Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie, Gastroenterologie, Stoffwechsel und Ernährung Zentrum für Kinderheilkunde der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Lenard

Zytokinsekretion und Verteilung IL-2, IL-4 und INF-γ produzierender T-Zellsubpopulationen bei Patienten mit atopischer Rhinitis

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt von

Shah Luna Azfar

2002

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dieter Häussinger Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Gerd Horneff

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Ruzicka

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung

1.1.	Historischer Überblick
1.2.	Klinische Manifestation atopischer Erkrankungen
1.2.1.	Allergische Nahrungsmittelreaktionen
1.2.2.	Atopische Dermatitis
1.2.3.	Asthma bronchiale
1.2.4.	Atopische Rhinokonjunktivitis
1.3.	Pathophysiologie der IgE-vermittelten allergischen Reaktion (Typ I
	nach Coombs und Gell)
1.3.1.	Antigenprozessierung und -präsentation
1.3.2.	Regulation der IgE-Synthese
1.3.2.1.	Klassenwechsel in der Immunglobulinsynthese, "Switch" zur IgE-
	Produktion
1.3.2.2.	Modulation der IgE-Synthese durch Zytokine und andere
	Mediatoren
1.3.3.	Sensibilisierung
1.3.4.	Degranulation
1.3.5.	Frühphase der allergischen Sofortreaktion
1.3.6.	Spätphase der allergischen Sofortreaktion
1.4.	Immunologischen Besonderheiten bei Atopikern
1.5.	Interleukin-2
1.6.	Interleukin-4
1.7.	Interferon-gamma
1.8.	Immunfluoreszenz
1.9.	Reaktion mit Zelloberflächen-Antigenen

1.10.	Durchfluss-Zytometrie

2. Aufgabenstellung

3. Material und Methoden

- 3.1. Patienten und Kontrollen
- 3.2. Blutprobengewinnung
- 3.3. Materialien
- 3.4. Zellseparationsverfahren
- 3.5. Zellkultur
- 3.6. Bestimmung der IgE-Konzentration
- 3.7. Durchfluss-Zytometrie
- 3.8. Messung der intrazellulären markierten Zytokine
- 3.9. Messung der Zytokine im Serum und in Zellkulturüberständen
- 3.10. Statistische Auswertung

4. Ergebnisse

- 4.1. Probanden
- 4.2. Produktionskinetiken für IL-2, IL-4 und INF- γ
- 4.3. IgE-Konzentrationen im peripheren Blut
- 4.4. Untersuchung der Lymphozytensubpopulation vor Stimulation
- 4.5. IL-2-Konzentration im Serum und IL-2-Konzentration in der Zellkultur
- 4.6. IL-4-Konzentration im Serum und IL-2-Konzentration in der Zellkultur
- 4.7. INF-γ-Konzentration im Serum und IL-2-Konzentration in der Zellkultur

4.8.	Zytokinmuster
4.9.	Intrazelluläre Zytokindetektion

- 5. Diskussion
- 6. Zusammenfassung
- 7. Literaturverzeichnis

Danksagung

Lebenslauf

Abstract

Abkürzungen und Einheiten

Abb.	Abbildung
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	cluster of differentiation
ConA	Concanavalin A
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Fab-	Antigen-bindendes Antikörperfragment
Fc-	kristallisierbares Fragment von Antikörpern
FceRI	hochaffiner Rezeptor für Immunglobulin E
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
IU	Internationale Einheiten
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
LPS	Lipopolysaccharid
М	Molar
МНС	major histocompatibility complex
ml	Milliliter
MNZ	mononukleäre Zellen
mRNA	"messenger" Ribonukleinsäure
Ν	Normalität (normal)
NK	natürliche Killerzellen
OKT3	kommerziell verfügbarer monoklonaler Antikörper
	gegen das Oberflächenantigen CD3
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PG	Prostaglandin
РНА	Phythämagglutinin
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
РКС	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMBZ	periphere mononukleäre Blutzellen
RBL-2H3	basophile Rattenleukämiezellinie 2H3
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TH-	T-Helfer
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
°C	Grad Celsius

1. Einleitung

1.1. Historischer Überblick

Mit dem Begriff Atopie (griechisch: atopos = ungewöhnlich) verbindet sich seit seiner Einführung von Coca und Cooke (1923) eine Krankheitsgruppe, in deren Rahmen der Organismus aufgrund einer genetischen Prädisposition über die Eigenschaft verfügt, auf Allergene seiner Umwelt immunologisch vermittelte Überempfindlichkeitsreaktionen zu entwickeln (Graß und Wahn, 1991). Die WHO definierte 1978 die Atopie als "aquired specific altered capacity of the subject to react in a different enhanced way to re-exposure to the particular agent, viable or nonviable". Damit wird eine Reihe von atopischen Erkrankungen wie das Asthma bronchiale. die Pollinosis. die atopische Dermatitis, Nahrungsmittelallergien und einige Formen der Urtikaria immunologisch charakterisiert. Der Begriff "Allergie" wurde bereits 1906 von Clemens Johann von Pirquet geprägt. Gemäß der griechischen Etymologie bedeutet Allergie ebenfalls das "Andersreagieren" eines Patienten auf irgendwelche Noxen. Bei den allergischen Erkrankungen wird die Einteilung der immunpathologischen Reaktionen in vier Typen nach Coombs und Gell 1975 angewendet. Zum Verständnis der Auslösungsmomente einer immunpathologischen Situation ist die Gell-Coombs-Klassifikation dienlich. Hierbei wird vorrausgesetzt, dass a) ein einzelner Reaktionstyp bei einer allergischen Person sehr selten zu beobachten ist und dass b) jeder der vier Reaktionstypen lediglich eine Anfangsphase darstellt, auf die meist eine Kaskade von Sekundärreaktionen folgt. Als Beispiel dienen die "late phase" Reaktionen, die als Folge einer IgE-bedingten Reaktion (Typ I) zu beobachten sind. Diese sind in der Gell-Coombs-Klassifikation nicht erwähnt, nehmen aber in Klinik und Therapie von Typ-I-Reaktionen eine wichtige Rolle ein (Gemsa, Kalden, Resch, 1997). Die Sofortreaktion wird als Typ-I-Reaktion bezeichnet. Spezifisches IgE auf Mastzellen oder Basophilen bindet das Allergen und wird kreuzvernetzt. Dadurch werden pharmakologische Mediatoren freigesetzt, die innerhalb von 20 Minuten zu klinischen Symptomen führen. Das Allergen kann auch lösliches IgE binden, der Komplex bindet an Fce-Rezeptoren

auf basophilen Granulozyten, die anschließend quervernetzt werden und eine Zellaktivierung bewirken. Prausnitz übertrug die Hypersensibilität seines Kollegen Küster gegen Fischeiweiß auf sich selbst, indem er dessen Serum unter seine Haut injizierte. Hiermit bewies er 1921 das Vorhandensein von Faktoren im Serum, die für die Symptome der allergischen Sofortreaktion verantwortlich sind. Diese Faktoren wurden von Coca und Grove 1925 als atopische Reagine bezeichnet. Diese Reagine wurden 1967 von Ishizaka als eine neue Klasse der Immunglobuline, das IgE, identifiziert. Die immunologische Definition der Typ-I-Hypersensitivität ist die IgE vermittelte Mastzelldegeneration. Bei der Typ-II-Reaktion sind Immunglobuline der Klassen IgG und IgM beteiligt. Diese richten sich gegen körpereigene Antigene. Es kommt zu zytotoxischen Reaktionen, die entweder durch Killerzellen oder Komplementfaktoren verursacht sind. Im Unterschied dazu sind bei der Typ-III-Reaktion hauptsächlich Immunkomplexe für die Vermittlung der Entzündungsreaktion verantwortlich, die Komplement binden. Die entstehenden Komplement-Spaltprodukte sind chemotaktische Faktoren und locken Neutrophile an. Sie führen somit zu einer lokalen Gewebsschädigung. Die Typ-IV-Reaktion unterscheidet sich von allen anderen drei Typen dadurch, dass spezifische Immunglobuline nicht oder nur am Rande beteiligt sind. Die Reaktion wird in erster Linie durch sensibilisierte T-Zellen ausgelöst. Die meisten klinischen Symptome können durch die zelluläre Infiltration und die Freisetzung von Zytokinen erklärt werden. Amplifiziert werden die Zytokineffekte durch aktivierte Makrophagen, die ihrerseits die Entzündung noch verstärken. Die verzögert einsetzende Überempfindlichkeit vom Typ IV wird auch "delayed type hypersensitivity" genannt.

1.2. Klinische Manifestation atopischer Erkrankungen

Für atopische Krankheitssymptome im Kindesalter ist charakteristisch, dass diese in bestimmten Entwicklungsphasen auftreten, eine bestimmte Zeit bestehen und dann oft eine Tendenz zur Rückbildung zeigen. Dabei stehen im chronologischen Ablauf die Nahrungsmittelallergien mit enteralen Symptomen und einem Beginn in den ersten Lebensmonaten an erster Stelle. Das Maximum der Manifestation der atopischen Dermatitis folgt um das erste Lebensjahr. Die Symptome des kindlichen Asthma bronchiale treten in den ersten beiden Lebensjahren auf, die allergische Rhinokonjunktivitis wird selten vor dem dritten Lebensjahr manifest (Graß und Wahn, 1991).

1.2.1. Allergische Reaktionen auf Nahrungsmittel

Die Häufigkeit von Nahrungsmittelallergien wird bei Kindern mit 5-20% angegeben (Bauer, 1990). Es handelt sich dabei um IgE-vermittelte Reaktionen:

- 1. Erbrechen, Kolik, Diarrhoe und Gedeihstörungen;
- 2. Urtikaria, Quincke Ödem, atopische Dermatitis;
- 3. Rhinitis, Asthma bronchiale;
- 4. Anaphylaktische Reaktion.

Für die Mehrzahl der Reaktionen sind nur wenige Nahrungsmittel verantwortlich. Häufige Allergene stammen aus Hühnerei, Kuhmilch, Nüssen, Soja und Fisch. Das Sensibilisierungsrisiko scheint von der Reife des Gastrointestinaltraktes sowie von Infektionen, welche die Integrität der gastroenteralen Schleimhautbarriere betreffen, beeinflusst zu werden. Die Mehrzahl der nahrungsmittelallergischen Säuglinge werden im Laufe einiger Jahre gegenüber den krankheitsauslösenden Allergenen tolerant. Eine Ursache hierfür wurde noch nicht gefunden (Graß und Wahn, 1991).

1.2.2. Atopische Dermatitis

Die atopische Dermatitis ist eine chronisch entzündliche Hauterkrankung, deren Pathogenese bislang nicht vollständig geklärt ist. Oft beginnt sie in den ersten Lebensmonaten als "Milchschorf" im Gesichtsbereich, neigt dann zur Generalisierung und über Jahre zur Persistenz. Im Verlauf bildet sie sich nicht selten spontan zurück, kann aber bis ins Erwachsenenalter weiterbestehen. Charakteristisch ist die symmetrische Lokalisation mit chronisch rezidivierendem Verlauf bei Xerodermie, anormaler Schweißproduktion, Erythem, Lichenifikation, papulovesikulären Veränderungen und quälendem Juckreiz. Zusätzlich besteht eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber viralen und bakteriellen Infektionen sowie Pilzinfektionen. Bei 80 % der Erkrankten besteht eine Erhöhung der IgE-Konzentration im Serum. Die Krankheitssymptomatik vereint Aspekte der IgEvermittelten Hypersensitivitäts-Reaktion, der IgE-vermittelten Spätreaktion, sowie der durch Lymphozyten induzierten Typ-IV-Reaktion (Voigtländer, 1987).

1.2.3. Asthma bronchiale

Das Asthma bronchiale ist die häufigste chronische Erkrankung im Kindes- und Jugendalter. 5,3 % aller Kinder bis 11 Jahren sind nach einer Studie von Croner et al. (1992) betroffen. Leitsymptome sind ein expiratorisches Giemen und Brummen, eine expiratorische Dyspnoe und Husten. Definiert werden kann das Asthma bronchiale als eine anfallsweise auftretende, in seltenen Fällen auch chronische, reversible Obstruktion der Atemwege, die begleitet wird von einer Hyperreagibilität des Bronchialsystems (Rheinhardt, 1987). Ein erheblicher Teil aller kindlichen Asthmatiker gehört zu der Gruppe der atopischen Patienten (extrinsisches oder allergisches Asthma bronchiale). Seltener besteht ein nicht atopieassoziiertes Asthma (intrinsisches oder nicht allergisches Asthma bronchiale).

1.2.4. Atopische Rhinokonjunktivitis

Die atopische Rhinitis ist definiert als eine IgE-vermittelte nasale Reaktion auf Allergene. Sie betrifft ca. 10 % der Kinder und ca. 20 % der Adoleszenten (Mygind 1996). Kennzeichnende Beschwerden sind nasale Obstruktion, wässrige Sekretion, Niesanfälle und Konjunktivitis. Üblicherweise wird sie in einer saisonale und ganzjährige Verlaufsform subklassifiziert. Patienten mit einer allergischen Rhinitis haben ein zwei- bis -dreifach erhöhtes Risiko, ein Asthma bronchiale zu entwickeln (Mygind, 1987).

1.3. Pathophysiologie der IgE-vermittelten allergischen Reaktion (Typ I nach Coombs and Gell)

Mehrere Teilschritte führen zur Entstehung der allergischen Entzündungsreaktion. Zunächst wird ein dem Immunsystem bis dahin unbekanntes Antigen durch dafür spezialisierte Zellen, die sogenannten Antigen-präsentierende Zellen (APZ) phagozytiert. Anschließend erfolgt die Spaltung in Antigenpeptide, die im Golgi-Apparat auf HLA-Moleküle aufgebracht werden. Diese Peptide mit einer Länge von 10-14 Aminosäuren werden nachfolgend T-Lymphozyten präsentiert. Im weiterem Verlauf werden T- und B-Zellen involviert und spezifische IgE-Antikörper gegen das neue Antigen produziert. Diese IgE-Antikörper sensibilisieren Mastzellen und basophile Granulozyten durch Bindung an IgE-Rezeptoren auf deren Oberfläche. Bei erneutem Kontakt mit demselben Antigen (Allergen) kommt es zur Degranulation der sensibilisierten Zellen und zur Entwicklung klinischer Symptome.

1.3.1. Antigenprozessierung und -präsentation

Nach derzeitiger Vorstellung wird ein Antigen durch eine Antigen-präsentierende Zelle (APZ) durch Endozytose internalisiert und innerhalb der APZ in Endolysosomen in Peptide zerlegt. Diese Peptide assoziieren wahrscheinlich intraendosomal mit MHC-Klasse-II-Molekülen und MHC-Klasse-II-Molekülen. Die Peptid-MHC-Komplexe wandern daraufhin zur Oberfläche der APZ, wo sie immunkompetenten T-Zellen präsentiert werden (Germain, 1993). Die Peptid-MHC-Klasse-II-Komplexe werden vorzugsweise T-Suppressorzellen und die Peptid-MHC-Klasse-II-Komplexe T-Helferzellen präsentiert, siehe Abb.1.



Abb. 1: Antigenprozessierung der APZ und Präsentation an die TH-Zelle

Eine T-Helferzelle (TH-Zelle), deren T-Zell-Rezeptor (TCR) spezifisch die dargebotene Oberflächenstruktur erkennt, kann nun die zusammen mit dem MHC-Klasse-II-Molekül an der Oberfläche der APZ vorhandene antigene Peptidsequenz erkennen. Die spezifische Bindung findet zwischen der APZ und TH-Zelle durch die Interaktion des MHC-II-Antigen-Komplexes mit dem TCR und dem Oberflächenantigen CD-4 statt. An der Signaltransduktion zwischen den beiden kommunizierenden Zellen sind auch unspezifische interagierende Moleküle wie CD3, CD2, CD28, CD58, CD54, CD154 CD11a und weitere Adhäsionsmoleküle beteiligt. Die APZ beginnt Interleukin-1 (IL-1) zu sezernieren, welches von dem IL-1-Rezeptor gebunden wird, der von der TH-Zelle exprimiert wird. Die TH-Zelle wird nur aktiviert, wenn sie beide Signale (Antigen-MHC-II-Komplex über TCR und IL-1 über den IL-1-Rezeptor) erhalten hat. Abhängig von der Art des Antigens, der Anwesenheit anderer Botenstoffe (IL-4, IL-12, IL-18, PGE1, PGE2) sowie wahrscheinlich noch unbekannter Faktoren werden bevorzugt entweder TH1- oder TH2-Zellen aktiviert. Diese unterscheiden sich in ihrem Zytokinproduktionsmuster und lösen folgende unterschiedliche Folgereaktionen aus. TH1-Zellen produzieren IL-2, IFN-y und TNF, während TH2-Zellen IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 sezernieren (Mosmann et al., 1991). Andere Zytokine, wie IL-3 und GM-CSF, werden von beiden T-Zell-Gruppen produziert. Diese Dichotomie des TH-Zell-Systems wurde zunächst in Mäusen nachgewiesen und bestätigte sich

zumindest tendenziell auch beim Menschen. Das Immunsystem eines Patienten mit atopischer Disposition scheint auf einen Antigenstimulus bevorzugt mit der Aktivierung von TH2-Zellen zu reagieren. Durch deren Zytokinsekretion wird die Immunantwort in Richtung einer allergischen Reaktion gesteigert. IL-4 stimuliert bevorzugt die IgE-Synthese, IL-5 stimuliert die Ausreifung und Proliferation von eosinophilen Granulozyten. IL-10 inhibiert die Synthese der antagonistisch wirkenden Zytokine der TH1-Zellen (Del Prete, 1992; zur Übersicht: Klein, 1991).

1.3.2. Regulation der IgE-Synthese

Bisherige immunologischen Untersuchungen bei atopischen Patienten legen die Vermutung nahe, dass eine Dysregulation der IgE-Synthese an der Entstehung atopischer Erkrankungen beteiligt ist. Bei der Regulation der IgE-Synthese scheinen Zytokine eine herausragende Rolle zu spielen. Deshalb soll der aktuelle Wissensstand über die an der IgE-Synthese beteiligten Mechanismen und Faktoren ausführlicher dargestellt werden.

1.3.2.1. Klassenwechsel bei der Immunglobulinsynthese, "Switch" zur IgE-Produktion

Immunglobuline bestehen aus zwei identischen leichten und schweren Ketten. Die aminoterminalen Enden beider Ketten bestimmen die Antigenspezifität und weisen eine große Variabilität auf (siehe Abb.2: Immunglobulin G-Struktur).



Fab-Fragment: Antigenbindendes Fragment Fc-Fragment: Effektorfunktion (Komplementbindung)

Abb. 2: Immunglobulin G-Struktur

Die Antigenspezifität der reifen B-Zelle wird während der B-Zell-Reifung durch Rekombination verschiedener variabler Gen-Loci (V-, D-, J-Regionen) festgelegt (zur Übersicht: Tonegawa, 1983). Die carboxyterminalen Enden der schweren Ketten zeigen innerhalb einer Subklasse konstante Aminosäuresequenzen. Diese konstanten Regionen sind für die verschiedenen Effektorfunktionen des Immunoglobulins, die Bindung an Fc-Rezeptoren auf verschiedenen Zelltypen und damit für die Auslösung unterschiedlicher Folgereaktionen verantwortlich. Plasmazellen können durch Exprimierung verschiedener Schwer-Ketten-Isotypen unterschiedliche Immunglobulinklassen bzw. Subklassen (IgM, IgD, IgG1-4, IgA1, IgA2, IgE) produzieren. Sie besitzen alle dieselbe V-D-J-Region, d.h. dieselbe Antigenspezifität. Der Wechsel zwischen den Immunglobulin-Klassen bei Erhalt des Idiotyps wird Klassen- oder auch Isotypenwechsel genannt. Der Isotypenwechsel resultiert aus der Rekonstruktion von Genen des VDJ-Segments an eines der Gene, die den konstanten Teil der schweren Kette eines Immunoglobulins codieren (CH-Gen). Dieser CH-Genlocus besteht beim Menschen aus 11 Genen, von denen 9 funktionelle Gene und 2 Pseudogene sind. Ihre Reihenfolge in 3'-Richtung ist C μ -C δ ...C γ 3-C γ 1-C α 1...C γ 2-C γ 1-C ϵ 1-C α 2. In 5'-Richtung eines jeden CH-Gens (außer vor C\delta) liegen Sequenzen, die an dieser Verknüpfung direkt beteiligt sind (siehe Abb.3). Sie werden S-Regionen genannt $(S\mu, S\gamma, S\varepsilon, S\alpha)$, sind 2-10 kB lang und bestehen aus Wiederholungen kurzer Nukleinsequenzen (z.B. GAGCT) (Blackwell et al., 1988; Esser et al., 1990).

Die Anwesenheit von IL-4 ist eine notwendige aber nicht ausreichende Voraussetzung für einen Isotypenwechsel zum IgE und für die damit ermöglichte IgE-Produktion.

Die Stimulation isolierter humaner B-Lymphozyten mit rekombinantem IL-4 induzierte zum Beispiel die Produktion eines "sterilen" 1,8 kb-ɛ-Keimbahn-Transkripts, dass alle 4 Cɛ-Exons enthielt (Gauchat et al., 1990). Eine IgE-Synthese trat dabei nicht auf. Erst ein zweites Signal führt gemeinsam mit IL-4 zur Bildung des produktiven 2,2 kb-ɛ-Keimbahn-Transkripts und damit zur Produktion von IgE.

Beim Menschen wurde eine Reihe von Signalen beschrieben, die zusammen mit IL-4 eine IgE-Produktion bei isolierten B-Zellen induzieren können. Hierzu gehören die Anwesenheit von T-Zellen, die Inkubation von B-Zellen mit anti-CD-40-Antikörpern oder Hydrokortison, sowie die EBV-Infektion. Keiner dieser Stimuli konnte allerdings in Abwesenheit von IL-4 einen Isotypenswitch zu IgE bzw. eine IgE-Produktion induzieren.



Abb.3: Entstehung von Immunglobulinklassen

Von der Keimbahn zum Immunglobulin (Holländer und Seger, 1994)

T-Zellen

Sowohl die Zugabe von spendereigenen (Vercelli et al., 1989a) als auch spenderfremden (Vercelli et al., 1990) T-Zellen zu isolierten B-Zellen kann die Fähigkeit zur IgE-Synthese in vitro wiederherstellen. Dabei ist ein direkter Zellkontakt zwischen B- und T-Zellen (siehe Abb.: 4). Voraussetzung für die IgE-Produktion. Dies zeigten Experimente in denen keine IgE-Synthese nachweisbar war, wenn die Zellen durch eine für Moleküle permeable, für Zellen jedoch undurchlässige Membran getrennt wurden. Nach Entfernung der Membran stellte

sich die IgE-Produktion wieder ein (Vercelli et al., 1990). Monoklonale Antikörper gegen das MHC-Klasse-II-Antigen sowie gegen den TCR/CD-3-Komplex unterdrücken die IgE-Synthese vollständig (Vercelli et al., 1990). Folglich wird angenommen, dass die Erkennung des MHC-Klasse-II-Antigens durch den TCR/CD-3-Komplex Teil der obligaten T/B- Zell-Interaktion ist. Die Beobachtung, dass anti-MHC-II-Antikörper und anti-CD4-Antikörper, aber nicht anti-MHC-I-Antikörper und anti-CD8-Antikörper die IgE-Produktion blockieren, zeigt, dass vor allem CD4 positive T-Helferzellen an der B/T-Zell-Interaktion beteiligt sind (Vercelli et al., 1990).



Abb.4: T-Zell/B-Zell-Interaktion

Außer dieser "cognate interaction" kann auch noch eine "noncognate interaction", bei welcher der T-Zellrezeptor nicht den B-Zell-MHC-Klasse-II/Peptidkomplex erkennt, eine IgE-Produktion realisieren. Das zeigen Experimente bei denen,

- sowohl CD4⁺ als CD8⁺ PHA aktivierte T-Zellklone bei B-Zellen unterschiedlicher Spender eine IgE-Synthese induzieren können, wenn IL-4 hinzugegeben wird (Parronchi et al., 1990) und
- 2. Zellen des EL-4-Thymoms der Maus bei menschlichen B-Zellen zusammen mit IL-4 und PMA eine IgE-Produktion auslösen (Zhang et al., 1990).

Welche Moleküle an dieser "noncognate interaction" beteiligt sind, bleibt bislang unklar.

T-Zell- unabhängige Systeme der IgE-Induktion

Um den Mechanismus, der bei der komplexen T/B-Zell-Interaktion zur IgE-Synthese führt, zu spezifizieren, wurden T-Zell-unabhängige Stimuli gesucht, welche die Funktion der T-Zellen ersetzen können. CD40 ist ein 50 kDa schweres Glykoprotein, das auf der Oberfläche aller humanen B-Zellen exprimiert wird (Ledbetter et al., 1987). Der natürliche Ligand von CD40 und die Art des Signals, das durch CD40 übermittelt wird, wurden 1992 von Armitage et al. entdeckt und zunächst als gp 39 (später als CD154) bezeichnet. Die Stimulation von B-Zellen mit IL-4 und monoklonalen Antikörpern gegen das Oberflächenantigen CD40 induzierte eine starke IgE-Produktion (Jabara et al., 1990a). Die Stimulation von IgE-produzierenden Zellen atopischer Patienten via CD40 konnte die IgE-Produktion auch ohne Zugabe von IL-4 steigern (Ke et al., 1991). Nach Stimulation humaner B-Zellen mit IL-4 und Infektionen mit EBV konnte eine T-Zell-unabhängige IgE-Produktion nachgewiesen werden (Thyphronitis et al., 1989; Jabara et al., 1990b). Auch nach Stimulation isolierter B-Zellen mit rekombinantem IL-4 und Hydrokortison konnte eine Induktion der IgE-Synthese beobachtet werden (Jabara et al., 1993). Die Mechanismen, mit denen Hydrokortison zusammen mit IL-2 eine IgE-Produktion auslöst, sind noch unbekannt.

1.3.2.2. Modulation der IgE-Synthese durch Zytokine und andere Mediatoren

An der Modulation der durch IL-4 und T/B-Zell-Interaktion in Gang gesetzten IgE-Synthese sind noch eine Reihe anderer Faktoren beteiligt.

Interleukin-2

Die Zugabe von IL-2 zu B/T-Zellkulturen bei Anwesenheit von IL-4 zeigte eine dosisabhängige Steigerung der IgE-Synthese (Maggi et al., 1989). Dagegen blockierten anti-IL-2-Antikörper sowie anti-IL-2-Rezeptor-Antikörper die IgE-Produktion in gemischten B/T-Zellkulturen, die durch den Überstand aktivierter T-Zellklone aktiviert wurden, fast vollständig (Maggi et al., 1989).

Interleukin-4

Neben der Induktion des Isotypenwechsels zum IgE hat IL-4 noch eine Vielzahl weiterer Effekte, die zur Verstärkung der IgE-Synthese führen. IL-4 liefert ein starkes Proliferationssignal für bereits aktivierte B-Zellen (Banchereau et al., 1991). Desweiteren induziert IL-4 die Expression von CD40 auf der Oberfläche von B-Zellen, einem Molekül, das eine wichtige Rolle bei der B-Zellproliferation und -differenzierung einnimmt (Ke et al., 1991). IL-4 induziert die Expression von CD23 (niedrig affiner IgE-Rezeptor) auf B-Zellen (Defrance et al., 1987), welches wiederum selbst eine Rolle bei der Stimulation und Regulation der IgE-Synthese einnimmt. Auch auf T-Zellen (Prinz et al., 1990), Monozyten/Makrophagen und Eosinophilen (Delespesse et al., 1989; Conrad, 1990) steigert IL-4 die CD23-Expression. Weiterhin regt IL-4 humane B-Zellen zur Produktion von löslichem CD23 an (Bonnefoy et al., 1988), von dem gezeigt werden konnte, dass es die T-Zellproliferation und -reifung unterstützt (Massalayi et al., 1990).

Interleukin-5

Auch IL-5 kann die IgE-Produktion steigern, besonders wenn suboptimale IL-4-Konzentrationen zur B-Zellstimulation verwendet werden. Bei optimalen IL-4-Konzentrationen konnte dagegen keine weitere Steigerung der IgE- Synthese durch IL-5 beobachtet werden (Pene et al., 1988a). Außerdem scheint IL-5 bei der Produktion von VDJ-c^{ϵ}-mRNA ein wichtiges Signal zu geben (Purkerson et al., 1992).

Interleukin-6

IL-6 ist bekannt als B-Zelldifferenzierungsfaktor, der in der späten Phase der B-Zelldifferenzierung tätig wird und dabei keine Isotypen bevorzugt (Maraguchi et al.,1988). IL-6 induziert die Sekretion von IgG1 durch Aktivierung der Transkription, selektive Akkumulation der mRNA und eventuell durch die Stabilisierung der mRNA (Raynal et al., 1989). Anti-IL-6-Antikörpern bewirken eine starke Verminderung der IL-4-induzierten IgE-Synthese in vitro (Vercelli et al., 1989b). Umgekehrt kann IL-6 in Kulturen mit T- und B-Zellen eine zwei- bis zehnfache Steigerung der IgE-Synthese erreichen (Maggi et al., 1989). Beides spricht dafür, dass endogen produziertes IL-6 eine wichtige Rolle bei der IL-4-induzierten IgE-Synthese einnimmt.

Interferon-y

INF- γ wird von T-Helfer-1-Zellen produziert. Die Produktion von INF- γ wird gesteuert durch IL-12 und IL-18, zwei regulatorische Zytokine, die von Monozyten und Makrophagen produziert werden. IFN- γ spielt als funktioneller Antagonist von IL-4 eine wichtige Rolle bei der IgE-Regulation. Sowohl bei Mäusen (Coffmann et al., 1986; Snapper et al., 1988; Rabin et al., 1986), als auch beim Menschen (Pene et al., 1988; Del Prete et al., 1988) konnte die inhibierende

Wirkung von IFN- γ auf die IgE-Synthese *in vitro* nachgewiesen werden. Der Mechanismus, mit dem IFN- γ die IL-4-Wirkung auf die IgE-Synthese inhibiert, ist noch nicht bekannt. Bei murinen B-Zellen, die mit IL-4 und LPS stimuliert wurden, unterdrückt INF- γ die Expression von ε -Schwerkettengenen deutlich (Severinson et al., 1990), während bei isolierten und mit IL-4 stimulierten humanen B-Zellen keine Inhibition nachzuweisen war (Chan et al., 1990). Dagegen zeigte Gauchat et al.(1990), dass IFN- γ die Transkription der ε -Schwerkettengene nach Stimulation von B-Zellen mit IL-4 bei Anwesenheit von T-Zellen blockierte. Auch die IL-4 induzierte Expression von Fc ε RII/CD23 auf B-Zellen wird durch IFN- γ blockiert (Defrance et al., 1987). Umgekehrt wird die Produktion von IFN- γ durch IL-4 vermindert, und zwar sowohl auf der Ebene der Proteinproduktion als auch auf mRNA-Ebene (Gauchat et al., 1990).

Interferon- α

IFN-α blockiert die IL-4-induzierte IgE-Synthese mononukleärer Zellen gesunder Spender und die spontane IgE-Sekretion mononukleärer Zellen atopischer Patienten dosisabhängig. Diese Inhibition wirkt auf mRNA-Ebene (Gauchat et al., 1991). Der inhibierende Effekt auf die IgE-Produktion beruht sowohl bei IFN- γ als auch bei IFN-α nicht auf toxischen Effekten. Die IgG-, IgM- und IgA-Produktion wird durch beide Zytokine nicht beeinflusst (Rousset et al., 1991).

Prostaglandin E2

Prostaglandin E_2 blockiert die IL-4-induzierte IgE-Synthese dosisabhängig (Pene et al., 1988a). Außerdem inhibiert es (ebenso wie INF- α und INF- γ) die Expression von CD23 (Pene et al., 1988b). Neuere Untersuchungen zeigten allerdings eine die IgE-Produktion unterstützende Wirkung von PGE₂ und PGE₁ durch Supprimierung von TH1-Zytokine (v.a. INF- γ), während die Sekretion der TH2-Zytokine unbeeinflusst blieb bzw. verstärkt wurde (Betz et al., 1991).

Soluble CD23

Lösliches CD23 ist der "low-affinity receptor" für IgE (Hoeger et al., 1994). Die Bedeutung des löslichen CD23 ist zur Zeit nicht vollständig aufgeklärt. Lösliches CD23 welches von der lymphoblastischen Zell-Linie RPMI 8866 produziert wird, steigerte die IgE-Produktion von B-Zellen atopischer Patienten (Safari et al., 1984). Einige monoklonale Antikörper gegen CD23 blockierten sowohl die IL-4-induzierte IgE-Produktion von B-Zellen gesunder Blutspender als auch die spontane IgE-Produktion von B-Zellen atopischer Patienten (Bonnefoy et al., 1990). Außerdem wurde eine positive Korrelation zwischen den Serum-IgE-Spiegeln von Patienten mit hohen bis mittleren IgE-Werten und der Serumkonzentration für lösliches CD23 gefunden (Bujanowski-Weber et al., 1990).

1.3.3 Sensibilisierung

IgE, welches nach erstmaligem Antigenkontakt gebildet wird, bindet mit hoher Affinität mit seinem Fc-Anteil an Fc-Rezeptoren (FcɛRI) auf Mastzellen und basophilen Granulozyten. Mit niedriger Affinität bindet IgE an Fcɛ-Rezeptoren (FcɛRII) auf B-Zellen, Makrophagen, Monozyten, Thrombozyten und Eosinophilen (Metzger et al., 1986). Diese initiale Bindung hat keinen stimulierenden Effekt. Eine Degranulation von Mastzellen wird nicht beobachtet.

1.3.4. Degranulation

Bei erneuter Exposition eines sensibilisierten Organismus kann ein multivalentes Allergen über Bindung an mindestens zwei IgE-Moleküle zu einer Aggregation der Fcɛ-Rezeptoren führen. Die Aggregation der Fcɛ-Rezeptoren stellt ein Signal dar, das über intrazelluläre Vorgänge zu einer Degranulation führt. Zu den freigesetzten Mediatoren der Mastzellen gehören Histamin, Heparin, Prostaglandin D, Tryptase, saure Hydrolasen, TNF-α und IL-4 (Plaut et al., 1989). Basophile Granulozyten setzen eine Vielzahl von Mediatoren frei. Hierzu gehören Histamin, Leukotriene (LTC4, LTD4, LTB4), thrombozytenaktivierender Faktor, TNF-α und Enzyme wie Kallikrein, Präkallikreinaktivator, Betahexosamindase, Arylsulfatase und Hagemannfaktor-Aktivator (Zweiman, 1988). Bereits 1986 konnte eine IgE-Rezeptor assoziierte Tyrosinkinaseaktivität demonstriert werden. Nach Verfügbarkeit Tyrosinkinase-spezifischer Antikörper Anfang der neunziger Jahre wurde nach FccRI-Stimulation ein tyrosinphosphoryliertes Protein mit dem Molekulargewicht von 72 kDa (pp72) beschrieben (Benhamou et. al., 1990). Anhand von Untersuchungen am Model der Rattenmastzell-Linie RBL-2H3 charakterisierte Stephan (1997) Mechanismen der Signalübertragung nach Aktivierung des hochaffinen IgE-Rezeptors sowie Möglichkeiten der immunologischen pharmakologischen Modulation der allergischen und Sofortreaktion. In seinen Untersuchungen wird das Phosphoprotein pp72 bereits IgE-Rezeptors nach Stimulation des hochaffinen wenige Sekunden phosphoryliert. Die Induktion der pp72-Phosphorylierung ist IgE-Rezeptoral., 1997); die spezifisch (Stephan et Stimulation alternativer Signalübertragungswege (G-Protein-Aktivierung oder Proteinkinase Cpharmakologische Erhöhung der Aktivierung, intrazellulären Calciumkonzentration) führt zur Mastzelldegranulation ohne begleitende pp72-Phosphorylierung. Das Phosphoprotein pp72 ist somit ein IgE-Rezeptor spezifisches Substrat. Die Bedeutung der Tyrosinkinase p72^{syk} als eines der Bestandteile von pp72 im Rahmen der IgE-Rezeptor-Aktivierung in basophile Leukozyten der Ratte und des Menschen wird diskutiert. Ein weiteres Phosphoprotein pp110 wird ca. 15 min. nach IgE-Rezeptorstimulation nachgewiesen. Dieses "späte Substrat" ist an die Zelldegranulation gebunden und wird durch IgE-unabhängige Mechanismen (G-Protein-Aktivierung in gentechnisch veränderten Mastzellen und pharmakologische Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration) ebenfalls aktiviert. Das Phosphoprotein pp110 ist anderen bekannten IgE-induzierten Signalübertragungsmechanismen nachgeordnet; seine Identität ist bisher nicht gesichert (Stephan et al. 1997).

1.3.5 Frühphase der allergischen Sofortreaktion

Die allergische Sofortreaktion ist durch die Synthese von allergenspezifischem Ε gekennzeichnet. Auf klinisch Immunglobulin eine stumme Sensibilisierungsphase folgt die Effektorphase mit den bekannten Symptomen wie Urtikaria, Konjunktivitis, Rhinitis und Asthma. Die Aufnahme der Allergene erfolgt über die Grenzflächen des Körpers, Haut und Schleimhäute, oder parenteral. Nach Aufbereitung durch spezialisierte Antigenpräsentierenden Zellen (Monozyten, Makrophagen, Langerhanszellen, dendritische Zellen) werden immunogene Peptide an HLA-Klasse II Moleküle gebunden und T-Zellen präsentiert, die über antigen-spezifische Rezeptoren verfügen. Nach Bindung allergen-spezifischer IgE-Moleküle an IgE-Rezeptoren hoher Affinität und der Kreuzvernetzung dieser Rezeptoren durch multivalente Allergene kommt es zur Aktivierung eines komplexen Signalübertragungsnetzwerkes, welches schließlich in der Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Zytokinen aus basophilen Leukozyten und gewebsständigen Mastzellen resultiert. Die Aktivierung kann jedoch auch durch IgE-unabhängige Mechanismen wie Anaphylaktoxine (C3a, C5a) und Zytokine (IL-3, c-kit-Ligand) sowie pharmakologische Substanzen (z.B. Narkotika) ausgelöst werden. Die Wirkung dieser Enzündungsmediatoren (z.B. Histamin) aus basophilen Leukozyten und gewebsständigen Mastzellen unterscheiden sich je nach dem Gewebe, in dem sie freigesetzt werden. Zu ihnen gehören Kontraktionen glatter Muskelzellen, vaskuläre Lecks, Vasodilatation, arterieller Hypotonus, muköse Sekretion, Schwellung, Juckreiz, Rötung und Schmerz. Diese Symptome setzen innerhalb von Minuten ein und lassen nach 30-60 Minuten wieder nach.

1.3.6. Spätphase der allergischen Sofortreaktion

Nach Ausschüttung chemotaktischer Stoffe durch Mastzellen kommt es innerhalb von Stunden zur Einwanderung von Eosinophilen, Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten. Diese Zellen können durch eine Reihe immunologischer Substanzen (Thromboxan A4, LTB4, thrombozytenaktivierender Faktor) oder durch Bindung des Allergens an den Antigenrezeptoren aktiviert werden und setzen ihrerseits eine Vielzahl von Mediatoren frei. Alle genannten Zellen können durch die Sekretion einer Vielzahl proinflammatorischer Substanzen zum Entzündungsgeschehen beitragen, so dass die initiale IgE-Mastzellen/Basophilen-Stimulation in eine komplexe, durch spezifische interzelluläre Wechselwirkungen gekennzeichnete, zahlreiche allgemeine Entzündungsreaktion übergehen kann. Dieses bewirkt nach 3-8 Stunden eine allergische Spätreaktion, die mehr als 72 Stunden andauern kann. Charakteristische Symptome sind dabei brennende Schmerzen, Dysästhesie, Erythem und Induration (zur Übersicht: Klein, 1991).

1.4. Immunologische Besonderheiten bei Atopikern

Im Serum von Patienten mit atopischen Erkrankungen sind, im Vergleich zu Gesunden, sehr häufig erhöhte IgE-Konzentrationen zu finden, bei sicherer atopischer Erkrankung in 80-94% der Fälle (Wüthrich, 1975; Kjellman, 1987). Daher wird angenommen, dass eine Störung der Regulation der IgE-Synthese in der Pathogenese atopischer Erkrankungen eine Rolle spielt. Bei Patienten mit atopischer Erkrankung scheinen Faktoren, die die IgE-Synthese fördern, vermehrt, inhibierende Faktoren dagegen vermindert zu sein. Diese Vermutung wird durch folgende Befunde bei Atopikern unterstützt: Die spontane in vitro IL-4-Produktion von Patienten mit atopischer Dermatitis ist erhöht (Rousset et al., 1991). Desweiteren ist die Zahl IL-4-produzierender T-Zellen erhöht (Romagnani et al., 1989). Die Mehrzahl der allergenspezifischen T-Zellklone von atopischen Patienten produziert nach Stimulation große Mengen IL-4 und IL-5, dagegen nur geringe Mengen IFN-y (Parronchi et al., 1991). Somit gehören die allergenspezifischen T-Zellklone zur TH2-Population. Zusätzlich zu einer hohen IgE-Produktion in vitro zeigten Patienten mit atopischer Dermatitis eine verstärkte CD23-Expression auf B-Zellen und Monozyten (Vercelli et al., 1988). Da IL-4 eine wichtige Rolle sowohl bei der IgE-Produktion als auch bei der CD23Expression auf B-Zellen (DeFrance et al., 1987) und Monozyten einnimmt, lassen diese Beobachtungen vermuten, dass die atopische Dermatitis mit einer vermehrten IL-4-Sekretion *in vivo* vergesellschaftet ist. Die *in vitro* IFN- γ -Produktion peripherer mononukleärer Zellen von Patienten mit atopischer Dermatitis ist stark vermindert. Diese Verminderung zeigte sich nach Stimulation mit verschiedenen Aktivatoren wie PHA, OKT3, Ionomycin mit TPA und IL-2 (Reinhold et al., 1990). Die Fähigkeit zur *in vitro* INF γ -Produktion korrelierte negativ zu den IgE-Serumtitern der Patienten (Reinhold et al., 1988). Beschrieben wurde auch eine herabgesetzte Proliferationsgeschwindigkeit von T-Zellen nach Stimulation via CD2 oder CD3 mit monoklonalen Antikörpern, eine verminderte Expression von CD25-Antigen (IL-2-Rezeptor) und eine verminderte IL-2-Produktion als Nicht-Atopiker (Romano et al., 1992).

Patienten mit atopischen Erkrankungen wiesen in weiteren Untersuchungen zahlreiche unterschiedliche immunologische Auffälligkeiten auf. Hierzu gehören eine verminderte Produktion und Anzahl der Suppressorzellen (Butler et al., 1982), eine verminderte Anzahl von natürlichen Killerzellen, eine Vermehrung der CD4⁺ und eine Verminderung der CD8⁺ T-Zellen (Reinhold et al., 1990). Die Chemotaxis von Granulozyten und Monozyten ist bei Atopikern vermindert (Leung und Geha, 1986). Die hier aufgeführten Befunde stammen ausnahmslos von erwachsenen Patienten mit aktiver atopischer Erkrankung.

1.5. Interleukin-2

Das IL-2 war zuerst unter dem Namen T-Zellwachstumsfaktor bekannt. Das humane IL-2-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 4 (Bande q26-28) lokalisiert (Siegel et al., 1984). Dieses Gen kodiert für ein 15,5 kDa schweres Glykoprotein, dass aus 133 Aminosäuren besteht und hauptsächlich von aktivierten T-Zellen produziert wird. Ruhende T-Zellen produzieren kein IL-2. Nach einer Aktivierung von T-Zellen durch Lektine oder Antikörper wird das IL-2-Gen binnen 30 Minuten transkribiert (Depper et al., 1985). Posttranslationell werden variable Kohlenhydratketten an die Aminosäure Threonin in Position 3

angefügt und die ersten 20 Aminosäuren als Signalpolypeptid abgespalten. Die Kohlenhydratketten haben keinen Einfluss auf die Aktivität des IL-2 (Robb et al., 1983). Die Tertiärstruktur des IL-2-Moleküls besteht aus sieben verbundenen α -Helices (Brandhuber et al., 1987). Die Freisetzung erfolgt innerhalb von Stunden nach der Aktivierung der T-Zellen (Ullman et al., 1990). IL-2-Rezeptoren können aus drei Untereinheiten gebildet werden (siehe Abb.5), einer α -, β - und γ -Kette. IL-2-Rezeptoren mit Beteiligung der β - und γ -Ketten zeigen eine hohe Affinität zum IL-2 und sind wahrscheinlich als einzige in der Lage, nach Internalisation des IL-2/IL-2-Rezeptorkomplexes eine Signaltransduktion auszulösen. α -, β - und γ -Ketten formen gemeinsam den "high affinity" Rezeptor. Die α -Kette alleine bindet IL-2 nur mit geringer Affinität ("low affinity" Rezeptor). Sie wird nicht internalisiert und löst auch keine Folgereaktionen aus (Voss et al., 1994).



Abb.5: Signalübertragung über den IL-2-Rezeptor

IL-2-Rezeptoren finden sich auf unterschiedlichen Zellpopulationen, darunter aktivierten B- und T-Zellen, NK-Zellen und Monozyten. Nach Bindung von IL-2 an einen "high affinity" Rezeptor wird der gesamte Komplex internalisiert (Fung et al., 1988). Die Signale für die Zelle werden durch die IL-2-Rezeptor- β -

Untereinheit vermittelt. Der genaue Mechanismus der Signaltransduktion ist bislang noch unklar. Möglicherweise spielt die Aktivierung einer Tyrosinkinase (Janus Kinase, siehe Abb.5) eine wichtige Rolle (Asao et al., 1990). Einige Zielzellen und die durch IL-2 ausgelösten Effekte sind in Tabelle 1. aufgeführt.

Zielzellen	Effekte
Aktivierte T-Zellen	Klonale Proliferation (Robb, 1984)
	IFNγ-Produktion (Farrar et al., 1982)
	IL-4-Produktion (Howard et al., 1983)
Aktivierte B-Zellen	Proliferation, Ig-Synthese (Jelinek et al., 1987)
Monozyten	Aktivierung
NK-Zellen	Vermehrte Zytolyse-Aktivität IFNγ-Produktion (Trinchieri et al., 1984)

Tab. 1. IL-2: Zielzellen und Effekte

1.6. Interleukin-4

Das Gen für das humane IL-4 liegt auf Chromosom 5q23-31, besteht aus 4 Exons und 3 Introns und hat eine Länge von 10 kb. Es kodiert für ein aus 153 Aminosäuren bestehendes Precursorprotein, aus dem nach Abspaltung von 24 Aminosäuren und Glykosylierung an Aminosäure 38 das speziesspezifische Glykoprotein IL-4 entsteht (Yokota et al., 1988). IL-4 wird hauptsächlich von T-Lymphozyten produziert. Im Maussystem erfolgt die IL-4-Produktion von einer T-Zellsubpopulation, die als TH2 bezeichnet wird und deren Vorhandensein auch beim Menschen nachgewiesen wurde (Romagnani et al., 1992). Weitere IL-4-Produzenten sind Mastzellen (Plaut et al., 1989), Knochenmarkstromazellen (King et al., 1988) und Thymozyten (Paliard et al., 1988). IL-4 ist ein Zytokin mit breitem biologischem Wirkungssprektum. Im Rahmen der allergischen Immunantwort schafft IL-4 die Voraussetzung für den Isotypenwechsel zum IgE und spielt eine wichtige Rolle bei Reifung, Aktivierung und Proliferation von B- Zellen (s. Kap. 1.3.). Hierdurch erklärt sich der ursprüngliche Name B-Zellwachstumsfaktor. Der IL-4-Rezeptor ist ein Glykoprotein von 140 kDa Gewicht. Der IL-4-Rezeptor wird von einer großen Zahl von Zelltypen exprimiert, wie T- und B-Lymphozyten, Monozyten, Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen (Galizzi et al., 1990). Er gehört zu der Hämatopoetin-Rezeptor-Superfamilie der u.a. auch Rezeptoren von IL-2, IL-3, IL-6, IL-7 und Erythropoetin zugerechnet werden (Idzerda et al., 1990). Die γ -Kette es IL-4-Rezeptors kommt auch beim IL-2- und IL-7-Rezeptor vor. Die intrazellulären Mechanismen, mit denen IL-4 seine biologische Aktivität vermittelt, werden noch kontrovers diskutiert. Mögliche Signalvermittler sind eine Erhöhung von intrazellulärem Kalzium, cAMP und Inositoltriphosphat (Finney et al., 1990).

1.7. Interferon-gamma

Das Gen für INF- γ liegt auf Chromosom 12 und besteht aus 3 Introns und 4 Exons (Gray und Goeddel, 1982). Es kodiert ein Glykoprotein, das nach C-terminaler Abspaltung eines Signalpeptids 127-134 Aminosäuren lang ist (Rinderknecht et al., 1984). INF- γ wird von T-Zellen und NK-Zellen nach Stimulation durch IL-12 und IL-18, die von Monozyten und Makrophagen produziert werden, gebildet. Induziert wird die IFN- γ -Expression zudem durch Antigene, Mitogene (z.B. ConA, PHA) und IL-2. Der IFN- γ -Rezeptor ist ein Glykoprotein aus 472 Aminosäuren, das außer auf reifen Erythrozyten auf fast allen Zelltypen vorkommt. Seine Dichte variiert zwischen 500 und 10000 Rezeptoren pro Zelle (Gray et al., 1989). Nach Bindung an seinen Rezeptor wird INF γ gemeinsam mit dem Rezeptor durch Endozytose internalisiert. Dieser Komplex ist auch für die Signaltransduktion verantwortlich (Filgueira et al., 1989). Eine Übersicht über die Funktion des IFN γ gibt Tabelle 2 (Übersicht in Maeyer et al., 1991). Interferone sind im Vergleich zu anderen Zytokinen durch eine größere Speziesspezifität gekennzeichnet.

Zielzellen	Effekte
Multiple*	Induktion von MHC-Klasse-I-Antigenen (gering)
	Induktion von MHC-Klasse-II-Antigenen (stark)
Myelo-	Induktion von FcyRI-Rezeptoren
monozytäre	Differenzierung
Zellen	Aktivierung von reifen Granulozyten und Monozyten
	Steigerung der Zytotoxizität von Makrophagen
T-	Steigerung der zytotoxischen Aktivität von zytotoxischen T-
Lymphozyten	Zellen
	Vermehrte Generation von T-Suppressorzellen durch
	Steigerung der MHC-Klasse-II-Antigenexpression auf
	Makrophagen
	Induktion von TH2-Zellen
	Induktion einer präferentiellen TH1-Reaktivität in TH0-Zellen
	z.T. auch Hemmung der T-Suppressorzellfunktion
B-	Differenzierung
Lymphozyten	Hemmung der IL-4-Wirkung
	Steigerung der Produktion von Immunglobulinleichtketten
NK-Zellen	Steigerung der Aktivität

*Monozyten/Makrophagen, T- und B-Lymphozyten, Kapillar-Endothelzellen, Tumorzellen

Tab.2. INF-γ:Zielzellen und Effekte

1.8. Immunfluoreszenz

Fluoreszierende Farbstoffe wie z.B. Fluoreszein oder Phycoerythrin können an Antikörper gekoppelt werden, ohne dass deren Spezifität verändert oder die Affinität dadurch gemindert wird. Solche Konjugate können daher an Antigene binden und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden. Man kann so die Verteilung von Antigenen in Geweben und Zellen darstellen. Andererseits kann diese Methode auch dazu verwendet werden, um Antikörper gegen Antigene nachzuweisen, deren Vorhandensein in einem Gewebeschnitt oder in einer Zellpräparation bekannt ist. Dieses Prinzip wird in drei unterschiedlichen Methoden angewendet (Roitt, Ivan M., 1993).

1. Direkte Immunfluoreszenz: Die Antikörper gegen das Gewebesubstrat werden mit dem fluoreszierenden Farbstoff konjugiert und direkt aufgebracht.

2. Indirekte Immunfluoreszenz: Bei dieser Doppelschicht-Technik werden zunächst die unmarkierten Antikörper direkt auf das Gewebe aufgetragen und anschließend durch fluoreszenz-markiertes Anti-Immunglobulin sichtbar gemacht. Diese Technik hat den Vorteil, dass die Fluoreszenz durch einen Verstärkungseffekt deutlicher ist als beim direkten Testverfahren, weil jeweils mehrere fluoreszierende Anti-Immunglobulin-Antikörper an jedes Antikörpermolekül der ersten Antikörperschicht binden.

3. Sandwich-Technik: Mit dieser Technik können spezifische Antikörper sichtbar gemacht werden. Soll beispielsweise nachgewiesen werden, wie viele Zellen in einem Präparat aus lymphatischem Gewebe Antikörper gegen Pneumokkoken-Polysaccharid synthetisieren, so werden die Zellen zunächst mit Ethanol fixiert, um ein Auswaschen der Antikörper während der Untersuchung zu verhindern, und dann mit einer Lösung des Polysaccharid-Antigens inkubiert. Nach dem Waschen wird schließlich ein Fluoreszein-markierter Antikörper gegen das Polysaccharid hinzugefügt, um die Zellen zu identifizieren, die das Antigen spezifisch gebunden haben.

1.9. Reaktion mit Zelloberflächen-Antigenen

Oberflächenantigene können mittels markierter Antikörper nachgewiesen und lokalisiert werden. Da Antikörper in die lebende Zelle nicht ohne weiteres eindringen können (hierzu bedarf es der Endozytose), führt die Inkubation von Zellen mit markierten Antikörpern im kalten Milieu (wo kaum Endozytose stattfindet) zur ausschließlichen Bindung von Oberflächenantigene.

1.10. Durchfluss-Zytometrie

Die Weiterentwicklung immunologischer Untersuchungsmethoden führte zur Entwicklung der Durchflußzytometrie und insbesondere der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung (FACS). Mit der FACS-Technik ist es möglich, kleine Subpopulationen von Zellen zu charakterisieren und auch funktionell zu untersuchen. Die analytische Stärke des Durchflußzytometers resultiert aus den raschen quantitativen und multiparametrischen Messungen von großen Zellzahlen, so dass Zellpopulation oder Komponenten ihrer Subpopulationen definiert werden können. Populationen werden quantitativ auf der Basis eines bestimmten Markers identifiziert und nicht nur allein durch Vorhandensein oder Fehlens des Markers. Die multiparametrische Analyse kombiniert Messungen von intrinsischen Eigenschaften, wie der Zellgröße und der Granularität (untersucht mit dem "light scatter" und "forward scatter") mit der qualitativen und quantitativen Erfassung von Zelloberflächen-Fluoreszenzen. Dieses ermöglicht die Evaluierung von diskreten Zellpopulationen in komplexen Mixturen (Weir, Handbook of experimental Immunology, 1-4, Oxford, 1986). Durchflußzytometrischen Messungen können derzeit nur von Zellen in Suspension vollzogen werden. Insofern sind sie komplementär zur Mikroskopie, welche sowohl Informationen über Gewebearchitektur und Zell-Lokalisation als auch über die Verteilung der zellulären Fluoreszenz liefert. Diese Möglichkeiten sind unerlässlich, um den Immunstatus eines Individuums zu ermitteln, um die Zelloberflächen-Antigenmodulation zu verfolgen oder um die intrazelluläre Fluoreszenz von der oberflächlichen Fluoreszenz zu unterscheiden. Der Nachweis von intrazellulären Antigenen mit fluoreszierenden Antikörpern ist möglich, nachdem die Zellen mit Glutaraldehyd leicht fixiert und für die Antikörper durchlässig gemacht wurden (Roitt, I., M., Leitfaden der Immunologie, 1993).

Durch die inzwischen mögliche Fluoreszenztechnik mit drei verschiedenen Farbstoffen können heute für jede einzelne Zelle Kombinationen von drei verschiedenen Antigenen auf Zelloberflächen oder im Zellinneren gleichzeitig sichtbar gemacht werden.

2. Aufgabenstellung

Atopische Erkrankungen gehen sehr häufig mit einem erhöhten IgE-Spiegel im Serum der Erkrankten einher. Eine Fehlregulation der IgE-Synthese ist wahrscheinlich an der Entstehung atopischer Krankheitsbilder beteiligt. Maßgeblich an der Regulation der IgE-Synthese sind die Zytokine IL-2, IL-4 und IFN-γ.

Bisherige Ergebnisse:

Die Existenz von T-Helfer-1- und T-Helfer-2-Zellen/Vorläuferzellen im peripheren Blut scheint gesichert. Die Zellpopulationen unterscheiden sich auf klonaler Ebene durch ein unterschiedliches Zytokinproduktionsmuster. T-Helfer-1-Zellen produzieren v.a. IFN-γ, IL-2 und IL-6, während T-Helfer-2-Zellen v.a. IL-4, IL-6 und IL-10 produzieren. T-Zellen von Patienten mit atopischen Erkrankungen zeigen eine verminderte IFN-γ-Sekretion.

Hypothesen:

Patienten mit atopischer Erkrankung haben eine Vermehrung von TH2-Zellen und/oder eine Verminderung von TH1-Zellen. Die INF-γ-Produktion bei Atopikern ist quantitativ vermindert, entsprechend die IL-4-Produktion vermehrt. In der vorliegenden Arbeit soll die Frage untersucht werden, ob bei Erwachsenen mit atopischer Erkrankung im Vergleich zu altersentsprechenden Kontrollen die Frequenz von TH1- und TH2-Zellen in dem oben postulierten Sinne verändert ist. Zudem soll untersucht werden, ob T-Zellen von Patienten mit atopischer Rhinitis im Vergleich zu gesunden Blutspendern eine im Sinne der TH2-Reaktivität verschobenes Zytokinsekretionsmuster zeigen. Außerdem soll untersucht werden, ob das verschobene Zytokinmuster auf einer veränderten Frequenz von TH2- bzw. TH1-Zellen beruht, oder ob sich die Unterschiede in der Zytokinsekretion aufgrund einer beeinträchtigten quantitativen Zytokinsekretion ergeben.

Zur Etablierung der Meßmethode und Optimierung der Produktionsbedingungen wurde zunächst die Methodik im Sinne optimaler Versuchsbedingungen und der Kinetik des synthetisierten IL-2, IL-4 und IFN- γ erstellt. Hierzu wurde die optimale Kulturdauer und Mitogenkonzentration für die Produktion jedes einzelnen Zytokins bestimmt.

3. Material und Methodik

3.1 Patienten und Kontrollen

Untersucht wurde das Blut von 19 Erwachsenen zwischen 25 und 37 Jahren und das Blut eines Kindes im Alter von 12 Jahren. Unter den Probanden befanden sich 8 Atopie-Patienten einschließlich des Kindes und 12 Kontrollpersonen. Bei den Kontrollpersonen war die Anamnese bezüglich atopischer Erkrankungen negativ und das Gesamt-IgE im Serum im Normbereich. Das klinische Symptom bei den Atopikern war eine allergische Rhinokonjunktivitis.

3.2 Blutprobengewinnung

Die Blutentnahme erfolgte bei allen Probanden aus einer peripheren Armvene. Das Blut wurde mit 35 I.U. Heparin-Natrium (Liquemin R) pro ml versetzt, um eine ausreichende Antikoagulation zu gewährleisten. Die Proben wurden nach der Blutentnahme sofort verarbeitet.

3.3 Materialien

3.3.1 Reagenzien für die Zellseparation

Ammoniumchloridlösung 0.83%ig (Apotheke der Universitätskliniken Düsseldorf) Ficoll- Paque (Pharmacia LKB 17-0840-03) Heparin-Natrium (Liquemin Hoffman-La-Roche-AG) Lyse- und Hämoglobin-Reagenz (MEXXOLYS MEXXEM, Düsseldorf) PBS pH 7.3 (Apotheke der Universitätskliniken Düsseldorf)

3.3.2 Medien und Zusätze

Fetales Kälberserum (FCS) (Gibco, BRL) Glutamin (Gibco/UK) Penicillin/Streptomycin (Flow Laboratorien, Schottland) RPMI 1640- Medium (Biochrom KG, Berlin)

3.3.3. Mitogene und Reagentien

Phytohämaglutinin-PHA-P (Wellcome Diagnostics, Dartford, England) Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) (Hölzel Diagnostika, Köln) Calcium-Ionophor-Ionomycin (Hölzel Diagnostika, Köln) Monensin (Hölzel Diagnostika, Köln)

3.3.4. Geräte

Brutschrank Kühlzentrifuge Proben-Waschautomat 96 ELISA-Reader, Titertek Multiscan Plus, ICN Flow Sterile Werkbank Zellcounter BC-1 (MEXXEM) Durchflußzytometer, FACScan, Becton Dickinson

3.3.5 Immunoassays

Human IL-2 ELISA (Laboserv) Human IL-4 ELISA (Laboserv) Human IFN-γ ELISA (Laboserv)
3.3.6. Fluoreszenzfarbstoffe, an Antikörper gebunden

Phycoerythrin (PE) Fluorescein-isothiocyanat (FITC)

3.3.7. Monoklonale Antikörper

a) CD3, CD4, CD8, CD14, CD20, CD25, HLADR, Simultantest Control = IgG1/IgG2a, (Becton-Dickinson)
b) CD29, CD45 RA, (Coulter)

3.3.8. Intrazelluläre Zytokinbestimmungen für die Durchflußzytometrie mit ICS-Testkits von Hölzel Diagnostika, Köln

Human IL-2-ICS Human IL-4-ICS Human INF-γ-ICS

3.3.9. Verbrauchsmaterial

Combitips (Eppendorf, Hamburg) Einfrierröhrchen Falcon-Tubes (Becton-Dickinson, USA) Falcon 12 -Well Rundbodenplatten (Becton-Dickinson, USA) Pipetten, steril (Becton-Dickinson, USA) Pipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg) Eppendorfhütchen, steril FACS-Tubes, Falcon round bottom tubes

3.4. Zellseparationsverfahren

Mononukleäre Zellen (MNC) aus peripherem Blut wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Medium mit einer Dichte von 1.077 g/ml (20°C) über einen diskontinuierlichen Dichtegradienten isoliert. Nach 1:1-Verdünnung des heparinisierten Blutes mit PBS wurden maximal 25 ml dieses Gemisches auf 15 ml Ficoll überschichtet und 20 Minuten bei 750 g zentrifugiert. Dabei bildete sich an der Grenzfläche zwischen Serum und Ficoll ein Interphasering, in dem sich die mononukleären Zellen anreichern, deren Dichte geringer ist als die des Trennmediums. Die Zellen in der Interphasefraktion wurden mit einer sterilen Pipette abgesaugt und in eine sterile Falcon-Tube überführt. Die gewonnenen Lymphozyten wurden für 5 Minuten mit Ammoniumchoridlösung (0.83%ig) inkubiert. Dadurch wurden die verbleibenden Erythrozyten lysiert. Anschließend durchlief die Zellfraktion zweimal einen Waschzyklus durch Zugabe von Kulturmedium und anschließender Zentrifugation bei 200 g für 5 Minuten, um die Zellen von Plasmaresten und verschiedenen Reagenzien zu säubern, da diese die Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen in der nachfolgenden Zellkultur beeinflussen können.

3.5. Zellkultur

Als Kulturmedium diente RPMI 1640, dem folgende Stoffe zugesetzt wurden:

10 % Fetales Kälberserum, hitzeinaktivert

1 % L-Glutamin

1 % Antibiotikum (Penicillin-Streptomycin)

Die Zellfraktion wurde in dieser Nährlösung resuspendiert und mit Hilfe eines Coulter Counters auf eine Zellzahl von 10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Kulturen wurden in 12 "Well" Flachbodenplatten (Falcon) bei 37°C und einer mit 5% Kohlendioxid angereicherten Atmosphäre in einem Feuchtinkubator inkubiert. Nach Erstellung von Dosis-Zeit-Wirkungskurven in Vorversuchen wurden die Blutzellen mit dem Mitogen-PHA in einer Konzentration von 1 µg/ml für 72 h für die spätere INF- γ -Bestimmung und mit 1 µg/ml für 48 h für die spätere IL-2- und IL-4- Bestimmung stimuliert (Leonard et al., Campbell et al.). Danach wurde der Kulturüberstand von den Zellen separiert und bis zur Messung der Zytokinkonzentration mittels ELISA bei -72°C eingefroren.

3.6. Bestimmung der IgE-Konzentration

Nach Gewinnung der Blutproben wurden je 2 ml des Blutes zentrifugiert und das so gewonnene Plasma bis zur weiteren Verwendung bei -72°C eingefroren. Die IgE-Konzentrationen wurden mittels FEIA (Pharmacia CAP System, IgE FEIA) bestimmt, bei dem kovalent an einem Träger gebundenes anti-IgE im ersten Inkubationsschritt mit dem IgE aus der Patientenprobe (50 µl Serum) reagiert. Im zweiten Inkubationsschritt reagierte ein mit β-Galaktosidase markiertes anti-IgE mit dem gebundenem IgE. Danach wurde das ungebundene IgE abgewaschen und der gebundene Komplex mit einer Entwicklerlösung (84-Methylumbilliferylβ-D-Galaktoside) inkubiert. Nachdem die Reaktion unterbrochen wurde, erfolgte die Messung der Fluoreszenz des Eluats im FluoroCount-Gerät. Dabei ist die IgE-Konzentraton in der Serumprobe direkt proportional zur gemessenen Fluoreszenz und kann durch Vergleich mit einer parallel erstellten Standardkurve ermittelt werden. Die Sensitivität dieses Tests liegt bei 0.35 kU/l.

3.7. Oberflächenfärbung unstimulierter Zellen

Vor der fünfstündigen Stimulation wurde die Zusammensetzung der isolierten Zellen von jedem Probanden mit Antikörpern gegen Oberflächenantigene untersucht. 200.000 PMNC wurden gleichmäßig auf 9 FACS-Röhrchen für 8 Doppelfärbungen und eine Isotypen-Kontrolle verteilt. Auf die Zellpellets wurden 20 μ l von jedem fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Oberflächenantigen pipettiert und für 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Folgende Färbungen wurden durchgeführt:

- 1. anti-CD4-PE/anti-CD45RA-FITC,
- 2. anti-CD8-PE/anti-CD4-FITC
- 3. anti-CD20-PE/anti-CD8-FITC
- 4. anti-CD20-PE/anti-CD14-FITC
- 5. anti-CD25-PE/anti-CD3-FITC
- 6. anti-CD3-PE/anti-HLADR-FITC
- 7. anti-HLADR-PE/anti-CD2-FITC
- 8. anti-CD4-PE/ anti-CD29-FITC
- 9. ISO-Kontolle (Simultantest, monoklonale Antikörper ohne Fluoreszenzen)

Danach wurde mit PBS gewaschen, die Zellen in 200 µl PBS und 200 µl FACS-Fixierlösung resuspendiert und direkt im Durchflußzytometer gemessen.

3.8. Messung der intrazellulären markierten Zytokine

3.8.1. Reagentien

Pufferlösungen: PBS und PBS/BSA/NaN3, PBS/BSA/NaN3 mit 0,5 % Saponin (Sigma S-2149) Fixierung: Formaldehyd 4 % in PBS

3.8.2. Stimulation

<u>Reagenz 1</u>: Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA), Sigma P 8139, Stammlösung zu 10 µg/10 µl in DMSO

Reagenz 2: Ionomycin, Sigma I 0634, Stammlösung zu 1 mMol in DMSO

<u>Reagenz 3</u>: Monensin (zur Hemmung des Golgiapparates, verhindert die Zytokinsekretion aus der Zelle), Sigma M 5273, Stammlösung zu 10 mMol in 100 % Ethanol

Für die Stimulation wurden folgende Konzentrationen in Kulturmedium angesetzt:

PMA: 1-10 ng/ml

Ionomycin: 0.5-1 µMol

Monensin: 1-3 µMol

Die Stimulation wurde mit isolierten MNC durchgeführt. Zu 1 x 10^6 Zellen wurden jeweils 10 µl von Reagenz 1, 2 und 3 (s.o.) in einem FACS-Tube zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen für 5 Stunden im Brutschrank (5 % CO2) inkubiert. Von jedem Probanden wurden insgesamt 10 Röhrchen mit je 1 x 10^6 Zellen vorbereitet und jeweils mit 1 µl Reagenz 1, 2 und 3 inkubiert. Zusätzlich wurden von jedem Probanden 10 Kontrollröhrchen mit je 1 x 10^6 Zellen nur mit 1 µl Monensin (Reagenz 3) versetzt.

3.8.3. Fixierung bei Raumtemperatur

Nach 5h Stimulation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit 0,5 ml 4 % Formaldehyd/PBS pro Ansatz für 20 Minuten fixiert. Danach erfolgte ein wiederholter Waschschritt mit PBS.

3.8.4. Intrazelluläre Färbung

In jedem Ansatz wurde auf das Zellpellet 10 μ l des jeweiligen fluoreszenzmarkierten Zytokinantikörpers, in Saponinpuffer gelöst, pipettiert. Die Inkubationszeit mit dem Antikörper betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit. Die Markierung von Oberflächenantigenen fand parallel zur intrazellulären Färbung mit jeweils 20 μ l des entsprechenden Antikörpers mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff statt. Die Inkubationszeit mit dem Antikörper für die Oberflächenmarkierung betrug 10 Minuten. Anschließend wurden die Proben mit Saponinpuffer gewaschen und in 300 μ l PBS/BSA/NaN3 für die durchflußzytometrische Messung resuspendiert. Die Messung fand unmittelbar nach der Färbung statt. Das FACS-Gerät konnte in der Einstellung benutzt werden, die auch für die Oberflächenmarkierung vorgesehen war. Insgesamt wurden 10 stimulierte Proben und 10 unstimulierte Proben gefärbt. Dieses erfolgte nach folgendem Schema:

Färbung	Antikörper markiert mit	Antikörper markiert mit
	Fluoreszenzfarbstoff PE	Fluoreszenzfarbstoff FITC
1	anti-IL2	
2	anti-IL2-	anti-CD4
3	anti-IL2	anti-CD8
4	anti-IL4	
5	anti-IL4	anti-CD4
6	anti-IL4	anti-CD8
7		anti-INF-γ
8	anti-CD4	anti-INF-γ
9	anti-CD8	anti-INF-γ
10	ISO-Kontrolle	1

Tab. 3: Schema der Zytokinfärbung

3.9. Messung der Zytokine im Serum und in Zellkulturüberständen

Die Konzentrationen von IL-2, IL-4 und INF-γ wurden in den Zellkulturüberständen (72 Stunden bzw. 48 Stunden mit PHA stimuliert) und im Plasma jeweils mittels eines eigenen ELISA (Laboserv) quantitativ bestimmt. Das Laboserv-Kit ist ein solid phase sandwich Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay. Am Boden einer Mikrotiterplatte sind spezifische monoklonale Antikörper gegen das entsprechende Zytokin fest verankert. Proben und Standards werden zu diesem capture-Antikörper pipettiert und das Zytokin wird gebunden. Im gleichen Schritt wird ein zweiter biotinylierter monoklonaler Antizytokin-Antikörper, der gegen ein anderes Epitop gerichtet ist, hinzugegeben. Die Proben und die

Standards werden mit diesem Biotin-Konjugat 2 h (bei Messungen von IL-2, IL-4) oder 1.5 h (bei Messung von IFN- γ) bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem der nicht gebundene Anteil an Zweitantikörper durch viermaliges Waschen entfernt wurde, wird Streptavidin-Peroxidase-Konjugat zugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Streptavidin bindet an Biotin. Durch die Verbindung einer Biotin-Streptavidin Brücke wird ein Verstärkungseffekt und damit eine hohe Sensitivität erzielt. Nachdem das nicht gebundene Konjugat durch einen weiteren Waschschritt entfernt wurde, wird das chromogene Substrat (Tetramethylbenzidin, TMB) hinzugegeben, aus dem das gebundene Enzym einen blauen Farbkomplex bildet. Die Mikrotitierplatte wird anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Farbreaktion wird mit 100 µl Stopplösung (2N H₂SO₄) unterbrochen. Es erfolgt ein Farbumschlag zu gelb. Die Absorption wird bei 450 nm in einem Mikrotitierplatten-Reader gemessen. Die Intensität der Farbe ist proportional zur Zytokinkonzentration. Die untere Nachweisgrenze für IL2 ist 5 pg/ml, für IL4 = 2 pg/ml und für INF- γ = 4 pg/ml.

Die Präzision der Tests ist wie folgt (Herstellerangaben):

	Intra-Assay-	Inter-Assay-
	Variationskoeffizienten (%)	Variationskoeffizienten (%)
IL-2	3.2-12.2	3.7-18.2
IL-4	1.9-2.5	1.4-2.2
INF-γ	5.2-6.1	6.0-6.1

Tab.4: Präzision der Tests

3.10. Statische Auswertung

Für die statische Auswertung wurde der Mann-Whitney-U-Test für ungebundene Stichproben oder der Wilcoxon-Test für gebundene Stichproben verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Erläuterung zu den Ergebnissen

Im Folgenden werden die Untersuchungsergebnisse der beiden Kollektive gegenübergestellt. Gruppe 1 umfasste 12 erwachsene Probanden (Kontrollen) ohne Hinweise auf allergische Erkrankungen. Gruppe 2 umfasste 8 Atopie-Patienten mit den Symptomen einer allergischen Rhinokonjunktivitis. Die statistische Auswertung wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben oder mit dem Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben durchgeführt. Angegeben werden Minimum, Maximum, Median und Mittelwert ± Standardabweichung. Die Ergebnisse werden in Boxplot-Diagramme dargestellt. Ein Boxplot zeigt den Median und den Interquartilbereich (25.-75. Perzentile) an. Die Whiskers stellen Ausreißer dar. Extremwerte (Ergebnisse außerhalb von zwei Box-Längen) werden einzeln mit Probandenidentifikationsnummer angegeben.

4.2. Produktionskinetiken für IL-2, IL-4 und INF-γ

Zunächst wurde die Methodik optimiert, um maximale Zytokinkonzentrationen bei der Kultivierung und Stimulation von mononukleären Blutzellen aus peripherem Blut zu erzielen. Um den Zeitpunkt zu bestimmen, an dem die maximale Zytokinkonzentration im Kulturüberstand vorliegt, wurden Produktionskinetiken für die einzelnen Zytokine erstellt. Dafür wurden Zellkulturen unter gleichen Bedingungen angesetzt und die Inkubation nach unterschiedlichen Zeiträumen (4, 12, 24, 48 oder 72 Stunden) abgebrochen. Desweiteren musste untersucht werden, bei welchen Mitogenkonzentrationen die Hierzu Zytokinproduktion optimal stimuliert wird. wurden die Mitogenkonzentrationen um jeweils eine Zehnerpotenz nach oben und nach unten variiert. Für die einzelnen Zytokine ergaben sich folgende optimale Stimulationsbedingungen: Stimulation mit 1 µg/ml PHA für 48 h zur optimalen

IL-2- und IL-4-Produktion. Stimulation mit 1 μ g/ml PHA für 72 h zur optimalen INF- γ -Produktion.

4.3. IgE-Konzentrationen im peripheren Blut

Aus den enzymimmunologischen Bestimmungen der Gesamt-IgE-Konzentrationen im Serum der Atopie-Patienten resultierten signifikante erhöhte Messwerte (p<0,001) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. In der Gruppe der Atopie-Patienten betrug die maximale Konzentration 813,5 kU/l, die minimale Konzentration 87,6 kU/l und der Mittelwert 275,9 kU/l \pm 229,3 kU/l. Der Median lag bei 221 kU/l. In der Gruppe der Gesunden betrug der maximale Wert 46,6 kU/l, der minimale Wert 5,8 kU/l und der Mittelwert 19,1 kU/l \pm 12,2 kU/l. Der Median lag bei 16,5 kU/l.



Abb.6: Gesamtes IgE im Serum

gesund: 12 Kontrollen; atopisch: 8 Atopie-Patienten Im Serum der Atopie-Patienten war signifikant mehr IgE nachweisbar (p<0,001; U-Test).

4.4. Untersuchung der Lymphozytensubpopulation vor Stimulation

Isolierte Lymphozyten wurden mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten monoklonalen Antikörpern gegen Oberflächenantigene untersucht. Die Messung und Auswertung der Lymphozytensubpopulation erfolgte mit dem Durchflußzytometer.

4.4.1. CD4⁺Zellen

CD4⁺Zellen sind als T-Helferzellen charakterisiert. Ein Unterschied der CD4⁺Zellen in der Lymphozytenpopulation war zwischen den beiden Gruppen nicht festzustellen (p=0,5; U-Test). In der Kontrollgruppe waren maximal 86%, minimal 30% und als Mittelwert 53,8% \pm 14,7% CD4⁺Zellen vorhanden. Der Median lag bei 54,5%. Bei den Atopie-Patienten waren maximal 76%, minimal 24% und als Mittelwert 47,4% \pm 19,8% CD4⁺Zellen zu messen. Der Median lag bei 50%.

4.4.2. CD29⁺/CD4⁺ Zellpopulation

 $CD29^+/CD4^+$ Zellen sind "memory" T-Helferzellen. Bei den Atopie-Patienten lassen sich signifikant mehr $CD29^+/CD4^+$ Zellen nachweisen als bei den Kontrollen (p<0,05; U-Test). Bei den Kontrollen war die $CD29^+$ -Expression maximal 50%, minimal 8% und im Mittel 29,0% ± 14,3% in der $CD4^+$ Zellpopulation. Der Median lag bei 30%. In der Gruppe der Gesunden war in keinem Fall die $CD29^+/CD4^+$ Zellpopulation größer als 50%. Bei 4 Probanden in der Gruppe der Atopiker (50% des Kollektivs) war der $CD29^+/CD4^+$ Anteil größer als 50%. In dieser Gruppe betrug der maximale Anteil der $CD29^+/CD4^+$ Zellen 67%, der minimale Anteil 14% und der Mittelwert 44,1% ± 16,9%. Der Median lag bei 48,5% (siehe Abb.7).



Abb.7: CD29⁺/CD4⁺Zellen

gesund: 12 Kontrollen; atopisch: 8 Atopie-Patienten CD29⁺/CD4⁺ Zellen sind signifikant vermehrt nachweisbar bei Atopie-Patienten (p<0,05; U-Test).

4.4.3. CD45RA⁺/CD4⁺ Zellen

Es ergab sich kein Unterschied im Anteil der CD45RA⁺/CD4⁺ Zellen zwischen den beiden Gruppen (p=0,27; U-Test). In der Gruppe der Gesunden war der maximale Anteil 18%, der minimale Anteil 0%, der Mittelwert 5,3% \pm 6,5%. Der Median lag bei 2%. In der Gruppe der Atopiker war der maximal gemessene Wert 14%, der minimale Anteil 2%, der Mittelwert 5,9% \pm 4,5%. Der Median lag bei 4,5%. In der Gruppe der Gesunden war in 4 von 11 Fällen (36,4% der Stichprobe) ein Anteil größer als 2%. In der Gruppe der Atopiker waren in 6 von 8 Fällen (75% der Stichprobe) mehr als 2% CD45⁺/CD4⁺Zellen nachweisbar. Es ergab sich kein Unterschied in der Verteilung der $CD8^+$ Subpopulation zwischen den beiden Gruppen (p=1,00; U-Test). In der Gruppe 1 war der maximale Anteil 36%, der minimale Anteil 2%, der Mittelwert 19,2% ± 12%. Der Median lag bei 17%. In der Gruppe 2 war der maximale Anteil 38%, der minimale Anteil 0%, der Mittelwert 19,5% ± 14,2%. Der Median lag bei 18%.

4.4.5. CD3⁺Zellen

in der Verteilung der CD3⁺Zellen ergab sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen (p=0,85; U-Test). In der Gruppe der Gesunden fanden sich maximal 89%, minimal 45% und im Mittel 72,45% \pm 11,2% CD3 positive Zellen. Der Median lag bei 74%. In der Gruppe der Atopiker fanden sich maximal 82%, minimal 65% und im Mittel 74,3% \pm 6% CD3 positive Zellen. Der Median lag bei 75%.

4.4.6. CD25⁺/CD3⁺Zellen

In der Kontrollgruppe war der maximale Anteil der $CD25^+/CD3^+$ Zellen 9%, der minimale Anteil 2%, der Mittelwert 4,4% ± 2,16%. Der Median lag bei 3,5%. In der Gruppe der Atopie-Patienten war der maximale Anteil oben genannter Zellen 8%, der minimale Anteil 2%, der Mittelwert 4,6% ± 2,1%. Der Median lag bei 5%. Es gab keinen Unterschied in der Verteilung der $CD25^+/CD3^+$ Zellen zwischen den beiden Gruppen (p=0,83; U-Test). In der Kontrollgruppe war in 2 von 10 Fällen (20%) ein Anteil der $CD25^+/CD3^+$ größer als 5%, in der Gruppe der Atopiker war in 3 von 8 Fällen (37,5%) dieses nachweisbar.

4.4.7. HLA-DR⁺/CD3⁺Zellen

Es ergab sich kein Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen bezüglich des Anteils an HLA-DR⁺/CD3⁺Zellen (p=0,7; U-Test). In der Kontrollgruppe betrug der maximale Anteil oben genannter Zellen 9%, der minimale Anteil 3%, der Mittelwert 5,5% \pm 2,3%. Der Median lag bei 4%. In der Gruppe der Atopie-Patienten war der maximale Anteil 10%, der minimale Anteil 1%, der Mittelwert 5,9% \pm 3%. Der Median lag bei 6,5%. In der Gruppe der Gesunden war in 5 von 10 Fällen (50% der Stichprobe) der HLA-DR⁺/CD3⁺ Anteil größer als 4%. In der Gruppe der Atopiker war in 6 von 8 Fällen (75% der Stichprobe) der HLA-DR⁺/CD3⁺ Anteil größer als 4%.

4.4.8. CD14⁺Zellen

Es ergab sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen bezüglich des Anteils an CD14⁺Zellen in der Monozytenpopulation (p=1; U-Test). In der Gruppe der Gesunden betrug der maximale Anteil o.g. Zellen 13%, der minimale Anteil 1%, der Mittelwert 5,5% \pm 3,3%. Der Median lag bei 5%. In der Gruppe der Atopiker betrug der maximale Anteil o.g. Zellen 15%, der minimale Anteil 1%, der Mittelwert 6% \pm 4,89%. Der Median lag bei 4,5%.

4.4.9. CD20⁺Zellen

Es ergab sich zwischen den beiden Gruppen kein Unterschied in der Verteilung der CD20⁺Zellen (p=0,34; U-Test). In der Gruppe der Gesunden betrug der maximale Anteil CD20⁺ Zellen 15%, der minimale Anteil 2%, der Mittelwert 8,7% \pm 3,6%. Der Median lag bei 8,5%. In der Gruppe der Atopiker betrug der maximale Anteil 14%, der minimale Anteil 4%, der Mittelwert 7,3% \pm 2,9%. Der Median lag bei 7,5%.

4.4.10. CD2⁺ Zellen

Der Anteil der CD2⁺Zellen bei den Kontrollen versus Atopie-Patienten war nicht signifikant unterschiedlich (p=0,84; U-Test). In der Gruppe der Gesunden betrug der maximale Anteil o.g. Zellen 94,4%, der minimale Anteil 74%, der Mittelwert $83,5\% \pm 6,3\%$. Der Median lag bei 83%. In der Gruppe der Atopiker war die Verteilung wie folgt: der maximale Anteil betrug 90%, der minimale Anteil 64%, der Mittelwert $81,2\% \pm 9\%$. Der Median lag bei 85%.

4.5. IL-2-Konzentration im Serum und IL-2-Produktion in der Zellkultur

Die IL-2-Konzentration im Serum in Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA (siehe Abschnitt 3) ermittelt. Von allen Probanden wurde die Konzentration im Serum und im Zellkulturüberstand nach 48-stündiger Kultur im Feuchtinkubator jeweils mit und ohne PHA in einer Konzentration von 1 μ g/ml ermittelt. Die statische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test für zwei unabhängige Stichproben. Es werden jeweils minimale, maximale Konzentrationen, Mittelwerte \pm Standardabweichung und der Median beschrieben.

4.5.1. IL-2 im Serum_

Die IL-2-Konzentration im Serum war für beide Gruppen nicht signifikant verschieden (p=0,24; U-Test). Bei den Gesunden betrug die maximale IL-2-Konzentration 25,5 pg/ml, die minimale IL-2-Konzentration 5,1 pg/ml, der Mittelwert 13,7 pg/ml \pm 5,5 pg/ml. In der Gruppe der Atopiker betrug die maximale IL-2-Konzentration 18,8 pg/ml, die minimale Konzentration 4,2 pg/ml, der Mittelwert 10,7 pg/ml \pm 5,3 pg/ml. Der Median lag bei den Gesunden bei 11,8 pg/ml und bei den Atopikern bei 10 pg/ml.

4.5.2. IL-2-Konzentration in den Zellkulturüberständen_

Die IL-2-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen ohne Stimulation unterschieden sich marginal signifikant zwischen den beiden Gruppen (p=0,075; U-Test). In der Gruppe der Gesunden betrug der maximale Wert 31,0 pg/ml, der minimale Wert 14,8 pg/ml, der Mittelwert 24,2 pg/ml \pm 5,7 pg/ml. Der Median lag bei 25 pg/ml. In der Gruppe der Atopiker betrug die maximale Konzentration 25 pg/ml, die minimale Menge 13,3 pg/ml, der Mittelwert 20 pg/ml \pm 3,3 pg/ml. Der Median lag bei 20,2 pg/ml. In der Gruppe der Gesunden war in 5 von 11 Fällen eine IL-2 Konzentration größer als 25 pg/ml nachzuweisen. In der Gruppe der Atopiker war in keinem Fall eine Konzentration größer als 24,99 pg/ml nachzuweisen.



Abb.8: Interleukin-2-Konzentration in Zellkulturüberständen von Zellen ohne Stimulation

gesund: 11 Kontrollen; atopisch: 8 Atopie-Patienten Der Unterschied ist marginal signifikant (p=0,075; U-Test) Nach Stimulation mit PHA ergab sich ein signifikanter Unterschied in der IL-2-Sekretion zwischen den beiden Gruppen (p=0,001). In der Gruppe der Gesunden betrug die maximale Konzentration 109,1 pg/ml, die minimale Konzentration 32,4 pg/ml, der Mittelwert 48,4 pg/ml \pm 21,9 pg/ml. Der Median lag bei 41,8 pg/ml. Sechs gesunde Probanden (55% der Gruppe) hatten Konzentrationen größer als 40 pg/ml. In der Gruppe der Atopiker fand sich bei keinem Patienten eine IL-2-Konzentrationen größer als 40 pg/ml in den Zellkulturüberständen. Alle acht Ergebnisse lagen zwischen 20 pg/ml und 35 pg/ml. Die maximale Konzentration betrug 34,4 pg/ml, die minimale Konzentration 22,8 pg/ml, der Mittelwert 28,9 pg/ml \pm 3,9 pg/ml. Der Median lag bei 29,4 pg/ml.



Abb.9: Interleukin-2-Konzentration im Zellkulturüberstand nach PHA-Stimulation

gesund: 11 Kontrollen; atopisch: 8 Atopie-Patienten

In den Zellkulturüberständen der Kontrollen ist signifikant mehr IL-2 nachzuweisen (p=0,001; U-Test).

4.6 IL-4-Konzentration im Serum und in Zellkulturen

Die IL-4-Konzentration im Serum wurde mittels ELISA (siehe Kapitel 3) bestimmt. Ermittelt wurden die Konzentrationen jeweils im Serum und in Zellkulturüberständen nach 48-stündiger Inkubation jeweils mit und ohne PHA (1 μ g/ml). Die statistische Auswertung wurde mit dem Mann-Whitney U-Test für zwei unabhängige Stichproben durchgeführt.

4.6.1. IL-4 im Serum

In der Gruppe der Gesunden waren maximal 5,7 pg/ml, minimal 1,9 pg/ml und im Mittel 3,9 pg/ml \pm 1,3 pg/ml IL-4 im Serum nachzuweisen. Der Median lag bei 3,6 pg/ml. In der Gruppe der Atopiker waren maximal 35,6 pg/ml, minimal 6,4 pg/ml und im Mittel 14 pg/ml \pm 9,4 pg/ml IL-4 nachzuweisen. Der Median lag bei 11 pg/ml (p=0,001). In der Gruppe der Atopiker waren die IL-4-Konzentrationen im Serum signifikant größer.



Abb.10: Interleukin-4-Konzentration im Serum; gesund: 12 Kontrollen; atopisch: 8 Atopie-Patienten. Im Serum der Atopie-Patienten war signifikant mehr IL-4 nachzuweisen (p=0,001; U-Test).

4.6.2. IL-4-Konzentration in Zellkulturüberständen

Ohne Stimulation waren in der Gruppe der Gesunden maximal 4,1 pg/ml, minimal 3,3 pg/ml und im Mittel 3,8 pg/ml \pm 0,3 pg/ml IL-4 nachzuweisen. Der Median lag bei 3,9 pg/ml. In der Gruppe der Atopiker waren maximal 5,4 pg/ml, minimal 2,9 pg/ml und im Mittel 3,8 pg/ml \pm 0,8 ρ g/ml IL-4 nachzuweisen. Der Median lag bei 3,6 pg/ml. Der Unterschied war marginal signifikant (p=0,72). Nach Stimulation mit PHA war in der Gruppe der Gesunden maximal 7 pg/ml, minimal 4,1 pg/ml und im Mittel 4,7 pg/ml \pm 1 pg/ml IL-4 nachzuweisen. Der Median lag bei 4,3 pg/ml. In der Gruppe der Atopiker waren maximal 14,2 pg/ml, minimal 4,2 pg/ml und im Mittel 7 pg/ml \pm 3,1 pg/ml IL-4 nachzuweisen. Der Median lag bei 6,2 pg/ml. Bei den Atopie-Patienten war signifikant mehr IL-4 nachzuweisen als bei den Kontrollen (p=0,02).



Abb.11: Interleukin-4-Konzentration in Zellkulturüberständen nach Stimulation mit PHA

gesund: 8 Kontrollen; atopisch: 8 Atopie-Patienten

Nach Stimulation war in den Zellkulturüberständen der Atopie-Patienten signifikant mehr IL-4 nachzuweisen (p=0,02; U-Test).

4.7. INF-γ-Konzentration im Serum und in Zellkulturüberständen

Die extrazelluläre INF- γ -Konzentration wurde mittels ELISA (siehe Abschnitt 3) ermittelt. Von allen Probanden wurde die Konzentration im Serum und im Zellkulturüberstand nach 72-stündiger Stimulation im Feuchtinkubator jeweils ohne und mit PHA in einer Konzentration von 1µg/ml ermittelt. Die statistische Auswertung wurde mit dem Mann-Whitney U-Test für zwei unabhängige Stichproben durchgeführt.

4.7.1. INF-γ im Serum

In der Gruppe der Gesunden waren maximal 7,1 pg/ml, minimal 1,2 pg/ml und im Mittel 3 pg/ml \pm 2 pg/ml INF- γ im Serum nachzuweisen. Der Median lag bei 2,5 pg/ml. In der Gruppe der Atopiker war maximal 1,8 pg/ml, minimal 1,2 pg/ml und im Mittel 1,4 pg/ml \pm 0,3 pg/ml INF- γ im Serum nachzuweisen. Der Median lag bei 1,5 pg/ml. Im Serum der Kontrollen war signifikant mehr INF- γ nachzuweisen (p=0,03).



Abb.12: Interferon-gamma-Konzentration im Serum; gesund: 12 Kontrollen; atopisch: 8 Atopie-Patienten. Im Serum der Kontrollen war signifikant mehr INF- γ nachzuweisen (p=0,03; U-Test).

4.7.2. INF-γ in den Zellkulturüberständen_

Ohne Stimulation waren in der Gruppe der Gesunden maximal 11,9 pg/ml, minimal 3,3 pg/ml und im Mittel 5,9 pg/ml \pm 2,7 pg/ml INF- γ in den Überständen nachzuweisen. Der Median lag bei 4,8 pg/ml. In der Gruppe der Atopiker waren maximal 3,1 pg/ml, minimal 2 pg/ml und im Mittel 2,5 pg/ml \pm 0,5 pg/ml INF- γ im Überstand nachzuweisen. Der Median lag bei 2,4 pg/ml. In den Zellüberständen der Gesunden war mehr INF- γ nachzuweisen (p=0,001).





gesund: 12 Kontrollen; atopisch: 8 Atopie-Patienten

In den Zellkulturüberständen ohne Stimulation in der Kontroll-Gruppe war signifikant mehr INF-γ nachzuweisen (p=0,001; U-Test).

Nach Stimulation mit PHA waren in der Gruppe der Gesunden maximal 1151,2 pg/ml, minimal 864 pg/ml und im Mittel 983,8 pg/ml \pm 78,5 pg/ml INF- γ in den Überständen nachzuweisen. Der Median lag bei 976 pg/ml. In der Gruppe der Atopiker waren maximal 904,7 pg/ml, minimal 160,4 pg/ml und im Mittel 746,4 pg/ml \pm 257,9 pg/ml nachzuweisen. Der Median lag bei 854,7 pg/ml. In den

Zellkulturüberständen der Kontrollen war signifikant mehr INF-γ nachzuweisen (p=0,003).





gesund: 11 Kontrollen; atopisch: 8 Atopie-Patienten Nach Stimulation war in den Kulturüberständen der Kontroll-Gruppe signifikant mehr INF-γ nachweisbar (p=0,003; U-Test).

4.8. Zytokinmuster

Im Folgenden wurde untersucht, welches Zytokin von den Zellen hauptsächlich produziert wird. Die Ergebnisse wurden mit dem Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben getrennt für jede Gruppe ermittelt. Da die Molekulargewichte der jeweiligen Zytokine sich nur geringfügig (IL-2: 133 Aminosäuren, 15500 g/mol; IL-4: 129 Aminosäuren, 15000 g/mol; INF- γ : 146 Aminosäuren, im nativen Zustand als Dimer, 17000 g/mol) unterscheiden, werden weiterhin die Massen der einzelnen Zytokine verglichen und nicht die Anzahl der Moleküle (molare Konzentration).

4.8.1. Zytokinverteilung im Serum

In der Gruppe der Gesunden war signifikant mehr IL-2 als INF- γ und IL-4 im Serum zu messen (p<0,05). Die IL-4 und INF- γ Konzentrationen unterschieden sich nicht signifikant. In der Gruppe der Atopiker waren IL-2 und IL-4 signifikant vermehrt im Serum nachzuweisen im Vergleich zu INF- γ (p<0,05). Die Konzentrationen von IL-2 und IL-4 unterschieden sich nicht signifikant.





gesund: 12 Kontrollen; atopisch: 8 Atopie-Patienten

Im Serum der Kontrollpersonen war signifikant (p<0,05; Wilcoxon-Test) mehr IL-2 nachzuweisen als IL-4 und INF- γ . Die Konzentrationen von IL-4 und INF- γ unterschieden sich nicht signifikant.

Im Serum der Atopie-Patienten war signifikant mehr IL-2 und IL-4 im Serum nachzuweisen als INF- γ (p<0,05; Wilcoxon-Test). Die Konzentration von IL-2 und IL-4 unterschieden sich nicht signfikant.

4.8.2. Zytokinverteilung in Zellkulturüberständen

Nach Stimulation mit PHA waren sowohl in der Gruppe der Gesunden als auch in der Gruppe der Atopiker mehr INF- γ als IL-2 und IL-4, und mehr IL-2 als IL-4 nachzuweisen (p<0,05).



Abb.16: Zytokinmuster nach Stimulation mit PHA in den Zellkulturüberständen;

gesund: 8 Kontrollen; atopisch: 8 Atopie-Patienten.

In beiden Gruppen war signifikant mehr INF- γ nachzuweisen als IL-2 und IL-4 in den Zellkulturüberständen nach Stimulation mit PHA (p<0,05; Wilcoxon-Test).

4.9. Intrazelluläre Zytokindetektion

Der Nachweis der Zytokine IL-2, Il-4 und INF-γ auf Einzelzellniveau wurde nach der in Kapitel 3 beschriebenen Methodik durchgeführt.

Erklärungen zu den Boxplots und Whiskers finden sich in Kapitel 4.1.

4.9.1. IL-2⁺Zellen

Ohne Stimulation bestand zwischen den beiden untersuchten Gruppen kein Unterschied (p=0,38). In der Gruppe der Gesunden betrug der maximale Anteil IL-2⁺Zellen 5%, der minimale Anteil 0%, der Mittelwert $1,3\% \pm 1,4\%$. Der Median lag bei 1 %. In der Gruppe der Atopiker betrug der maximale Anteil der IL-2⁺Zellen 2%, der minimale Anteil 0%, der Mittelwert 0,7% \pm 0.9%. Der Median lag bei 1 %. Nach Stimulation mit PMA und Ionomycin bestand zwischen den beiden Probandengruppen kein Unterschied in dem Anteil der IL-2⁺Zellen (p=0,91). Unter den gesunden Teilnehmern betrug der maximale Anteil aller IL- 2^+ Zellen 56%, der minimale Anteil 6%, der Mittelwert 25,1% ± 17,6%. Der Median lag bei 20,7%. Unter den Atopikern betrug der maximale Anteil der IL- 2^+ Zellen 39%, der minimale Anteil 9%, der Mittelwert 20,6% ± 10,3%. Der Median lag bei 18 %. Sechs gesunde Probanden (50% der Stichprobe) hatten einen Anteil o.g. Zellen größer als 20% und drei Probanden (25% der Stichprobe) einen Anteil größer als 40%. Im Vergleich dazu hatten drei Atopiker (37,5% der Stichprobe) einen Anteil größer als 20% und kein Patient einen Anteil größer als 40%.

4.9.2. IL-4⁺Zellen

Ohne Stimulation ließ sich in der Gruppe der Gesunden maximal 2%, minimal 0% und im Mittel $0,4\% \pm 0,6\%$ IL-4⁺Zellen nachweisen. Der Median lag bei 0 %. In der Gruppe der Atopiker ließen sich maximal 2%, minimal 0% und im Mittel $0,6\% \pm 0,7\%$ IL-4⁺Zellen nachweisen. Der Median lag bei 0,5%. Zwischen den beiden Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied (p=0,34). Nach Stimulation mit PMA und Ionomycin waren in der Gruppe der Gesunden maximal 3%, minimal 0% und im Mittel 1% ± 0,8% IL-4⁺Zellen nachzuweisen. Der Median lag bei 1%. In der Gruppe der Atopiker waren maximal 9%, minimal 1% und im Mittel 3% ± 2,7% IL-4⁺Zellen nachzuweisen. Der Median lag bei 2%. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen (p=0,24). In der Gruppe der Atopiker zeigten 50% der Probanden mehr als 3% IL- 4^+ Zellen. In der Gruppe der Gesunden hatten nur 8,3% der Probanden mehr als 3% IL- 4^+ Zellen.

4.9.3. INF- γ^+ Zellen

In der Gruppe der Gesunden ließen sich ohne Stimulation maximal 3%, minimal 0% und im Mittel 0,9% \pm 0,8% INF- γ^+ Zellen nachweisen. Der Median lag bei 1%. In der Gruppe der Atopiker ließen sich maximal 2%, minimal 0% und im Mittel 0,4% \pm 0,5% INF- γ^+ Zellen nachweisen. Der Median lag bei 0%. Zwischen den beiden Gruppen ergab sich ein signifikanter Unterschied (p<0,05).



Abb.17: INF- γ^+ Zellen vor Stimulation

gesund: 12 Kontrollen; atopisch: 8 Atopie-Patienten

Es sind signifikant mehr INF- γ^+ Zellen in der Kontrollgruppe (p<0,05; U-Test).

Nach Stimulation mit PMA und Ionomycin waren maximal 81%, minimal 11% und im Mittel 35,2% \pm 22% INF- γ^+ Zellen nachzuweisen Der Median lag bei 32%. In der Gruppe der Atopiker waren maximal 25%, minimal 8% und im Mittel 18,6% \pm 6% INF- γ^+ Zellen nachzuweisen. Der Median lag bei 19%. Zwischen den beiden Zellpopulation gab es einen signifikanten Unterschied (p<0,05). Die stimulierten PMNC der gesunden Kontrollen produzierten signifikant mehr INF- γ als die entsprechenden Zellen der Atopie-Patienten. In der Gruppe der Gesunden waren in 7 von 12 Fällen (58,3% der Stichprobe) mehr als 30% INF- γ^+ Zellen nachzuweisen. In der Gruppe der Atopie-Patienten war in keinem Fall mehr als 25% INF- γ^+ Zellen nachzuweisen.





gesund: 12 Kontrollen, atopisch: 8 Atopie-Patienten

Die Kontrollgruppe hatte signifikant mehr INF- γ^+ Zellen nach Stimulation (p<0,05, U-Test).

4.9.4. CD4⁺Zellen

Ohne Stimulation zeigte sich in der Gruppe der Gesunden maximal 66%, minimal 18% und im Mittel 40,55% \pm 13,6% CD4⁺Zellen in der unstimulierten Kultur. Der Median lag bei 39,5%. In der Gruppe der Atopiker waren maximal 53%, minimal 33% und im Mittel 39% \pm 8% CD4⁺Zellen nachweisbar. Der Median lag bei 36%. Ein Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen bestand nicht (p=0,85). Nach Stimulation mit PMA und Ionomycin waren in der Gruppe der Gesunden maximal 55%, minimal 16% und im Mittel 37% \pm 12% CD4⁺Zellen nachzuweisen. Der Median lag bei 36,5%. In der Gruppe der Atopiker waren maximal 54%, minimal 23% und im Mittel 33% \pm 10,3% CD4⁺Zellen nachzuweisen. Der Median lag bei 32,5%. Es besteht kein Unterschied zwischen Atopiker und Gesunden nach Stimulation (p=0,47).

4.9.5. CD4⁺/IL-2⁺ Zellen

Ohne Stimulation zeigten sich in der Gruppe der Gesunden maximal 4%, minimal 0% und im Mittel 1,4% \pm 1,3% CD4⁺/IL-2⁺Zellen. Der Median lag bei 1%. In der Gruppe der Atopiker waren maximal 5%, minimal 0% und im Mittel 1,7% \pm 1,5% CD4⁺/IL-2⁺Zellen nachzuweisen. Der Median lag bei 1,5%. Zwischen den Gesunden und den Atopikern bestand kein Unterschied (p=0,85). Nach Stimulation mit PMA und Ionomycin waren in der Gruppe der Gesunden maximal 74%, minimal 18%, im Mittel 46% \pm 19,3% CD4⁺/IL-2⁺Zellen nachzuweisen. Der Median lag bei 42,5%. Bei den Atopikern waren maximal 51%, minimal 18%, im Mittel 39,5% \pm 11% CD4⁺/IL-2⁺Zellen nachzuweisen. Der Median lag bei 42,5%. In Gesunden und Atopikern bestand nicht (p=0,57). In der Gruppe der Gesunden war in 5 von 12 Fällen (41,7%) mehr als 55% CD4⁺/IL-2⁺Zellen nachzuweisen. In der Gruppe der Atopiker war in keinem Fall mehr als 51% CD4⁺/IL-2⁺Zellen nachzuweisen.

4.9.6. CD4⁺/IL-4⁺ Zellen

In der Gruppe der Gesunden ergaben sich ohne Stimulation maximal 3%, minimal 0% und im Mittel 0,7% \pm 0,8% CD4⁺/IL-4⁺Zellen. Der Median lag bei 0,5%. In der Gruppe der Atopiker waren maximal 1%, minimal 0% und im Mittel 0,4% \pm 0,5% CD4⁺/IL-4⁺Zellen nachzuweisen. Der Median lag bei 0%. Ein signifikanter Unterschied war nicht festzustellen (p=0,21). In der Gruppe der Gesunden waren maximal 7%, minimal 1% und im Mittel 3% \pm 2,7% CD4⁺/IL-4⁺Zellen nachzuweisen. Der Median lag bei 2,5%. In der Gruppe der Atopiker waren maximal 9%, minimal 0% und im Mittel 3,4% \pm 3,4% CD4⁺/IL-4⁺Zellen nachzuweisen. Der Median lag bei 1,5%. Ein signifikanter Unterschied ergab sich nicht (p=0,76). In der Gruppe der Atopiker waren in 2 von 8 Fällen (25%) mehr als 7% CD4⁺/IL-4⁺Zellen nachzuweisen. In der Gruppe der Gesunden gab es in keinem Fall mehr als 7% CD4⁺/IL-4⁺Zellen.

4.9.7. CD4⁺/INF-γ⁺ Zellen

Ohne Stimulation waren in der Gruppe der Gesunden maximal 4%, minimal 0% und im Mittel 0,8% ± 1,2% CD4⁺/INF- γ^+ Zellen nachzuweisen. Der Median lag bei 0%. In der Gruppe der Atopiker waren maximal 2%, minimal 0% und im Mittel 0,7% ± 0,8% CD4⁺/INF- γ^+ Zellen nachzuweisen. Der Median lag bei 0%. Die Signifikanz betrug p=0,90. Nach Stimulation mit PMA und Ionomycin waren in der Gruppe der Gesunden maximal 59%, minimal 5% und im Mittel 24% ± 16% CD4⁺/INF- γ^+ Zellen nachzuweisen. Der Median lag bei 22%. In der Gruppe der Atopiker waren maximal 26%, minimal 9% und im Mittel 18,7% ± 6% CD4⁺/INF- γ^+ Zellen nachzuweisen. Der Median lag bei 19,5%. Ein signifikanter Unterschied war nicht festzustellen (p=0,73). In der Gruppe der Gesunden waren in sechs Fällen (50% der Probanden) mehr als 30% CD4⁺/INF- γ^+ Zellen nachzuweisen. In der Gruppe der Atopiker hingegen gab es keinen solchen Fall.

4.9.8. CD8⁺ Zellen

In der Gruppe der Gesunden waren ohne Stimulation maximal 37%, minimal 14% und im Mittel 26% \pm 7,5% CD8⁺ Zellen. Der Median lag bei 28%. In der Gruppe der Atopiker waren maximal 43%, minimal 19% und im Mittel 28% \pm 8,7% CD8⁺ Zellen. Der Median lag bei 25%. Ein signifikanter Unterschied war nicht festzustellen (p=0,85). Nach Stimulation mit PMA und Ionomycin waren in der Gruppe der Gesunden maximal 36%, minimal 11% und im Mittel 25% \pm 7% CD8⁺Zellen nachzuweisen. Der Median lag bei 26,5%. In der Gruppe der Atopiker waren maximal 37%, minimal 17% und im Mittel 26% \pm 7,8% CD8⁺Zellen nachzuweisen. Der Median lag bei 24,5%. Ein signifikanter Unterschied in den CD8⁺ Zellen zwischen den beiden Gruppen bestand nicht (p=0,97).

4.9.9. CD8⁺/IL-2⁺ Zellen

Ohne Stimulation waren in der Gruppe der Gesunden maximal 9%, minimal 0% und im Mittel 1,8% \pm 2,5% CD8⁺/IL-2⁺Zellen nachzuweisen. Der Median lag bei 1%. In der Gruppe der Atopiker waren maximal 4%, minimal 0% und im Mittel 1,1% \pm 1,4% CD8⁺/IL-2⁺Zellen nachzuweisen. Der Median lag bei 1%. Zwischen beiden Gruppen bestand kein Unterschied (p=0,78). Nach Stimulation mit PMA und Ionomycin waren in der Gruppe der Gesunden maximal 50%, minimal 4% und im Mittel 18% \pm 13,6% CD8⁺/IL-2⁺Zellen nachzuweisen. Der Median lag bei 14%. In der Gruppe der Atopiker waren maximal 34%, minimal 5% und im Mittel 14% \pm 9,9% CD8⁺/IL-2⁺Zellen nachzuweisen. Der Median lag bei 10,5%. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Probandengruppen (p=0,47). In der Gruppe der Gesunden waren in 4 von 12 Fällen (33,3% der Stichprobe) mehr als 25% CD8⁺/IL-2⁺Zellen nachzuweisen. In der Gruppe der Atopiker war in einem Fall (12,5% der Stichprobe) mehr als 25% CD8⁺/IL-2⁺Zellen nachzuweisen.

4.9.10. CD8⁺/IL-4⁺ Zellen

In der Gruppe der Gesunden fanden sich ohne Stimulation maximal 5%, minimal 0% und im Mittel 1% \pm 1,4% der CD8⁺/IL-4⁺Zellen. Der Median lag bei 0,5%. In der Gruppe der Atopiker waren maximal 1%, minimal 0% und im Mittel 0,2% \pm 0,4% CD8⁺/IL-4⁺Zellen nachzuweisen. Der Median lag bei 0%. Zwischen beiden Gruppen bestand kein Unterschied (p=0,13). Nach Stimulation mit PMA und Ionomycin wurden die Ergebnisse von 11 Gesunden mit 8 Atopikern verglichen. In der Gruppe der Gesunden waren maximal 5%, minimal 0% und im Mittel 2,3% \pm 1,5% CD8⁺/IL-4⁺Zellen nachzuweisen. Der Median lag bei 2%. In der Gruppe der Gesunden waren maximal 5%, minimal 0% und im Mittel 2,3% \pm 1,5% CD8⁺/IL-4⁺Zellen nachzuweisen. Der Median lag bei 2%. In der Gruppe der Atopiker waren maximal 5%, minimal 1% und im Mittel 2,4% \pm 1,5% CD8⁺/IL-4⁺Zellen vorhanden. Der Median lag bei 2,5%. Es bestand kein signifikanter Unterschied (p=0,84).

4.9.11. CD8⁺/INF-γ⁺ Zellen

In der Gruppe der Gesunden waren maximal 2%, minimal 0% und im Mittel 0,6% \pm 0,8% der CD8⁺/INF- γ^+ Zellen nachzuweisen. Der Median lag bei 0%. In der Gruppe der Atopiker waren maximal 3%, minimal 0% und im Mittel 0,5% \pm 0,9% CD8⁺/INF- γ^+ Zellen nachzuweisen. Der Median lag bei 0%. Es bestand kein Unterschied zwischen beiden Gruppen (p=1,0). In der Gruppe der Gesunden fanden sich maximal 91%, minimal 11% und im Mittel 39% \pm 25,6% CD8⁺/INF- γ^+ Zellen. Der Median lag bei 31%. In der Gruppe der Atopiker fanden sich maximal 52%, minimal 20% und im Mittel 36,7% \pm 10,5% CD8⁺/INF- γ^+ Zellen. Der Median lag bei 37%. Die Signifikanz betrug p=0,63. In der Gruppe der Gesunden war in 3 von 12 Fällen (25% des Kollektivs) mehr als 60% CD8⁺/INF- γ^+ Zellen nachzuweisen. In der Gruppe der Atopiker hingegen war in keinem Fall mehr als 52% CD8⁺/INF- γ^+ Zellen nachzuweisen.

4.9.12. CD4⁺/IL-2⁺ und CD8⁺/IL-2⁺ Zellen im Vergleich

Nach Stimulation waren in der Gruppe der Gesunden mehr CD4⁺/IL-2⁺ Zellen (46 $\% \pm 19,3 \%$) als CD8⁺/IL-2⁺ Zellen (18 $\% \pm 13,6\%$) nachzuweisen. Es waren signifikant mehr CD4⁺ Zellen positiv für anti-IL-2 als CD8⁺ Zellen (p=0,002). In der Gruppe der Atopiker waren ebenfalls mehr CD4⁺/IL-2⁺ Zellen (39,5 $\% \pm 11$ %) als CD8⁺/IL-2⁺ Zellen (14 $\% \pm 9,9\%$) nachzuweisen. Es waren signifikant mehr CD4⁺ Zellen positiv für anti-IL-2 als CD8⁺ Zellen (9=0,012).



Abb.19: Vergleich CD4⁺/IL-2⁺ und CD8⁺/IL-2⁺ Zellen nach Stimulation

gesund: 12 Kontrollen, atopisch: 8 Atopie-Patienten Es sind in beiden Gruppen signifikant mehr CD4⁺/IL-2⁺Zellen als CD8⁺/IL-2⁺Zellen nachzuweisen (p<0,05; Wilcoxon Test).

4.9.13. CD4⁺/IL-4⁺ und CD8⁺/IL-4⁺ Zellen im Vergleich

Nach Stimulation bestand in der Gruppe der Gesunden kein signifikanter Unterschied (p=0,206) zwischen CD4⁺/IL-4⁺ und CD8⁺/IL-4⁺ Zellen. Es waren 3 % \pm 2,7 % CD4⁺/IL-4⁺ Zellen und 2,3 % \pm 1,5 % CD8⁺/IL-4⁺ Zellen nachzuweisen. In der Gruppe der Atopiker waren 3,4 % \pm 3,4 % CD4⁺/IL-4⁺ Zellen und 2,4 % \pm 1,5 % CD8⁺/IL-4⁺ Zellen nachzuweisen. Es bestand kein signifikanter Unterschied (p=0,496).

4.9.14. CD4⁺/INF- γ^+ und CD8⁺/INF- γ^+ Zellen im Vergleich

Nach Stimulation waren sowohl in der Gruppe der Gesunden als auch in der Gruppe der Atopiker signifikant mehr CD8⁺/INF- γ^{+} Zellen als CD4⁺/INF- γ^{+} Zellen. In der Gruppe der Gesunden waren 24 % ± 16% CD4⁺/INF- γ^{+} Zellen und 39 % ± 25,6 % CD8⁺/INF- γ^{+} Zellen nachzuweisen (p=0,003). In der Gruppe der Atopiker waren 18,7 % ± 6% CD4⁺/INF- γ^{+} Zellen und 36,7 % ± 10,5 % CD8⁺/INF- γ^{+} Zellen nachzuweisen (p=0,018).



Abb.20: CD4⁺/INF- γ^+ und CD8⁺/INF- γ^+ Zellen nach Stimulation; gesund: 12 Kontrollen; atopisch: 8 Atopie-Patienten. In beiden Gruppen waren signifikant mehr CD8⁺/INF- γ^+ Zellen nachzuweisen als CD4⁺/INF- γ^+ Zellen (Wilcoxon Test).

4.9.15. Zytokinmuster von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen

Das Zytokinverteilungsmuster (IL-2, IL-4, INF- γ) von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen unterschied sich zwischen Atopie-Patienten und Gesunden nicht signifikant (p>0,05).

Der bei der Untersuchung der gesamten T-Zellpopulation gefundene Unterschied der INF-γ positiven Zellen zwischen Kontrollgruppe und Atopie-Patienten konnte bei Untersuchung der Subpopulationen statistisch nicht nachgewiesen werden.

Ohne Stimulation waren in beiden Gruppen tendenziell mehr $CD4^+/IL-2^+$ Zellen und $CD8^+/IL-2^+$ Zellen als $CD4^+/IL-4^+$, $CD4^+/INF-\gamma^+$, $CD8^+/IL-4^+$ Zellen und $CD8^+/INF-\gamma^+$ Zellen nachzuweisen (siehe Abbildungen 21 und 22).





gesund: 11 Kontrollen; atopisch: 8 Atopie-Patienten

Tendenziell waren mehr $CD4^+/IL-2^+Zellen$ in beiden Gruppen nachweisbar (Wilcoxon Test; p>0,05).





gesund: 11 Kontrollen; atopisch: 7 Atopie-Patienten

Tendenziell waren in beiden Gruppen mehr $CD8^+/IL-2^+$ Zellen nachweisbar (Wilcoxon Test; p>0,05).

Nach Stimulation mit PMA und Ionomycin waren in der Gruppe der Gesunden und der Atopiker signifikant mehr CD4⁺/INF- γ^+ Zellen als CD4⁺/IL-4⁺ Zellen nachzuweisen (p<0,05). Auch waren in beiden Gruppen signifikant mehr CD4⁺/IL-2⁺ Zellen als CD4⁺/INF- γ^+ Zellen und CD4⁺/IL-4⁺ Zellen nachweisbar (p<0,05).



Abb.23: Zytokinverteilungsmuster der CD4⁺Zellen nach Stimulation

gesund: 10 Kontrollen, atopisch: 8 Atopie-Patienten

Es waren in beiden Gruppen signifikant mehr $CD4^+/IL-2^+Zellen$ nachweisbar im Vergleich zu $CD4^+/INF-\gamma^+$ und $CD4^+/IL-4^+$ Zellen (Wilcoxon Test; p<0,05).

Nach Stimulation mit PMA und Ionomycin waren sowohl in der Gruppe der Gesunden als auch in der Gruppe der Atopiker signifikant mehr CD8⁺/INF- γ^+ Zellen als CD8⁺/IL-2⁺ und CD8⁺/IL-4⁺Zellen nachzuweisen (p<0,05).

In beiden Gruppen waren signifikant mehr $CD8^+/IL-2^+$ als $CD8^+/IL-4^+Zellen$ nachzuweisen (p<0,05).





gesund: 10 Kontrollen; atopisch: 8 Atopie-Patienten

In beiden Gruppen waren signifikant mehr CD8⁺/INF- γ^+ und CD8⁺/IL-2⁺ Zellen nachweisbar als CD8⁺/IL-4⁺ Zellen (Wilcoxon Test; p<0,05).
5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Patienten mit einer atopischen Rhinitis Imbalanzen bei der Produktion von Zytokinen aufweisen, die einen regulatorischen Einfluss auf die IgE-Synthese besitzen. In *in vitro* Experimenten wurde die Sekretion von Interferon- γ , Interleukin-2 und Interleukin-4 quantitativ in Zellkulturüberständen von peripheren Blutleukozyten bestimmt. Zusätzlich wurden auf dem Niveau der Einzelzelle die Zytokine IL-2, IL-4 und INF- γ in der Durchflußzytometrie mit monoklonalen Antiköper untersucht und die Untersuchung auf CD4⁺T-Helferzellen und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen ausgedehnt. Parallel zur Zytokinbestimmung wurde durchflußzytometrisch die Expression von Oberflächenmarkern zur Bestimmung der Zusammensetzung der Lymphozytensubpopulationen und die Expression von Aktivitätsmarkern untersucht.

Folgende Fragestellungen sollten beantwortet werden: "1. Lässt sich die bei der Atopie postulierte Zytokindysregulation durch Bestimmung der Sekretion von TH1-Zytokinen (INF- γ , IL-2) und TH-2-Zytokinen (IL-4, IL-10) in den Zellkulturüberständen anhand unseres Patientenkollektivs nachvollziehen? 2. Gibt es einen Unterschied in der Frequenz der zytokinproduzierenden Zellsubtypen zwischen Atopie-Patienten und Gesunden? 3. Besteht alternativ eine intrinsisch veränderte Kompetenz/Unfähigkeit der T-Zellen zur Produktion von TH1- oder TH2-Zytokinen?"

Atopische Erkrankungen zeigen eine Prävalenz von 20-30% in der Gesamtbevölkerung westlicher Staaten und zählen somit zu den häufigsten (Bellanti, 1998). Zytokinimbalanzen Erkrankungen tragen mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Pathogenese atopischer Erkrankungen bei. Die erhöhte Produktionen des TH2-Zytokins IL-4 und die verminderte Produktion des TH1-Zytokins INF-y ist bei atopischen Erkrankungen wie Asthma und atopischer Dermatitis beschrieben worden (Reinhold et al., 1989; Rousset et al., 1991; Jujo et al., 1992; Tang et al., 1993). Es ist noch nicht bewiesen, ob dieses Ungleichgewicht bei allen atopischen Erkrankungen zu finden ist. Nachdem diese Zytokinimbalanzen mit einer präferentiellen TH-2-Antwort für das allergische

Asthma bronchiale und die atopische Dermatitis von den o.g. Autoren bewiesen wurden, war es Ziel dieser Arbeit, das Zytokinprofil bei einer Patientengruppe mit atopischer Rhinitis zu untersuchen. Zytokinimbalanzen könnten genetisch determiniert sein und der Entwicklung atopischer Erkrankungen vorausgehen. Hierzu zählt die verminderte INF- γ -Produktion im Nabelschnurblut von Neugeborenen, die im Verlauf atopische Erkrankungen entwickeln (Warner et al., 1994; Tang et al., 1994). Die Interferon- γ -Produktion von Nabelschnur-T-Zellen scheint daher genetisch determiniert zu sein und ist bei Kindern aus Atopikerfamilien (beide Eltern Atopiker) geringer (Rinas et al., 1993). Ebenso vorbeschrieben ist, dass ein IL-4-Rezeptorgenpolymorphismus bei Atopie-Patienten signifikant häufiger nachweisbar ist.

5.1. Aktivitätsmarker

Nach Isolierung der Lymphozyten wurden die T-Zellen auf ihren Aktivierungsgrad, mittels der damit assoziierten Oberflächenantigenen, wie IL-2-Rezeptoren und HLA-II-Antigene auf T-Zellsubpopulationen, untersucht. Die beiden Probandengruppen unterschieden sich weder in der Häufigkeit CD8⁺Zellen noch CD4⁺Zellen. Der CD4/CD8 Quotient unterschied sich nicht. Von den untersuchten Aktivierungsantigenen (HLADR, CD45RA, CD29, CD25) war als einziges eine signifikante Vermehrung der CD4⁺/CD29⁺ Memory T-Zellen (Helper Inducer Zellen) bei den Atopie-Patienten zu dokumentieren. Im Allgemeinen exprimieren CD45RO⁺-T-Gedächtniszellen (Memory-Zellen) das Adhäsionsmolekül CD29 an ihrer Oberfläche (Palma-Carlos et al 1995). Karlsson et al. berichteten 1994 über eine Vermehrung aktivierter Zellen unter den Probanden mit saisonaler allergischer Rhinitis auch während der pollenfreie Saison. Desweiteren fand ein zusätzlicher Anstieg aktivierter T-Zellen nach nasaler Allergenprovokation bei Patienten mit atopischer Rhinitis statt. Die Häufigkeit naiver CD45RA⁺/CD4⁺-Zellen war während der Pollensaison signifikant angestiegen und im weiteren Verlauf fand ein "Switch" von naiven Zellen zu Gedächtniszellen mit hoher CD29-Expression statt. Diese Zellen besaßen eine "homing-tendency" zur nasalen Mucosa. Diese Ereignisse traten bei gesunden, nicht atopische Individuen nicht auf (Karlsson et al., 1994). In einer Arbeit von Pawlik et al. 1997 wird dagegen von einer verminderten Population von Gedächtniszellen (CD4⁺/CD45RO⁺) bei atopischen Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe berichtet. Die Populationen der naiven CD45RA⁺Zellen unterschieden sich nicht in den untersuchten Gruppen. Der Anteil von CD4⁺/CD45RO⁺Zellen vermehrte sich während natürlicher Antigenexposition (Gräserpollensaison) bei Allergikern mit saisonalen Symptomen. Hier wurde auch von einer "homing-tendency" der CD45RO⁺Zellen und einem Phenotyp-Switch nach Antigenexposition von CD45RA⁺ zu CD45RO⁺ mit konsekutiver Vermehrung der Gedächtniszellen berichtet.

5.2. Interleukin-2

Zellen von Patienten mit atopischer Rhinitis und gesunden Kontrollpersonen unterschieden sich in dieser Arbeit signifikant in ihrer Fähigkeit zur IL-2-Produktion nach Stimulation mit PHA (p=0,001). Die Zellen der gesunden Kontrollen synthetisierten nahezu doppelt soviel IL-2 wie Zellen von Atopie-Patienten. Im Serum beider Kollektive fand sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Interleukin-2-Konzentrationen. Die maximale Stimulation war mit PHA nach 24-48 Stunden Inkubationsdauer erreicht. Die gleichen Ergebnisse wurde auch von anderen Autoren beschrieben (Lewis et al., 1988; Baroja et al., 1987). PHA aktiviert vor allem T-Lymphozyten durch Bindung an Oberflächenantigene, ein direkter Kontakt der T-Zelle zu anderen Zelltypen ist nicht notwendig. Ursächlich für den Abfall der IL-2-Konzentrationen im Kulturmedium nach 48 Stunden ist wahrscheinlich ein vermehrter Verbrauch durch die Internalisierung des an dem IL-2-Rezeptor gebundenen IL-2. Die durch Aktivierung der Lymphozyten stimulierte IL-2-Rezeptor-Expression nach 24 Stunden führte dazu, dass der Verbrauch von IL-2 seine Neubildung übertrifft (Nelson et al., 1986). Für diese These spricht die Beobachtung, dass nach Blockade der IL-2-Rezeptoren durch Anti-Tac-Antiköper (Anti-CD25) die IL-2Konzentration im Kulturüberstand nach 24 Stunden weiter ansteigt bzw. ein Plateau erreicht (Baroja et al., 1987). In der Literatur sind die Ergebnisse bei erwachsenen Atopie-Patienten in Bezug auf die IL-2-Produktion nicht einheitlich. Während Romano et al. (1992) eine signifikant verminderte IL-2-Produktion bei Atopie-Patienten im Vergleich zu Gesunden nachwiesen, fanden Kägi et al. (1994) keine Unterschiede in der IL-2-Produktion von Zellen von Patienten mit atopischer Dermatitis im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. Auch die Untersuchung von allergenspezifischen T-Zellklonen von Patienten mit schwerer atopischer Erkrankung zeigte eine ausgesprochen variable IL-2-Produktion, während dieselben T-Zellklone durchgängig fast kein INF-γ produzierten (Parronchi et al., 1991). Kapp et al. (1991), zeigte in gleicher Weise wie die hier vorliegende Arbeit eine signifikante Verminderung der IL-2-Synthese in einem Kollektiv von 30 Patienten mit atopischer Dermatitis nach Stimulation mit PHA im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die genaue Bedeutung von IL-2 in der Pathogenese atopischer Erkrankungen bleibt somit unklar. Eine entscheidende Bedeutung scheint aber dem Ausmaß der IL-2-Produktion nicht zuzukommen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten eine verminderte Sekretion von IL-2 bei Atopie-Patienten nach Stimulation mit T-Zell-Mitogenen, verursacht entweder durch eine verminderte Stimulierbarkeit, eine supprimierende Wirkung von regulatorischen Zellen oder aber eine verminderte Frequenz von zur IL-2-Produktion befähigten T-Zellen.

5.3. Interleukin-4

Sowohl im Serum als auch im Kulturüberstand nach Stimulation mit dem Mitogen PHA war signifikant mehr IL-4 in der Gruppe der Atopie-Patienten nachweisbar. Die im Vergleich zu IL-2 und INF-γ nur geringen Mengen an IL-4 könnten auf einen nur kleinen Anteil zur IL-4-Synthese fähigen T-Zellen schließen lassen. Andersson et al. (1990) konnten mit Hilfe von Fluorescein-markierten, monoklonalen Antikörpern gegen IL-4 zeigen, dass nach Stimulation mit Ionomycin und PMA in Lymphozytenkulturen von Erwachsenen nur 1-3% der Zellen IL-4 produzierten. Ähnliche Ergebnisse fanden Lewis et al. (1988) mittels der mRNA-Hybridierungstechnik. Nach Stimulation mit OKT3 bildeten hier nur 0,1% der Zellen IL-4. Dieser Anteil konnte durch zusätzliche Stimulation mit IL-2 aber auf 3,1% gesteigert werden. Im Serum von Atopie-Patienten fand sich signifikant mehr IL-4 als in den korrespondierenden stimulierten Zellkulturüberständen von isolierten Zellen. Dieser Befund könnte auch auf den schon zuvor erwähnten nur kleinen Anteil der zur IL-4-Synthese fähigen T-Zellen zurückzuführen sein. Zellseparationsverfahren mit mehrfachen Waschschritten, die für die Bestimmung der IL-4-Konzentration in den Zellkulturüberständen der stimulierten PBMNCs notwendig waren, führten möglicherweise zu einer Verringerung der zur IL-4-Synthese fähigen Zellen. Auch könnte die unspezifische Zellaktivierung mit simultaner Produktion von Interferon-y eine IL-4-Produktion inhibieren. Alldies könnte dazu geführt haben, dass die messbare Konzentration in den Zellkulturüberständen geringer war als nach direkter Messung im Serum. Eine alternative Erklärung besteht darin, dass die in vivo Antigen-spezifische Stimulation hohe IL-4-Serumspiegel bewirkt, während in vitro nach unspezifischer Stimulation der T-Zellen mit PHA eine nur geringe IL-4 Zytokinsekretion erreichen lässt.

5.4. Interferon-gamma

Die INF- γ -Konzentration im Serum war in der Gruppe der Atopie-Patienten signifikant geringer als in der Gruppe der Gesunden. Auch nach Stimulation war in den Zellkulturüberständen von den gesunden Kontrollen signifikant mehr INF- γ nachzuweisen als bei den Atopie-Patienten. Bei erwachsenen Atopie-Patienten konnte ein Zusammenhang zwischen erhöhter IgE-Serum-Konzentration und verminderter IFN- γ -Produktion *in vitro*, sowie eine generell verminderte INF- γ -Produktion *in vitro* nach Stimulation mit verschiedenen Mitogenen nachgewiesen werden (Rheinhold et al., 1988; Kapp et al., 1987). Ob die verminderte IFN- γ -Produktion bzw. die eingeschränkte Aktivierbarkeit von TH1-Zellen einen primären Defekt darstellt, der im Rahmen von atopischen Erkrankungen zu einer fehlenden Hemmung der IL-4-Synthese führt, die wiederum eine gesteigerte IgE-Synthese zur Folge hat, oder ob umgekehrt eine präferentielle Aktivierbarkeit von TH2-Zellen mit nachfolgendem IL-4-Überschuss eine supprimierte INF-γ-Produktion bewirkt, ist durch Untersuchung der Zellkulturüberstände nicht zu klären.



Abb.25: Überwiegen der TH2-Zytokin-Antwort bei Atopie-Patienten

5.5. Intrazellulärer Zytokinnachweis auf Einzelzellniveau

Während der letzten Jahre wurde zunehmend evident, dass die Produktion der meisten Zytokine nicht an einem Zelltyp gebunden ist. Mit der in Kapitel 3 beschriebenen Methode ist die Erfassung der Zytokinproduktion auf Einzelzellniveau möglich. So kann die Kontribution von einzelnen Zellsubtypen zur Gesamtzytokinproduktion in einer heterogenen Lymphozytenpopulation ermittelt werden. Sander et al. gelang erstmals 1991 eine intrazelluläre Zytokinbestimmung nach Fixation mit Paraformaldehyd, Permeabilisation mit Saponin und nachfolgender indirekter Immunofluoreszenzfärbung in der Fluoreszenzmikroskopie. Jung et al. (1993) modifizierten diese Methode. Sie ergänzten Monensin, ein carboxylisches Ionophor, welches die intrazellulären Transportprozesse blockierte. Folglich fand eine Akkumulation der Zytokine im Golgi-Komplex statt. Die Verstärkung der intrazellulären Färbung ermöglichte eine Messung mittels Laser Flow Zytometrie und die Detektion von schwach fluoreszierenden Zellen, wie z.B. IL-4 produzierenden Zellen. Die Arbeit von Jung (1993) zeigte eine signifikante Korrelation der flowzytometrischen und mikroskopischen Analysen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Zytokinimbalanzen bei Atopie-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine Alteration in der Verteilung spezifischer T-Zellsubtypen oder eine intrisische Dysregulation der Zytokinproduktion zugrunde liegen. Einzig unterschiedlich war der Anteil zur INF- γ Synthese fähige Zellen (p<0,05) in der gesamten T-Zell-Population. Bei den gesunden Kontrollpersonen waren fast doppelt so viel aller T-Zellen zur INF- γ -Produktion fähig als bei den Atopie-Patienten. Die vorliegende Untersuchung konnte weder einen signifikanten Unterschied in der CD4⁺ und CD8⁺ Zellverteilung zwischen Atopikern und Gesunden, noch einen Unterschied in der Produktion der Zytokine IL-2, IL-4 und INF- γ in der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellsubpopulationen nachweisen. Untersuchungen von Jung et al. (1995) konnten auf intrazellulärer Ebene eine signifikante Minderproduktion von INF- γ bei CD4⁺, nicht jedoch bei CD8⁺ Zellen von Atopikern nachweisen. Ebenfalls war die Produktion von IL-2 in beiden Zellsubtypen vermindert. Die Anzahl der IL-4-

positiven Zellen unterschied sich nicht in beiden Kollektiven. Nakazawa et al. (1997) untersuchten bei 45 Patienten mit atopischer Dermatitis und 24 gesunden Kontrollen ebenfalls die intrazelluläre Konzentration von IL-2, IL-4 und INF-y auf Einzelzellniveau. PBMNC wurden für 6 Stunden mit immobilisiertem anti-CD3-Antikörper in Anwesenheit von Monensin stimuliert. Die Häufigkeit IL-4 produzierender CD4⁺ Zellen und CD8⁺ Zellen von Patienten mit atopischer Dermatitis war in seiner Arbeit signifikant höher als bei gesunden Kontrollen. Die Frequenz der INF-y produzierenden CD4⁺ und CD8⁺ Zellen war signifikant niedriger als bei der gesunden Kontrollgruppe. Die Häufigkeit der IL-2 produzierenden Zellen war bei beiden Kollektiven gleich. Die Tatsache, dass bei der hier vorgelegten Arbeit kein Unterschied nachweisbar war, könnte in unterschiedlichen Patientenkollektiven begründet sein. Alle Patienten mit dem Krankheitsbild der allergischen Rhinitis hatten eine milde bis moderate Erkrankung. Die Untersuchungen wurden zudem zu einem Zeitpunkt durchgeführt, als keine saisonale Exposition gegeben war. Es fand somit wahrscheinlich keine spezifische allergeninduzierte Stimulation statt, zum Beispiel mit Pollen. Jedoch sind trotz fehlender signifikanter Unterschiede folgende Tendenzen zu vermerken:

1. In der Gruppe der Gesunden waren nach Stimulation aller T-Zellen tendenziell mehr IL-2⁺ und tendenziell weniger IL-4⁺ Zellen als in der Gruppe der Atopie-Patienten nachweisbar.

2. Nach Stimulation waren in der Gruppe der Gesunden tendenziell mehr $CD4^+/INF-\gamma^+$ und $CD4^+/IL-2^+$ Zellen vorhanden als in der Gruppe der Atopie-Patienten.

3. Atopie-Patienten hatten nach Stimulation tendenziell mehr CD4/IL-4⁺ Zellen.

4. Die gesunden Kontrollpersonen hatten tendenziell mehr $CD8^+/IL-2^+$ und $CD8^+/INF-\gamma^+$ Zellen.

Somit könnte die fehlende Signifikanz der vorliegenden Ergebnisse auch auf die Größe der Stichprobe zurückzuführen sein.

6. Zusammenfassung

Bei atopischen Erkrankungen wurde eine Dysbalance der Zytokinproduktion zugunsten sogenannte TH2-Zytokine (IL-4,IL-10) und zu ungunsten sogenannter TH1-Zytokine (IL-2, INF- γ) beschrieben. Diese Dysbalance zeigt sich bei der Untersuchung der genannten Zytokine in den Zellkulturüberständen von peripheren Blutzellen von Atopie-Patienten. Diese kann einerseits verursacht werden durch ein zahlenmäßiges Überwiegen von TH2-Zellen oder durch eine vermehrte IL-4 oder IL-10 Produktion der vorhandenen TH-2-Zellen bzw. verminderte INF- γ -Produktion der vorhandenen TH1-Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage untersucht, ob bei mononukleären Zellen von Patienten mit dem Krankheitsbild der atopischen Rhinitis eine Alteration der Verteilung spezifischer T-Zellsubtypen (CD4⁺ und CD8⁺) und eine bevorzugte Produktion von dem TH2-Zytokin IL-4 sowie eine verminderte Produktion von den TH1-Zytokinen IL-2 und INF-γ nachzuweisen ist. Zusätzlich wurde untersucht, ob sich die postulierte Dysregulation des Zytokinverteilungsmusters von TH1- und TH2-Zytokinen bei Atopie-Patienten an unserem Patientengut mit atopischer Rhinitis nachvollziehen lässt. Es wurden auch Aktivitätsmarker (CD25, CD29, CD45RA, HLA-DR) verschiedener T-Zellsubtypen im Blut bestimmt, um Vergleiche zur gesunden Kontroll-Gruppe zu stellen. Folgende Ergebnisse können dargelegt werden:

1. Im Serum der Atopiker war signifikant weniger INF- γ nachweisbar als im Serum der gesunden Kontrollen. Nach Stimulation mit PHA war in den Kulturüberständen der Atopiker signifikant weniger IL-2 und INF- γ nachzuweisen als in den gesunden Kontrollen. Hingegen war in der Gruppe der Atopiker sowohl im Serum als auch in den Zellkulturüberständen der stimulierten Zellen signifikant mehr IL-4 nachzuweisen als bei den gesunden Kontrollen.

2. In der Gruppe der Atopie-Patienten waren signifikant mehr CD4⁺/CD29⁺Zellen im Blut nachzuweisen als bei den gesunden Kontrollen.

3. Eine signifikante Alteration der Verteilung von $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen und ihre Produktion von IL-2, IL-4 und INF- γ lässt sich bei unserem atopischen Patientenkollektiv im Vergleich zu den gesunden Kontrollen nicht nachweisen. In

der Gesamt-T-Zellpopulation jedoch waren sowohl vor Stimulation als nach Stimulation signifikant mehr INF- γ^+ Zellen bei den gesunden Kontrollen nachweisen als bei den Atopie-Patienten.

Somit konnte bei den Atopie-Patienten mit dem Krankheitsbild einer allergischen Rhinitis die bei der Atopie postulierte Zytokindysregulation nachvollzogen werden. Das Überwiegen des TH2-Zytokins IL-4 gegenüber den TH1-Zytokinen IL-2 und INF- γ konnte bei unseren Patienten bestätigt werden. Das Paradigma der präferentiellen TH2-Immunantwort konnte von der atopischen Dermatitis und des allergischen Asthma bronchiale auf die atopische Rhinitis ausgedehnt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass im Blut der Atopiker signifikant mehr "Memory Cells" (CD45RO⁺), die das Adhäsionsmolekül CD29 an ihrer Oberfläche besitzen, vorhanden sind als bei den gesunden Kontrollen.

Ein Unterschied in der Verteilung der T-Zellsubpopulationen konnte nicht gefunden werden. Der bei der Untersuchung der gesamten T-Zellpopulation gefundene signifikanter Unterschied der INF-γ-Positivität konnte bei Untersuchung der Subpopulationen der T-Zellen statistisch nicht nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass das veränderte Zytokinverteilungsmuster der Atopie-Patienten mit allergischer Rhinitis auf eine intrinsische Funktionsstörung zurückzuführen ist.

7. Literaturverzeichnis

Andersson, A., Andersson, J. et al. (1990) Simultaneous production of IL-2, IL-4 and INF- γ by activated human blood lymphocytes. Eur. J. Immunol. 20:1591-1596

Armitage, R.J., Fanslow, C.F., Sato, S.A. et al (1992) Molecular and biological characterisation of a murine ligand for CD 40. Nature 357:80

Asao, H., Takeshita, T., Nakamura, M., Nagata, K. et al. (1990) Interleukin 2 (IL-2)-induced tyrosine phosphorylation of IL-2 receptor p75. J. Exp. Med., 171:637-644

Banchereau, J., de Paoli, P., Valle, A. et al. (1991) Long term human B cell lines dependant on interleukin-4 and antibody to CD40. Science 251:70-72

Baroja, M.L., Ceuppens, J.L. (1987) More exact quantification of interleukin-2 production by addition of anti-Tac monoclonal antibodies to cultures of stimulated lymphocytes. J. Immunol. Meth. 98:267-270

Bauer, C.P.; Schlemmer, P. (1990) Nahrungsmittelallergien: Allergologie im Kindesalter. Hans Marseille Verlag, München

Bellanti, J.A. (1998) Cytokines and allergic diseases: clinical aspects Allergy and asthma proceedings. 19:337-41

Benhamou, M., Siraganian, R.P. (1992) Signal tranduction by Fc receptors: the FccRI case. Immunol. Today 13:195-197

Benhamou, M., Gutkind, J.S. et al. (1990) Tyrosine phosphorylation coupled to IgE receptor-mediated signal tranduction and histamine release. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:5327

Benhamou, M., Siraganian, R.P. (1992a) Protein-tyrosine phosphorylation: an essential component of FccRI signaling. Immunol. Today 13:195

Benhamou, M., Stephan,V. et al. (1992b) Tyrosine phosphylation of 110 kDa protein in rat basopholic leukemia cells : Association with the exocytic process. J. Biol. Chem. 267:7310

Benhamou, M., Ryba,N.J. et al. (1993) Protein-tyrosine kinase p72^{syk} in high affinity IgE receptor signaling. Identification as a component of pp72 and

association with the receptor γ chain after receptor aggregation. J. Biol. Chem. 268:23318

Benhamou, M., Feuillard, J., Lortholay, O. (1996) Protein-tyrosine-kinases in activation signal of human basophils through the immunoglobulin R receptor type I. J. Leukoc. Biol. 59:461

Betz, M., Fox, B.S. (1991) PGE1 inhibits production of TH1 lymphokines but not of TH2 lymphocytes. J. Immunol. 146:108-113

Blackwell, T.K.; Alt, F.W. (1988) Immunglobulin genes. In Hames, B.D., Glover, D.M., eds. Molecular immunology. Oxford: IRL 1988:1

Bonnefoy, J.Y., Defrance, T., Peronne, C. et al. (1988) Human recombinant IL-4 induces normal B cells to produce soluble CD23/IgE-binding factor analogous to that spontaneously released by lymphoblastoid B cell lines. Eur. J. Immunol. 18:117-122

Bonnefoy; J.Y., Shields, J., Mermod, J.J. (1990) Inhibition of human interleukin-4 induced IgE synthesis by a subset of anti-CD23/Fc epsilon RII monoclonal antibodies. Eur. J. Immunol. 20:139-144

Brandhuber, B.J., Boone, T., Kenney, W.C. et al. (1987) Three-dimensional structure of interleukin-2. Science 238:1707-1709

Bujanowski-Weber, J., Knöller, I., Brings, B et al. (1990) Correlation of soluble CD23 release and immunoglobulin (E, A, G, M) synthesis by peripheral blood lymphocytes of atopic patients. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 92:113-118

Bujanowski-Weber, J., Knöller, I., Brings, B. et al. (1988) Detection and characterisation of IgE-binding factors (IgE-BF) within supernatants of cell line RPMI 8866, normal sera and sera from atopic patients Immunology 65:53

Butler, M., Atherton, D., Levinsky, R.J. (1982) Quantitative and functional deficit of suppresser T cells in children with atopic eczema. Clin. Exp. Immunol. 50:90-98

Chan, M.A., Benedict, S.H., Dosch, H.H. et al. (1990) expression of IgE from nonarranged ε locus in cloned lymphoblastoid cells that also express IgM. J. Immunol. 144:3563

Coca, A.F.; Cooke, R.A. (1923). On the classification of the phenomenon of hypersensitiveness. J. Immunol. 8: 163-182

Coca, A.F.; Groove, E.F. (1925) Studies in hypersensitiveness. XIII. A study of atopic reagins. J. Immunol. 10: 445-463

Coffmann, R.L., Carty, J.A. (1986) T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-γ. J. Immunol. 136:949

Conrad, D.H. (1990) Fc epsilon RII/CD23: the low affinity receptor for IgE. Ann. Rev. Immunol. 8:623-645

Defrance, T., Aubry, J., Rousset, F. et al. (1987) Human recombinant interleukin-4 induces Fc-receptors (CD23) on normal B lymphocytes. J. Exp. Med. 165:1459

Del Prete, G.F. (1992). Human TH1 and TH2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. Allergy 47: 450-455

Del Prete, G.F., Maggi, S.R., Parronchi, P. et al. (1988) IL-4 is an essential factor for IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. J. Immunol. 140:4193-4198

Delespesse, G., Sarfatti, M., Hofstetter, H. (1989) Human IgE-binding factors. Immunol. Today. 10:159-164

Depper, J.M., Leonard, W.J., Drogula, C. et al. (1985) Interleukin augments transcription of IL-2 receptor gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:4230

Esser, C.; Radbruch, A. (1990). Immunoglobulin class switching: molecular and cellular analysis. Annu. Rev. Immunol. 8: 717

Farrar, J.J., Benjamin, W.R., Hilfiker, M.L. et al. (1982) The biochemistry, biology and the role of interleukin-2 in the induction of cytoxic T cell and antibody forming B cell responses. Immunol. Rev. 63: 129-166

Filgueira, L., Groscurth, P., Aguet, M. (1989) Binding and internalisation of gold-labelled IFN-γ by human Raji cells. J. Immunol. 142: 3436- 3439

Finney, M., Guy, G.R., Michell, R.H. et al. (1990) Interleukin-4 activates B lymphocytes via transient inositol lipid hydrolysis and delayed cyclic adenosine monophosphate generation. Eur. J. Immunol. 20:151-156

Fung, M.R., Ju, G., Greene, W.C. (1988) Cointernalisation of p55 and p70 subunits of the high affinity interleukin-2 receptor. Evidence for a stable tertiarnary receptor complex. J. Exp. Med. 168:1923-1928

Galizzi, J.P., Zuber, C.E., Harada, N. et al. (1990) Molecular cloning of a cDNA encoding the human interleukin-4 receptor. Int. Immunol. 2:669-675

Gauchat, J.F., Gascan, H., Roncarolo, M.G. et al. (1991) Regulation of human IgE synthesis: the role of CD4+ and CD8+ T-cells and the inhibitory effects of interferon- γ . Eur. Respir. J. 4. Suppl. 13:31s-38s

Gauchat, J.F., Lebman, D.A., Coffman, R.L. et al. (1990) Structure and expression of germline epsilon transcripts in human B cells induced by IL-4 to switch to IgE production

Gell, P.G. und Coombs, P.J. (1975) Clinical aspects of immunology. Blackwell, Oxford

Gemsa, D., Kalden, J.R., Resch, K. (1997) Immunologie

Germain, G.N. (1993). The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. Annu. Rev. Immunol. 11: 403-50

Graß, T.; Wahn, U. (1991). Das Atopiesyndrom im Kindesalter Monatsschr. Kinderheilkunde 139: 316-322

Gray, P.W., Leong, S., Fennie, E. et al. (1989) Cloning and expression of cDNA for the murine interferon-γ receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:8497-8501

Gray, P.W., und Goeddel, D.V. (1982) Structure of the human interferon gene. Nature 298:859-863

Hoeger, PH. Niggemann, B., et al. (1994) Serum levels of sCD23 and sCD25 in children with asthma and in healthy controls. Allergy 49(4):217-21

Howard, M., Matis, L., Malek, T.R. et al. (1983) Interleukin-2 induces antigen reactive T cell lines to secrete BCGF-I. J. Exp. Med. 158:2024-2039

Idzerda, R.L., March, C.J., Mosley, B. et al. (1990) Human interleukin-4 receptor confers biological responsiveness and defines a novel receptor superfamily. J. Exp. Med. 171:861-873

Ishizaka, A., Sakiyama, J., Nakanishi, M. et al. (1990) The inductive effect of interleukin-4 on IgG4 and IgE synthesis in human peripheral blood lymphocytes. Clin. Exp. Immunol. 79:392-396

Ishizaka, K.; Ishizaka, T., (1967). Identification of E-antibody as carrier of reagenic activity. J. Immunol. 99: 1187-1196

Jabara, H.H., Fu, S.M., Geha, R.S. et al. (1990) CD40 and IgE: synergism between anti-CD40 mAb and IL-4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human b cells. J. Exp. Med. 172:1861

Jabara, H.H., Loh, R., Vercelli, D. et al. (1993) Sequential switching from μ to ϵ via γ 4 in human β cells stimulated with IL-4 and hydrocortison. J. Immunol. 151:4528-4533

Jelinek, H.H., Lipsky, P.E. (1987) Regulation of human B lymphocyte activation, proliferation and differentiation. Adv. Immunol. 40: 1-59

Jujo, K., Renz, H et al. (1992) Decreased interferon-γ and increased interleukin-4 production in atopic dermatitis promotes IgE synthesis. J Allergy Clin Immunol 1992:90:323-6

Kägi, M. K., Wüthrich, B. et al. (1994) Differential cytokine profiles in peripheral blood lymphocyte supernatants and skin biopsies from patients with different form of atopic dermatitis, psoriasis and normal individuals. Int. Arch. Allergy Immunol. 103:332-340

Kapp, A., Gillitzer, R. et al. (1987) Production of interferon and lymphoproliferative response in whole blood cultures derived from patients with atopic dermatitis. Arch. Dermatol. Res. 270:55-58

Kapp, A., Neuner, P. et al. (1991) Production of interleukin-2 by mononuclear cells in vitro in patients with atopic dermatitis and psoriasis. Comparison with serum interleukin-2 receptor levels. Acta Derm. Venereol. 71(5):403-6

Karlsson, M.G., Hellquist, H.B., J. (1994) Phenotype switch and activation of Tlymphocytes in patients with allergic rhinitis. Otorhinolarngol. Relat. Spec. Mai-Jun.; 56(3).166-72

KE, **Z**., Clark, E.A., Saxon, A. (1991) CD40 stimulation provides an INF- γ independent and IL-4 dependant differentiation signal directly to human B cells for IgE production. J. Immunol. 146:1836-1842

Kjellman, N.I.M. (1987) Atopie Früherkennung und Prophylaxe. In Wahn (eds.) Päd. Allergologie und Immunologie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York **Klein, J**. (1991) Immunologie. 1. Aufl. VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge

Ledbetter, J.A., Clark, E.A., Norris, N.A. et al. (1987) Expression of a functional B cell receptor CDw40 (Bp50) on carcinomas. In McMichael ed. leukocyte typing III. white cell differentiation antigens. Oxford University 1987:432

Leung, D.Y.M., Geha, R.S. (1986) Immunoregulatory abnormalities in atopic dermatitis. Clin. Rev. Allergy. 4:67

Lewis, D.B., Prickett, K.S. et al. (1988) Restricted production of interleukin-4 by activated human T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 85:9743

Maeyer, E, De, Maeyer-Guignard, J., De, et al. (1991) Zur Übersicht: The Cytokine Handbook, Academic Press Limited 1. ed.:215-233

Maggi, E., Del Prete, G.F., Parronchi, P. et al. (1989) Role for T cells, IL-2 and IL-6 in the Il-4 dependent in vitro human IgE synthesis. Immunology 68:300-306

Mosmann, T.R.; Moore, K.W. (1991). The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. Immunol. Today 12: 49-53

Muraguchi, A., Hirano, T., Tang, B. et al. (1988) The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. J. Exp. Med. 67:332

Mygind, N. (1987) Rhinitis. In Wahn (eds.) Päd. Allergologie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgard, New York

Mygind, N., Dahl, R. (1996) Epidemiology of allergic rhinitis. Pediatr. Allergy Immunol. 7 (9 suppl): 57-62

Nelson, D.L., Kurmann, C.C. et al. (1986) The production of cellular IL-2receptors by cord blood mononuclear cells following in vitro activation. Ped. Res. 20:2:136

Paliard, X., De Waal Malefijt, R., Yssel, H. et al. (1988) Simultaneous production of IL-2, INF- γ and IL-4 by human lymphocyte clones. J. Immunol. 141:849-855

Palma-Carlos, A.G., Palma-Carlos, M.L. et al. (1995) Cytokines and adhesion molecules in respiratory allergy. Allerg. Immunol. Paris Jun; 27(6):178-81

Parronchi, P., Manetti, R. et al. (1991) Cytokine production by allergen specific T cell clones derived from patients with severe atopic disease. Int. J. Clin. Lab. Res. 21(2):186-189

Parronchi, P., Tiri, A. et al. (1990) Noncognate contact dependent B cell activation can promote IL-4 dependant in vitro human IgE synthesis. J. Immunol. 144:2102

Pawlik, I., Mackiewicz, U. et al. (1997); The differences in the expression of CD45 isoforms on peripheral blood lymphocytes derived from patients with seasonal or perennial atopic allergy. Tohoku J. Exp. Med. Mai; 182(1):1-8

Peleman, R., Delespesse, G. (1990) In vitro synthesis of human IgE by neonatal lymphocytes: enhancing effect of interferon-gamma. Cell. Immunol. 129:299-309

Pene, J., Rousset, F., Briere, F. et al. (1988a) Interleukin-5 enhances interleukin-4 induced IgE production by normal human B cells: the role of soluble CD23 antigen. Eur. J. Immunol. 18.929-935

Pene, J., Rousset, F., Briere, F., et al. (1988b) IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin-4 and suppressed by interferon- γ and - α and prostaglandin E2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6880-6884

Plaut, M., Pierce, J.H., Watson, C.J. et al. (1989) Mastcell lines produce lymphokines in response to cross linkage of FccRI or calcium ionophore. Nature 339:64-7

Prausnitz, C.; Küstner, H. (1921). Studien über die Überempfindlichkeit. Zentralbl. Bakt. 86: 160-169

Prinz, J.C., Baur, X., Mazur, G. et al. (1990) Allergen directed expression of Fc receptors for IgE (CD23) on human T lymphocytes is modulated by interleukin-4 and interferon- γ . Eur. J. Immunol. 20:1259-1264

Purkerson, J.M., Isakson, P.C. (1992) IL-5 provides a signal that is required in addition to Il-4 for isotype switching to IgG1 and IgE. J. Exp. Meth. 175:973-982

Rabin, E.M., Mond, J.J., Ohara, J. et al. (19869 Interferon- γ inhibits the action of B cell stimulatory factor (BSF)-1 on resting B cells. J. Immunol. 137: 1573

Raynal, M.C., Liu, Z., Hirano, T. et al. (1989) Interleukin-6 induces secretion of IgG1 by coordinated transcriptional activation and differential mRNA accumulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8024

Reinhold, U., Paweleg, G. et al. (1988) Immunoglobulin E and immunoglobulin G subclasses distribution in vivo and relationship to in vitro generation of interferon- γ and neopterin in patients with severe atopic dermatitis. Int. Arch. Allergy appl. Immunol. 87:120

Reinhold, U., Paweleg, G. et al. (1989) Cytokine release from cultered peripheral blood mononuclear cells of patients with severe atopic dermatitis. Acta Derm. Venereol. 1989:69:497-502

Reinhold, U., Wehrmann, W. et al. (1989) Evidence that defective interferon- γ production in atopic dermatitis is due to intrinsic abnormalities. Clin. Exp. Immunol. 79:374-379

Rheinhardt, D. (1987) Asthma bronchiale. Wahn (eds.) Päd. Allergologie und Immunologie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1987

Rinas, U., Horneff,G., Wahn, V. (1993) Inferon- γ production by cord-blood cells is reduced in newborns with a family history of atopic disease and is independent from cord-blood IgE-levels. Pediatric Allergy Immunl. 60-64

Rinderknecht, E., O'Connor, B. H. et al. (1984) Natural human interferon-γ. J. Biol. Chem. 259:6790-6797

Robb, R.J. (1985) Human interleukin-2. Methods Enzymol. 116:493-525.

Robb, R.J., Kutny, R.M., Chowdhry, V. (1983) Purification and partial sequence analysis of human T cell growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:5990-5994
Roitt, Ivan M. (1993) Leitfaden der Immunologie

Romagnani, S., Del Prete, G., Maggi, E. et al. (1989) Role of interleukins in induction and regulation of human IgE synthesis. Clin. Immunol. Immunopath. 50:13-23

Romano, M. F., Valerio, G. et al. (1992) Defects of CD2 and CD3 mediated activation pathways in T cells of atopic patients: Role of interleukin-2. Cell. Immunol. 139:91-97

Rousset, F., Robert, J., Andary, M. et al. (1991) Shifts in interleukin-4 and interferon- γ production by T cells by patients with elevated serum IgE levels and the modulatory effects of these lymphokines on spontaneous IgE synthesis. J Allergy Clin Immunol 87:59-69

Sarfati, M., Rector, E., Wong, K. et al. (1984) In vitro synthesis of IgE by human lymphocytes. Enhancement of the spontaneous IgE synthesis by IgE binding factors secreted by RPMI 8866 lymphoblastoid B cells. Immunol. 53:197

Seigel, L.J., Harper, M.E., Wong-Staal, M. et al. (1984) Gene for T cell growth factor: location on human chromosome 4q and feline chromosome B1. Science 223:175-178

Severinson, E., Fernandez, C., Stavnezer, J. (1990) Induction of germline immunoglobulin heavy chain transcripts by mitogens and interleukins prior to switch recombination. Eur. J. Immunol. 20:1079

Snapper, C.M., Finkelmann, F.D., Paul, W.E. (1988) Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin-4. Exp. Med. 167.183

Stephan, V. (1997) Die Charakterisierung und Modulation der allergischen Sofortreaktion im Rattenmastzellmodell, Shaker Verlag

Swendeman, S., Thorley-Lawson, D.A. (1987) The activation antigen BLAST-2 when shed, is an autocrine BCGF for normal and transformed B cells. EMBO J. 6:1634

Tang, M.L, Kemp, A.S. et al. (1993) IL-4 and interferon- γ production in children with atopic disease. Clin Exp Imunol. 92:120-4

Tang, M.L., Kemp, A.S et al. (1994) Reduced interferon- γ secretion in neonates and subsequent atopy. Lancet 344:983-5

Thyphronitis, G., Tsokos, G.C., June, C.H. et al. (1989) IgE secretion by Epstein-Barr virus infected purified human B lymphocytes is stimulated by interleukin-4 and suppressed by interferon-γ. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5580 **Tonegawa, S**. (1983). Somatic generation of antibody diversity. Nature 302: 575-581

Trinchieri, G., Matsumoto-Kobayashi, M., Clark, S.C. et al. (1984) Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin-2. J. Exp. Med. 160:1147-1169

Uchibayaschi, N., Kikutani, H., Barsumian, E.L. et al. (1989) Recombinant soluble Fcε receptor II (fcεRII/CD23) has IgE binding activity but no B cell growth promoting activity. J. Immunol. 142:3901-3908

Ullman, K.S., Northrop, J.P., Verweij, C.L. et al. (1990) Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link. Ann. Rev. Immunol. 8:421-452

Vercelli, D., Jabara, H.H, Arai, K. et al. (1989b) Endogenous IL-6 plays an obligatory role in IL-4 induced IgE synthesis. Eur. J. Immunol. 19:1419

Vercelli, D., Jabara, H.H., Arai, K. et al. (1989a) Induction of human IgE synthesis requires interleukin-4 and T/B cell interactions involving the T cell receptor CD23 complex and MHC class II antigens. J. Exp. Med. 169:1295-1307

Vercelli, D., Jabara, H.H., Lauener, R.P. et al. (1990) Interleukin-4 inhibits the synthesis of interferon- γ and induces the synthesis of IgE in mixed lymphocyte cultures. J. Immunol. 144:570

Vercelli, D., Jabara, H.H., Lee, B.W. et al. (1988) Human recombinant IL-4 induces FccRII/CD23 on normal human monocytes. J. Exp. Med. 167:1406-1416 Voigtländer,V. (1987) Atopische Dermatitis. Wahn (eds.) Päd. Allergologie und Immunologie, Gustav Fischer Verlag Stuttgard / New York 1987

Voss, S.D., Hong, R., Sondel, P.M. (1994) Severe combined immunodeficiency, IL-2 and the IL-2 receptor: Experiments of nature continue to point the way. Blood 83:626-635

Warner, JA., Miles, E.A. et al. (1994) Is deficiency of interferon- γ production by allergen triggered cord blood cells a predictor of atopic eczema? Clin Exp allergy 24:423-30

Weir, D., M. (1986) Handbook of experimental Immunology, 1-4, Oxford

Wüthrich, B. (1975) Zur Immunopathologie der Neurodermatitis constitutionalis. Eine klinische immunologische Studie unter besonderer Berücksichtigung der Immunglobuline E und der spezifischen Reagine im zeitlichen Verlauf. Hans Huber, Bern, Stuttgart, Wien

Yokota, T., Arai, N., De Vries, J.E., et al. (1988) Molecular biology of IL-4 and IL-5 genes and biology of their products that stimulate B cells, T cells and haemopoietic cells. Immunol. Rev. 102:137-187

Zhang, X., Hauser, C., Zubler, R.H. (1990) Soluble factor independent stimulation of human B cell response by mouse thymoma cells. J. Immunol. 144:2955

Zweiman, B. (1988) Mediators of allergic inflammation of the skin. Clin. Allergy. 18:419-433

Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Priv. Doz. Dr. med. G. Horneff danke ich für die Entwicklung und Überlassung der Fragestellung dieser Arbeit, sowie für die Betreuung der Dissertation.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Immunlabors des Zentrums für Kinderheilkunde der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für gute und freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken. Mein besonderer Dank gilt Frau Katrin Lalyko und Frau Nicola Femte für die Einweisung in die zellbiologischen Arbeitstechniken und Frau Angelika Ryschka für die Immunglobulinbestimmungen.

Meinen Eltern sei gedankt für die stetige Förderung meiner Ausbildung, sowie Herrn Dr. med. Gerald Pühse für seine Geduld und Motivation.

<u>Lebenslauf</u>

Name:	Shah Luna Azfar	
Geburtsdatum:	23.08.1969	
Geburtsort:	Dhaka/Bangladesch	
Staatsangehörigkeit:	britisch	
Religion:	Islam	
Familienstand:	ledig	
Schulausbildung:	1974-1976	Paddock's Primary School,
	Newmarket (GB)	
	1976-1978	Worcester Grammar School,
	Worcester (GB)	
	1978-1980	Middle School, Newmarket (GB)
	1980-1989	Städt. Gymnasium Borghorst
Schulabschluss:	Mai 1989	Allgemeine Hochschulreife
Studienlaufbahn:	WS 89/90 Studium der Chemie, Heinrich-Heine-	
	Universität Düsseldorf	
	März 1990 bis Oktober 1996 Studium der	
	Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität	
	Düsseldorf	
	Dezember 199	063. Staatsexamen
Berufslaufbahn:	08.1997-02.1	999 Ärztin im Praktikum in der Klinik
	für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin	
	der Westfälis	chen Wilhelms-Universität Münster
	Seit 02.1999 Assistenzärztin in der Klinik für	
	Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der	
	Westfälischen Wilhelms-Universität Münster	

Shah Luna Azfar: Zytokinsekretion und Verteilung IL-2, IL-4 und INF-γ produzierender T-Zellensubpopulationen bei Patienten mit atopischer Rhinitis

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage untersucht, ob bei Atopikern eine Alteration der Verteilung spezifischer T-Zellsubtypen ($CD4^+$, $CD8^+$) und eine bevorzugte Produktion von dem TH2-Zytokin (T-Helferzellen-Typ2-Zytokin) IL-4 (Interleukin-4) sowie eine verminderte Produktion von den TH1-Zytokinen (T-Helfer-Typ1-Zytokin) IL-2 (Interleukin-2) und INF- γ (Interferon- γ) im Blut nachzuweisen ist. Zusätzlich wurde untersucht, ob sich die Dysregulation des Zytokinverteilungsmuster von TH1- und TH2-Zytokinen bei Atopie-Patienten an unserer Patientengruppe (allergische Rhinitis) nachvollziehen lässt. Zudem wurden Aktivitätsmarker (CD25, CD29, CD45RA, HLADR) verschiedener T-Zellsubtypen bestimmt.

Dabei ergaben sich folgende Resultate:

1. Im Serum der Atopie-Patienten war signifikant weniger INF- γ als im Serum der gesunden Kontrollen. Nach Stimulation mit PHA (Phythämagglutinin) war in den Zellkulturüberständen der Atopie-Patienten signifikant weniger IL-2 und INF- γ nachzuweisen als bei den gesunden Kontrollen. Hingegen war in der Gruppe der Atopiker sowohl im Serum als auch in den Zellkulturüberständen der stimulierten Zellen signifikant mehr IL-4 nachzuweisen als bei den gesunden Kontrollen. 2. In der Gruppe der Atopie-Patienten waren signifikant mehr CD4⁺/CD29⁺Zellen im peripheren Blut nachzuweisen verglichen zu den gesunden Kontrollen. 3. Eine signifikante Alteration der Verteilung von CD4⁺ und CD8⁺Zellen und ihre Produktion von IL-2, IL-4 und INF- γ lässt sich bei unseren Atopie-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen waren sowohl vor Stimulation als auch nach Stimulation signifikant mehr INF- γ^+ Zellen nachzuweisen als bei den Atopie-Patienten.

Somit konnte bei den untersuchten Atopie-Patienten mit dem klinischen Bild der atopischen Rhinitis die bei der Atopie vorhandene Zytokindysregulation nachvollzogen werden. Das Überwiegen des TH2-Zytokins IL-4 gegenüber der TH1-Zytokine IL-2 und INF- γ konnte bei unseren Patienten bestätigt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass im Serum der Atopie-Patienten signifikant mehr "Memory Cells" (CD45RO), die das Adhäsionsmolekül CD29 an ihrer Oberfläche besitzen, vorhanden sind als bei den gesunden Kontrollen. Ein Unterschied in der Verteilung der T-Zellsubtypen und der Produktion der jeweiligen Zytokine durch diese T-Zellsubtypen konnte nicht gefunden werden. Der bei der Untersuchung der gesamten T-Zellpopulation gefundener Unterschied der INF- γ -Positivität konnte bei Untersuchung der Subpopulationen statistisch nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die Zytokinimbalanzen der Patienten mit allergischer Rhinitis auf eine intrinsische Funktionsstörung zurückzuführen sind und nicht nur auf eine veränderte Verteilung der T-Zellsubtypen beruhen.