sci USA. 1995; *92:* 3278 - 82.

65. Hattori N. The frequency of makroprolactinemia in pregnant women and the heterogeneity of its etiologies. J Clin Endocrinol Metab. 1996; *81:* 586 - 90.

66. Hattori N et al. Correlation of the antibody titers with serum prolactin levels and their clinical course in patients with anti-prolactin autoantibody. Eur J Endocrinol. 1994; *130:* 438 - 45.

67. Clapp C, Sears PS, Nicoll CS. Binding studies with intact rat prolactin and a 16K fragment of the hormone. Endocrinology. 1989; *125:* 1054 - 9.

68. Clapp C, Martial JA, Guzman RC et al. The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. Endocrinology. 1993; *133:* 1292 - 9.

69. Clapp C, Weiner RI. A specific high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. Endocrinology. 1992; *130:* 1380 - 6.

70. Anthony PK, Stoltz RA, Pucci ML, Powers CA. The 22K variant of rat prolactin: evidence for identity to prolactin-(1-173), storage in secretory granules, and regulated release. Endocrinology. 1993; *132:* 806 - 14.

71. Nagy E, Berczi I. Hypophysectomized rats depend on residual prolactin for survival. Endocrinology. 1991; *128:* 2776 - 84.

72. Leighton PC, NcNeilly AS, Chard T. Short-term variation in blood levels of prolactin in women. J Endocrinol. 1976; *68:* 177 - 8.

73. Weitzman ED, Boyar RM, Kapen S, Hellmann L. The relationship of sleep stages to neuroendocrine secretion and biological rhythm in man. Recent Prog Horm Res. 1975. *31:* 399 - 446.

74. Sievertsen GD, Lim VS, Nakawatase C, Frohman LA. Metabolic clearance and secretion rates of human prolactin in normal subjects and in patients with chronic renal failure. J Clin Endocrinol Metab. 1980; *50:* 846 - 52.

75. Yamaji T, Shimamoto K, Ishibashi M et al. Effect of age and sex on circulating and pituitary prolactin levels in humans. Acta Endocrinol (Copenh). 1976; *83:* 711 - 9.

76. Balint-Peric LA, Prelevic GM. Changes in prolactin levels with the menopause. The effect of estrogen/androgen and calcitonin treatment. Gynaecol Endosc. 1997; *6/4:* 275 - 80.

77. Lyons A et al. Pituitary dysfunction in recently post-menopausal women. Nottingham EPIC study group. Clin Endocrinol Oxf. 1997; *47:* 431 - 8.

78. Ehara Y, Siler T, VandenBerg G, Sinha YN, Yen SSC. Circulating prolactin levels during the menstrual cycle: Episodic release and diurnal variation. Am J Obstet Gynecol. 1973; *117:* 962 - 70.

79. Veldhuis JD, Evans WS, Johnson MD, Stumpf PG. Mechanisms that subserve estradiol`s induction of increased prolactin concentrations: Evidence of amplitude modulation of spontaneous prolactin secretory bursts. Am J Obstet Gynecol. 1989; *161:* 1149 - 58.

80. Maurer RA. Estradiol regulates the transcription of the prolactin gene. J Biol Chem. 1982. *257:* 2133 - 6.

81. Lean AD, Garon M, Kelly PA, Labrie F. Changes in pituitary thyrotropin releasing hormone (TRH) receptor level and prolactin response to TRH during the estrous cycle. Endocrinology. 1977; *100:* 1505 - 10.

82. Raymond V, Beaulieu M, Labrie F, Boissier J. Potent antidopaminergic activity of estradiol at the pituitary level on prolactin release. Science. 1978; *200:* 1173 - 5.

83. Sprangers SA, Brenner AM, Bethea CL. Estrogen and progestin receptor immunocytochemistry in lactotropes versus gonadotropes of monkey pituitary cell cultures. Endocrinology. 1989; *124:* 1462 - 70.

84. Rakoff JS, Yen SS. Progesterone induced acute release of prolactin in estrogen primed ovariectomized women. J Clin Endocrinol Metab. 1978; *47:* 918 - 21.

85. Yen SSC. Prolactin in human reproduction. In: Reproductive Endocrinology.3rd ed. Philadelphia, USA; 1991; 357-388.

86. Noel GL, Dimond RC,Wartkofsky L et al. Studies of prolactin and TSH secretion by continuous infusion of small amounts of thyrotropin releasing hormone (TRH). J Clin Endocrinol Metab. 1974; *39:* 6 - 17.

87. Nagy G, Mulchahey JJ, Neill JD. Autocrine control of prolactin secretion by vasoactive intestinal peptide. Endocrinology. 1988; *122:* 364 - 6.

88. Ben-Jonathan N, Arbogast LA, Hyde JF. Neuroendocrine regulation of prolactin release. Prog Neurobiol. 1989; *33:* 399 - 447.

89. Lim VS, Kathpalia S, Frohman LA. Hyperprolactinemia and impaired pituitary response to suppression and stimulation in chronic renal failure: Reversal after transplantation. J Endocrinol Metab. 1979; *48:* 101 - 7.

90. Verbee len D, Vanhaelst L et al. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on plasma prolactin in patients with renal failure on regular dialysis treatment. J Endocrinol Invest. 1983; *6:* 359 - 62.

91. Stephanou A, Sarlis NJ, Knight RA, Lightman SL, Chowdrey HS. Glucocorticoid-mediated responses of plasma ACTH and anterior pituitary proopiomelanocortin, growth hormone and prolactin mRNA during adjuvant induced arthritis in the rat. Neuroendocrinology. 1992; *9:* 273 - 81.

92. Tsigos C et al. Dose effects of recombinant Interleukin-6 on pituitary hormone secretion and energy expenditure. Neuroendocrinology. 1997; *66:* 54 - 62.

93. Bryan L et al. Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release in vitro. Endocrinology. 1989; *125:* 575 - 578.

94. Tyson JE et al. Studies of prolactin secretion in human pregnancy. Am J Obstet Gynecol. 1972; *113:* 14 - 20.

95. Veldhuis JD, Evans WS, Johnson MD, Stumpf PG. Mechanisms that subserve estradiol`s induction of increased prolactin concentrations: Evidence of amplitude modulation of spontaneous prolactin secretory bursts. Am J Obstet Gynecol. 1989; *161:* 1149 - 58.

96. Markhoff E, Lee DW, Hollingsworth DR. Glycosylated and nonglycosylated prolactin in serum during pregnancy. J Clin Endocrinol Metab. 1988; *67:* 519 - 23.

97. Stier CT Jr, Cowden EA, Friesen HG, Allison MEM. Prolactin and the rat kidney: A clearance and micropuncture study. Endocrinology. 1984; *115:* 362 - 7.

98. Hamosh M, Hamosh P. The effect of prolactin on the lecithin content of fetal

rabbit lung. J Clin Invest. 1977; *59:* 1002 - 5.

99. Pullano JG et al. Water and salt conservation in the human fetus and newborn. I. Evidence for role of fetal prolactin. J Clin Endocrinol Metab. 1989; *69:* 1180 - 6.

100. Dardenne M et al. Neuroendocrine control of thymic hormonal production. I. Prolactin stimulates in vivo and in vitro the production of thymulin by human and murine thymic epithelial cells. Endocrinology. 1989; *125:* 3 - 12.

101. Heffner LJ, Gramates LS, Yuan RW. A glycosylated prolactin species is covalently bound to immunoglobulin in human amniotic fluid. Biochem Biophys Res Comm. 1989; *165:* 299 - 305.

102. McCoshen JA, Tomita K, Fernandez C, Tyson JE. Specific cells of human amnion selectively localize prolactin. J Clin Endocrinol Metab. 1982; *55:* 166 - 9.

103. Lin B, Kinoshita Y, Hato F, Tsuji Y. Enhancement of thymic lymphocyte proliferation by the culture supernatant of thymus epithelial cells stimulated by prolactin. Cell Mol Biol Noisy le grand. 1997; *43:* 361 - 7.

104. de Mello Coelho V, Villa Verde DM, Dardenne M, Savino W. Pituitary hormones modulate cell-cell interactions between thymocytes and thymic epithelial cells. J Neuroimmunol. 1997; *76:* 39 - 49.

105. Ellis LA, Mastro AM, Picciano MF. Do milk-borne cytokines and hormones influence neonatal immune cell function? J Nutr. 1997; *127 (5 Suppl):* 985 – 8.

106. Hattori N, Inagaki C. Anti-prolactin autoantibodies cause asymptomatic hyperprolactinemia: bioassay and clearance studies of PRL-immunglobulin G complex. J Clin Endocrinol Metab. 1997; *82:* 3107 – 10.

107. Vance M L, Thorner M O. Prolactin: Hyperprolactinemic syndromes and management. In: Endocrinology. DeGroot LJ, Vol.I, 3rd ed. Philadelphia; 1995; 394 - 405.

108. Klibanski A, Neer R, Beitins I, Ridgway E, Mc-Arthur J. Decreased bone density in hyperprolactinemic women. N Engl J Med. 1981; *303:* 1511 -

4.

109. Koppelmann MC et al. Vertebral body bone mineral content in hyperprolactinemic women. J Clin Endocrinol Metab. 1984; 59: 1050 - 3.

110. Pahuja DN, De Luca HF. Stimulation of intestinal calcium transport and bone calcium mobilization by prolactin in vitamin D-deficient rats. Science. 1981. 214: 1038 - 9.

111. Thorner MO, Edwards CRW, Hanker JP et al. Prolactin and gonadotropin interaction in the male. In: The testis in normal and infertile men. New York, Raven Press, 351 – 66.

112. Gustafson AB et al. Correlation of hyperprolactinemia with altered plasma insulin and glucagon: Similarity to effects of late human pregnancy. J Clin Endocrinol Metab. 1980; *51:* 242 - 6.

113. Kelly PA, Djiane J,Postel-Vinay MC, Edery M. The prolactin/growth hormone receptor family. Endocr Rev. 1991; *12:* 235 - 51.

114. Boutin J, Edery M et al. Identification of a cDNA encoding a long form of prolactin receptor in human hepatoma and breast cancer cells. Mol Endocrinol. 1989; *3:* 1455 – 62.

115. Clevenger CV, Chang W et al. Expression of prolactin and prolactin receptor in human breast carcinoma. Am J Pathol. 1995; *146:* 695 – 705.

116. Rui H, Lebrun JJ et al. JAK2 activation and cell proliferation induced by antibody-mediated prolactin receptor dimerization. Endocrinology. 1994; *135:* 1299 – 306.

117. Rao YP, Olson MD, Buckley DJ, Buckley AR. Nuclear colocalization of prolactin and the prolactin receptor in rat Nb2 node lymphoma cells. Endocrinology. 1993; *133:* 3062 - 5.

118. Clevenger CV, Russell DH, Appasamy PM, Prystrowsky MB. Regulation of interleukin 2-driven T-lymphocyte proliferation by prolactin. Proc Natl Acad Sci USA. 1990; *87:* 6460 - 4.

119. Walsh RJ,Slaby FJ,Posner BI. A receptor-mediated mechanism for the transport of prolactin from blood to cerebrospinal fluid. Endocrinology. 1987; *120:* 1846 – 50.

120. Mercado M, Baumann G. A growth hormone/prolactin-binding protein in human milk. J Clin Endocrinol Metab. 1994; *79:* 1637 – 41.

121. Mc Coshen JA, Barc J. Prolactin bioactivity following decidual synthesis and transport by amniochorion. Am J Obstet Gynecol. 1985; *153:* 217 - 23.

122. Campbell GS, Argetsinger LS et al. Activation of JAK2 tyrosine kinase by prolactin receptors in Nb2 cells and mouse mammary gland explants. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; *91:* 5232 - 6.

123. Gouilleux F, Moritz D, Humar M et al. Prolactin and interleukin-2 receptors in T lymphocytes signal through a MGF-STAT5-like transcription factor. Endocrinology. 1995; *136:* 5700 - 8.

124. Clevenger CV, Torigoe T, Reed JC. Prolactin induces rapid phosphorylation and activation of prolactin receptor-associated RAF-1 kinase in T-cell line. J Biol Chem. 1994; *269:* 5559 – 65.

125. Fuh G et al. Rational design of potent antagonists to the human growth hormone receptor. Science. 1992; *256:* 1677 - 80.

126. Pellegrini I, Lebrun JJ, Ali S, Kelly PA. Expression of prolactin and its receptor in human lyphoid cells. Mol Endocrinol. 1992; *6:* 1023 – 31.

127. Montgomery DW et al. Human thymocytes express a prolactin-like messenger ribonucleic acid and synthesize bioactive prolactin like-proteins. Endocrinology. 1992; *131:* 3019 – 26.

128. O`Neal KD, Montgomery DW, Truong TM, Yu-Lee LY. Prolactin gene expression in human thymocytes. Mol Cell Endocrinol. 1992; *87:* 19 - 23.

129. Sabharwal P et al. Prolactin synthesized and secreted by human peripheral blood mononuclear cells: an autocrine growth factor for lymphoproliferation. Proc Natl Acad Sci USA. 1992; *89:* 7713 – 6.

130. DiMattia GE, Gellersen HG, Bohnet, Friesen HG. A human B-lymphoblastoid cell line produces prolactin. Endocrinology. 1988; *122:* 2508 - 17.

131. Baglia LA, Cruz K, Shaw JE. An Epstein-Barr-Virus-negative Burkitt lymphoma cell line (sfRamos) secretes a prolactin-like protein during continuous growth in serum-free medium. Endocrinology. 1991; *128:* 2266 – 72.

132. Matera L, Cutufia M, Geuna M et al. Prolactin is an autocrine growth factor for the Jurkat human T-leukemic cell line. J Neuroimmunology. 1997; *79:* 12 - 21.

133. Larrea F et al. A bioactive 60-kilodalton prolactin species is preferentially secreted in cultures of mitogen-stimulated and nonstimulated peripheral blood mononuclear cells from subjects with systemic lupus erythematosus. J Clin Endocrinol Metab. 1997; *82:* 3664 - 9.

134. Gutiérrez MA et al. Prolactin and systemic lupus erythematosus: prolactin secretion by SLE lymphocytes and proliferative (autocrine) activity. Lupus. 1995; *4:* 348 – 52.

135. Shiu RP et al. Receptor mediated mitogenic action of prolactin in rat lymphoma cell line. Endocrinology. 1983; *113:* 159 - 65.

136. Russell DH et al. Prolactin receptors on human T and B lymphocytes: Antagonism of prolactin binding by cyclosporine. Immunol. 1985; *134:* 3027 – 31.

137. Matera L et al. Prolactin receptors on large granular lymphocytes: dual regulation by cyclosporine A. Brain Behav Immun. 1988; *2:* 1 - 10.

138. Mukherjee P, Mastro AM, Hymer WC. Prolactin induction of IL-2 Receptors on rat splenic lymphocytes. Endocrinology. 1990; *126:* 88 - 94.

139. Viselli SM, Stanek EM, Mukherjee P, Hymer WC, Mastro AM. Prolactin-induced mitogenesis of lymphocytes from ovariectomized rats. Endocrinology. 1991; *129:* 983 - 90.

140. Matera G et al. Role of PRL in the in vitro development of interleukin-2-driven anti-tumoural lymphokine-activated killer cells. Immunology. 1996;

89: 619 - 26.

141. Lahat N, Miller A, Shtiller R, Touby E. Differential effects of prolactin upon activation and differentiation of human B lymphocytes. J Neuroimmunol. 1993; *47:* 35 - 40.

142. Athreya BH, Pletcher J, Zulian F, Weiner DB, Williams WV. Subset-specific effects of sex hormones and pituitary gonadotropins on human lymphocyte proliferation in vitro. Clin Immunol Immunpathol. 1993; *66:* 201 - 11.

143. Russell DH, Larson DF, Cardon SB, Copeland JG. Cyclosporine inhibites prolactin induction of ornithine decarboxylase in rat tissues. Mol Cell Endocrinol. 1984; *35:* 159 - 66.

144. Nishiguchi Y, Hibasami H, Komada Y, Sakurai M, Nakashima K. Human promyelocytic cell line HL60 has the specific binding sites for prolactin and its ornithine decarboxylase, DNA synthesis and cellular proliferation are induced by prolactin. Leuk Res. 1993; *17:* 633 - 7.

145. Schwarz LA, Stevens AM, Hrachovy JA, Yu-Lee LY. Interferon regulatory factor-1 is induceble by prolactin interleukin-2 and concanavalin A in T cells. Mol Cell Endocrinol. 1992; *86:* 103 - 10.

146. Li-Yuan Y. Molecular actions of prolactin in the immune system. PSEBM. 1997; *215:* 35 - 52.

147. Gaufo GO, Diamond MC. Prolactin increases CD4/CD8 cell ratio in thymus grafted congenitally athymic nude mice. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; *93:* 4165 - 9.

148. Gutiérrez MA, Molina JF, Jara LJ et al. Prolactin-induced immunoglobulin and and autoantibody production by peripheral blood mononuclear cells from systemic lupus erythematosus and normal individuals. Int Arch Allergy Immunol. 1996; *109:* 229 - 35.

149. Kumar A, Singh SM, Sodhi A. Effect of prolactin on nitric oxide and interleukin-1 production of murine peritoneal makrophages: Role of Ca2+ and protein kinase C. Int J Immunopharmac. 1997; *19:* 129 - 33.

150. Ortega E, Forner MA, Barriga C. Effect of prolactin on the in vitro phagocytic

capacity of makrophages. Comp Immun Microbiol Infect Dis. 1996; *19:* 139 - 46.

151. Thorat SP, Thatte bUM, Pai N, Dahanukar SA. Effect of prolactin on neutrophils and monocytes. Acta Haematol. 1993; *89:* 219 - 20.

152. Cesario TC et al. Enhanced yields of gamma interferon in prolactin-treated human peripheral blood mononulear cells. Proc Soc Exp Biol Med. 1994; *205:* 89 - 95.

153. Chen Y, Johnson AG. In vivo activation of macrophages by prolactin from young and aging mice. Int J Immunopharmacol. 1993; *15:* 39 - 45.

154. Matera L et al. Role of prolactin in the in vitro development of interleukin-2-driven anti-tumoral lymphokine-activated killer cells. Immunology. 1996; *89:* 619 - 26.

155. McMurray RW, Allen SH, Braun AL, Rodriguez F, Walker SE. Longstanding hyperprolactinemia associated with systemic lupus erythematosus: possible hormonal stimulation of an autoimmune disease. J Rheumatol. 1994; *21:* 843 - 50.

156. Buskila D et al. Autoantibody profile in sera of women with hyperprolactinemia. J Autoimmunol. 1995; *8:* 415 - 24.

157. Krause I et al. Anti-endothelial cell antibodies in the sera of hyperprolactinemic women. Lupus. 1998; *7:* 377 - 82.

158. Ferrari C, Boghen M et al. Thyroid autoimmunity in hyperprolactinemic disorders. Acta Endocrinol. 1983; *104:* 34 - 41.

159. Nagy E, Berczi I. Pituitary dependence of bone marrow function. Br J Hematol. 1989; *71:* 457 - 62.

160. Nagy E, Berczi I, Friesen HG. Regulation of immunity in rats by lactogenic and growth hormones. Acta Endocrinol. 1983; *102:* 351 - 7.

161. Berczi I, Nagy E, Asa SL, Kovacs K. Pituitary hormones and contact sensitivity in rats. Allergy. 1983; *38:* 325 - 30.

162. Nagy E, Berczi I, Wren GE, Asa SL, Kovacs K. Immunomodulation by

bromocriptine. Immunopharmacology. 1983; *6:* 231 - 43.

163. Russell DH, Mills KT, Talamantes FJ, Bern HA. Neonatal administration of prolactin antiserum alters the developmental pattern of T- and B-lymphocytes in the thymus and spleen of BALB/c female mice. Proc Natl Acad Sci USA. 1988; *85:* 7404 - 7.

164. Hiestand PC, Mekler P, Nordmann R, Grieder A, Permonngkol C. Prolactin as a modulator of lymphocyte responsiveness provides a possible mechanism of action for cyclosporine. Proc Natl Acad Sci USA. 1986; *83:* 2599 - 603.

165. Bindoni M, Belluardo N, Liciarello S, Marchese AE, Cicirata F. Growth of Yoshida ascites tumor in the rat after radiofrequency destruction of the tuberoinfundibular region of the hypothalamus. Neuroendocrinology. 1980; *30:* 88 - 93.

166. Cross RJ, Markesbery WR, Brooks WH, Roszman TL. Hypothalamic-immune interactions: neuromodulation of natural killer activity by lesioning of the anterior hypothalamus. Immunology. 1984; *51:* 399 - 405.

167. Forni G, Bindoni M, Santoni A, Marchese N, Giovarelli M. Radiofrequency destructions of the tuberoinfundibular region of the hypothalamus permanently abrogates NK cell activity in mice. Nature. 1983; *306:* 181 - 4.

168. Gerli R, Rambotti P et al. Reduced number of natural killer cells in patients with pathological hyperprolactinemia. Clin Exp Immunol. 1986; *64:* 339 - 406.

169. Matera L, Cesano A, Bellone G, Oberhjoltzer E. Modulatory effect of prolatin on the resting and mitogen induced activity of T, B, and NK lymphocytes. Brain Behav Immun. 1992; *6:* 409 - 17.

170. Vidaller A, Llorente L, Larrea F, Mendez JP, Alcocer-Varela J, Alarcon-Segovia D. T-cell dysregulation in patients with hyperprolactinemia: effect of bromocriptine treatment. Clin Immunol Immunopathol. 1986; *38:* 337 - 43.

171. Blank M, Krause I, Buskila D et al. Bromocriptine immunomodulation of experimental SLE and primary antiphospholipid syndrome via induction of nonspecific T suppressor cells. Cell Immunol. 1995; *162:* 114 - 22.

172. Hedner LP, Bynke G. Endogenous iridocyclitis relieved during treatment with bromocriptine. Am J Ophthalmol. 1985; *100:* 618 - 9.

173. Lever EG, McKerron CG. Auto-immune Addison´s disease associated with hyperprolactinaemia. Clin Endocrinol. 1984; *21:* 35 - 41.

174. Honegger J et al. Lymphocytic and granulomatous hypophysitis: Experience with nine cases. Neurosurgery. 1997; *40:* 713 - 23.

175. Gutiérrez MA et al. Hyperprolactinaemia in primary Sjogren´s syndrome. Ann Rheum Dis. 1994; *53:* 425 - 8.

176. Kucharz EJ et al. High serum level of prolactin in patients with systemic sclerosis. Clin Rheumatol. 1996; *15:* 314.

177: Picco P et al. Prolactin and interleukin 6 in prepubertal girls with juvenile chronic arthritis. J Rheumatol. 1998; *25:* 347 - 51.

178. Lavalle C et al. Correlation study between prolactin and androgens in male patients with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol. 1987; *14:* 268 - 72.

179. Jara LJ et al. Hyperprolactinemia in systemic lupus erythematosus: Association with disease activity. Am J Med Sci. 1992; *303:* 222 - 6.

180. Mok CC, Lau CS, Tam SCF. Prolactin profile in a cohort of chinese systemic lupus erythematosus patients. Br J Rheumatol. 1997; *36:* 986 - 9.

181. Huang CM, Chou CT. Hyperprolactinemia in systemic lupus erythematosus. Chung Hua I Hsueh Tsa Chih Taipei. 1997; *59:* 37 - 47.

182. Jimena P et al. Prolactin levels in patients with systemic lupus erythematosus: a case controlled study. Lupus. 1998; *7:* 383 - 6.

183. Neidhart M. Elevated serum prolactin or elevated prolactin/cortisol ratio are associated with autoimmune processes in systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases. J Rheumatol. 1996; *23:* 476 - 81.

184. Pauzner R, Urowitz MB, Gladman DD, Gough JM. Prolactin in systemic lupus erythematosus. J Rheumatol. 1994; *21:* 2064 - 7.

185. Buskila D, Lorber M, Neumann L, Flusser D, Shoenfeld Y. No correlation between prolactin levels and clinical activity in patients with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol. 1996; *23:* 629 - 32.

186. Munoz JA et al. Sex hormones in chronic systemic lupus erythematosus. Correlation with clinical and biological parameters. Ann de Med Intern. 1994; *145:* 459 - 63.

187. Ostendorf B et al. Hyperprolactinemia in systemic lupus erythematosus. Scand J Rheumatol. 1996; *25:* 97 - 102.

188. El-Graf A et al. Prolactin hormone in juvenile systemic lupus erythematosus: a possible relationship to disease activity and CNS manifestations. J Rheumatol. 1996; *23:* 374 - 7.

189. Miranda JM, Prieto RE et al. Clinical significance of serum and urine prolactin levels in lupus glomerulonephritis. Lupus. 1998; *7:* 387 - 91.

190. Alvarez-Nemegyei J et al. Bromocriptine in systemic lupus erythematosus: A double-blind, randomized, placebo-controlled study. Lupus. 1998. *7:* 414 - 9.

191. McMurray RW, Weidensaul D, Allen SH, Walker SE. Efficacy of bromocriptine in an open label therapeutic trial for systemic lupus erythematosus. J Rheumatol. 1995; *22:* 2084 - 91.

192. McMurray RW, Hoffman RW, Walker SE. In vivo prolactin manipulations alters in vitro IL-2, IL-4, and IFN mRNA levels in female B/W mice (abstr). Arthritis Rheum. 1991; *39:* 734A.

193. Tan EM, Cohen AS, Fries JF et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1982; *25:* 1271 - 7.

194. Müller P, Dammann HG, Simon B. Mehrwöchige Gabe von Ranitidin einmal am Abend: Einfluß auf Säureverhalten und basale Hormonspiegel bei gesunden Probanden. Arzneimittelforschung. 1985; *35:* 1472 - 4.

195. Tanimoto K et al. Classification criteria for polymyositis and dermatomyositis. J Rheumatol. 1995; *22:* 668 - 74.

196. Sharp GC et al. Mixed connective tissue disease- an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). Am J Med. 1972; *52:* 148 - 59.

197. Vitali C et al. Preliminary criteria for the classification of Sjögren´s syndrome. Arthritis Rheum. 1993; *36:* 340 - 6.

198. Masi AT et al. Perliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and therapeutic criteria Commitee. Arthritis Rheum. 1980; 23: 581 - 90.

199. Arend WP, Michel BA, Bloch DA, Hunder GG, Calabrese LH, Edworthy SM, Fauci AS, Leavitt RY, Lie JT, Lightfoot RW et al. The American College of Rheumatology, 1990 Criteria for the classification of Wegner´sche Granulomatosis. Arthritis Rheum. 1990; *33:* 1101 - 7.

200. Vitali C et al. Disease activity in systemic lupus erythematosus: a report of the Consensus Study Group of the European Workshop for Rheum. Research.II. Identification of the variables indicative of disease activity and their use in the development of an activity score. Clin Exp Rheumatol. 1992; *10:* 541 - 7.

201. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand J Clin Lab Invest. 1968; *21:* 77 - 98.

202. Takeuchi K, Turley SJ, Tan EM, Pollard KM. Analysis of the autoantibody response to fibrillarin in human disease and murine models of autoimmunity. J Immunol. 1995; *154:* 961 - 971.

203. D'Armiento M et al. Lack of inhibition of anterior pituitary hormone release during chronic treatment with calcium antagonists. Clin Endocrinol Oxf. 1984; *21:* 233 - 7.

204. Jara LJ et al. Prolactin and IL-6 in CSF of patient with SLE and CNS manifestations (abstr). Arthritis Rheum. 1993; *(suppl)37:* 88.

205. Gutiérrez MA, Gracia ME, Rodriguez JA, Rivero S, Jacobelli S. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and prolactin secretion in systemic lupus erythematosus. Lupus. 1998; *7:* 404 - 8.

206. Rovenský J et al. The hypothalamic-pituitary response in SLE. Regulation of prolactin, growth hormone and cortisol release. Lupus. 1998; *7:* 409 - 13.

207. Montgomery DW, LeFevre JA, Ulrich ED, Adamson CR, Zukoski CF. Identification of prolactin like proteins synthesized by normal lymphocytes. Endocrinology. 1990; *127:* 2601 - 3.

208. Leanos A, Pascoe D, Fraga A, Blanco-Favela F. Anti-prolactin autoantibodies in systemic lupus erythematosus patients with associated hyperprolactinemia. Lupus. 1998; *7:* 398 - 403.

209. Rovenský J et al. Relationship between endocrine, immune, and clinical variables in patients with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol. 1997; *24:* 2330 - 4.

210. Nalda AM, Martial JA, Muller M. The glucocorticoid receptor inhibits the human prolactin gene expression by interference with pit-1 activity. Mol Cell Endocrinol. 1997; *134:* 129 - 37.

211. Leff MA et al. Rapid modulation of the apoptosis regulatory genes, bcl-2 and bax by prolactin in rat Nb2 lymphoma cells. Endocrinology. 1996; *137:* 5456 - 62.

212. Fletcher-Chiappini SE et al. Glucocorticoid-prolactin interactions in Nb2 lymphoma cells: antiproliferative versus anticytolytic effects. Proc Soc Exp Biol Med. 1993; *202:* 345 - 52.

213. Clodi M, Svoboda T, Kotzmann H et al. Effect of elevated serum prolactin concentrations on cytokine production and natural killer cell activity. Neuroendocrinology. 1992; *56:* 775 - 9.

214. Elbourne KB, Keisler D, McMurray RW. Differetial effects of estrogen and prolactin on autoimmune diseasein the NZB/NZW F1 mouse model of systemic lupus erythematosus. Lupus. 1998; *7:* 420 - 7.

6 Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Wirkungsmechanismen des Prolaktins (nach *Ben-Jonathan et al.*, 59)....13

Abb. 2: Vorkommen des Prolaktins im menschlichen Organismus (*Ben-Jonathan et al.*, 59).....14

Abb. 3: Serum-Prolaktin-Konzentration im Tagesverlauf (aus 85).....16

Abb. 4: Übersicht der Prolaktinkonzentrationen im Plasma von Mutter und Fötus und in der Amnionflüssigkeit während der Schwangerschaft und der Verlauf der Prolaktinkonzentration während der postnatalen Entwicklung (85).....19

Abb. 5: Rezeptor-Familie der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren und Zytokine (*Kelley et al*, 113).....21

Abb. 6:Modell des PRL-Rezeptors 22

Abb. 7: Verfahren zur Prolaktinbestimmung.....33

Abb. 8:Prolaktinwerte im Vergleich.....47

Abb. 9: Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität und dem PRL-Wert.....48

Abb. 10: Verteilung der PRL-Werte in zwei Gruppen mit niedriger (ECLAM≤4) und hoher Krankheitsaktivität (ECLAM>4) 48

Abb. 11: Verteilung der Krankheitsaktivität bei SLE-Patienten mit normalen und erhöhten PRL-Werten 49

Abb. 12: Zusammenhang zwischen dem Auftreten von DNS-Antkörpern und dem Serumprolaktin bei SLE-Patienten.....52

Abb. 13: Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Anti-Cardiolipin-Antikörpern und den Serumprolaktinwerten der SLE-Patienten.....53

Abb. 14: Verteilung der PRL-Werte in den Patientengruppen ohne Therapie und mit Therapie (Azathioprin, Prednison, Cyclophosphamid) mit den Mittelwerten 54

Abb. 15a/b: Verläufe der Anti-dsDNA-Antikörper Serumprolaktinwerte und der

Krankheitsaktivität von 10 SLE-Patienten mit schwankender Krankheitsaktivität 55/56

Abb. 16a/b: Verläufe der Anti-dsDNA-Antikörper, Serumprolaktinwerte und der Krankheitsaktivität von 10 SLE-Patienten mit konstanter Krankheitsaktivität 57/58

Abb. 17: IgG-Konzentration in den Zellüberständen von SLE-PBMC und normalen PBMC.....60

Abb. 18: Zusammenhang zwischen Krankheitsaktivität und der durch PRL stimulierbaren IgG-Produktion von SLE-PBMC.....61

Abb. 19: Zytokinkonzentration in den Zellkulturüberständen von drei Gesunden nach 24-stündiger Inkubation mit PRL oder LPS.....63

Abb. 20: Höhe der bei Prolaktionompatienten und gesunden Kontrollen .....beobachteten ANA-Titer.....65

Abb. 21: Nukleoläres Immunfluoreszenzmuster mit vereinzelten zytoplasmatischen .....und nukleären dots (Prolaktinompatient).....66

Abb.22:Feingranuläres Immunfluoreszenzmuster (Prolaktinompatient).....66

Abb. 23:Nukleoläres Immunfluoreszenzmuster (Prolaktinompatient).....67

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Prolaktin-Varianten.....12

Tab. 2 physiologische Umstände, die mit einem erhöhten Serumprolaktin einhergehen (85).....17

Tab. 3 Medikamente mit Einfluß auf die PRL-Sekretion.....17

Tab. 4: Prolaktin-sezernierende Zellen.....23

Tab. 5: unterschiedliche Wirkungen des Prolaktins in Abhängigkeit von der Differenzierung der Zielzelle.....24

Tab. 6: Beispiele für Defizite des Immunsystems im Falle einer Hypo- bzw.

Hyperprolaktinämie 25

Tab. 7 SLE-Patienten 29

Tab. 8: Patienten mit Kollagenosen und Vaskulitiden 30

Tab. 9: Gesunde Kontrollgruppe 30

Tab. 10: Krankheitsmanifestationen der SLE-Patienten.....35

Tab. 11: Serumprolaktinwerte im Vergleich.....46

Tab. 12: Häufigkeit bestimmter Krankheitsmanifestationen bei SLE-Patienten mit erhöhten bzw. normalen PRL-Werten 50

Tab. 13: Mittelwerte der Serumprolaktinwerte der SLE Patienten mit bzw. ohne bestimmte Krankheitsmanifestationen.....51

Tab. 14: Prolaktinmittelwerte (MW-PRL) in ng/ml in Abhängigkeit von der Therapie der SLE-Patienen 54

Tab. 15: mittlere IgG-Konzentrationen in den Zellüberständen von SLE-PBMC nach 7-tägiger Stimulation mit PRL und ohne Stimulation 59

Tab. 16: Abhängigkeit der durch PRL stimulierbaren IgG-Produktion vom PRL-Wert der Patienten 61

Tab. 17: Abhängigkeit der IgG-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen von dem zur Stimulation verwendeten PRL 62

Tab. 18: Anzahl (N) und Prozentsatz (%) der ANA-positiven Prolaktinompatienten und Gesunden.....64

Tab. 19: Unterschiede in der Verteilung der verschiedenen ANA-Muster bei Prolaktinompatienten und Gesunden 65

Tab. 20: Häufigkeit des Auftretens verschiedener ANA-Muster bei Prolaktinom-Patienten in Abhängigkeit vom Serumprolaktinwert zum Untersuchungszeitpunkt.....68

Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die ausführliche Beratung hinsichtlich aller Probleme, die bei der Anfertigung dieser Arbeit auftraten, möchte ich Herrn Prof. Dr. F. Hiepe herzlich danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. W. Rohde für die ausführliche Beratung bei allen das Prolaktin betreffenden Fragen und ebenfalls den Mitarbeitern der hormonanalytischen Abteilung des Institutes für Experimentelle Endokrinologie der Charité, Frau Zillmann und Frau Pohle, für die Bestimmung der Serumprolaktinwerte.

Herrn Prof. Dr. D. Volk möchte ich für die ständige Auskunftsbereitschaft, Beratung und Zusammenarbeit bei der Zytokinbestimmung herzlich danken. Mein besonderer Dank gilt der Mitarbeiterin des Institutes für Medizinische Immunologie der Charité, Frau Liebenthal, für die Anleitung und Unterstützung bei der Zytokinbestimmung.

Ich danke Herrn PD Dr. M. Ventz für die Unterstützung bei der Erfassung der Prolaktinompatienten und der Gewinnung der Seren zur Autoantikörper-bestimmung.

Den Mitarbeitern der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und klinische Immunologie und der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Gastroenterologie und Endokrinologie sowie den Mitarbeitern der Blutspendeabteilung und des Archivs der Charité möchte ich für alle Bemühungen danken, die mir die Erfassung von Patienten und gesunden Probanden ermöglichten.

Auch bei allen Mitarbeitern des Labors für Rheumatologie und Klinische Immunologie, die mich bei der Durchführung meiner Untersuchungen unterstützt haben, möchte ich mich bedanken.