

REGULATION UND KLINISCHE BEDEUTUNG VON INTERLEUKIN 9
BEIM MENSCHEN

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Gabriele Kalski
Dezember 2000

Rigorosum:
20. Dezember 2000

Prüfungskommission:
Frau Prof. Weiß
Herr Prof. Gutensohn
Frau PD Dr. Mittag
Herr Prof. Bohn
Herr Prof. Dörmer

FÜR MEINE ELTERN

1 INHALTSVERZEICHNIS

1	Inhaltsverzeichnis	5-8
2	Einleitung.....	9-26
2.1	Cytokine.....	10
2.2	T-Lymphozyten.....	11
2.2.1	T _{H1} - und T _{H2} -Zellen	11
2.3	T _{H1} -Cytokine.....	15
2.3.1	Interleukin 2.....	15
2.3.1.1	Interleukin 2-Rezeptor	15
2.3.2	Interferon γ	17
2.4	T _{H2} -Cytokine.....	18
2.4.1	Interleukin 4.....	18
2.4.2	Interleukin 5.....	19
2.4.3	Interleukin 9.....	19
2.4.3.1	Interleukin 9-Rezeptor	22
2.5	Die Rolle der Cytokine bei einer allergischen Reaktion.....	22
2.6	Fragestellung.....	25
3	Material.....	27-34
3.1	Antikörper.....	28
3.2	Bakterien.....	28
3.3	Chemikalien.....	28
3.4	Computerprogramme.....	28
3.5	Enzyme	29
3.6	Geräte und Verbrauchsmaterialien	29
3.7	Kits.....	30
3.8	Kulturmedium, Serum und weitere Zusätze	30
3.9	Nukleotide	30
3.9.1	Radioisotope	30
3.9.2	Sequenzierprimer.....	30
3.9.3	Oligonukleotide	31
3.10	Plasmide.....	32
3.11	Primäre Zellen	33
3.12	Rekombinante Proteine.....	33
3.13	Standards für Elektrophoresen.....	33
4	Methoden	35-60
4.1	Arbeiten mit Bakterien	36
4.1.1	Herstellen transformationskompetenter Bakterien	36
4.1.2	Transformation von Bakterien.....	36
4.1.3	Vermehrung von Bakterien auf Agarplatten.....	37
4.1.4	Vermehrung von Bakterien in Flüssigkultur	37
4.1.5	Aufbewahrung von Bakterien.....	37

4.2	Arbeiten mit Zellen	38
4.2.1	Isolierung mononukleärer Zellen aus humanem Vollblut.....	38
4.2.2	Isolierung CD4-positiver Zellen mit MACS CD4-Microbeads	38
4.2.2.1	Entfernung der Monocyten.....	39
4.2.2.2	Anreicherung der CD4 ⁺ T-Lymphozyten aus Monocyten-depletierten PBMC	39
4.2.3	Kultivierung der PBMC	40
4.2.3.1	Mitogenstimulation der PBMC.....	40
4.2.3.2	Spezifische Stimulation durch monoklonale Antikörper oder Interleukine.....	40
4.3	Arbeiten mit RNA und DNA	40
4.3.1	DNA-Gelelektrophorese	40
4.3.2	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen.....	41
4.3.3	DNA-Ligation mit T4-DNA-Ligase.....	41
4.3.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	41
4.3.5	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	42
4.3.6	Isolierung der Gesamt-RNA aus PBMC	42
4.3.7	cDNA-Synthese.....	43
4.3.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	43
4.3.9	Prinzip der Quantitativen RT-PCR	45
4.3.10	Konstruktion der internen Standards.....	46
4.3.11	Klonierung.....	47
4.3.12	Sequenzierung	48
4.3.13	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese.....	49
4.3.14	Isolierung von Plasmid DNA	49
4.3.14.1	Qiagen Plasmidpräparation	49
4.3.14.2	Dichtegradienten-Methode.....	50
4.3.15	Linearisierung des Vektors.....	51
4.3.16	<i>In vitro</i> Transkription	51
4.3.16.1	Berechnung der Anzahl der RNA-Moleküle.....	52
4.3.17	RNA-Gelelektrophorese.....	53
4.3.18	Durchführung der Quantitativen PCR	54
4.3.19	Auswertung der Menge an PCR Produkten	55
4.4	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	57
5	Ergebnisse.....	61-94
5.1	Interner Standard.....	62
5.1.1	Konstruktion interner Standards	62
5.1.2	Identifizierung der Standards	63
5.1.3	Qualitätskontrolle der RNA der Standards	63
5.1.4	Quantifizierung der PCR-Produkte	64
5.1.5	Kontrolle der Effizienz der reversen Transkription	65
5.2	Expression unter normalen und pathologischen Bedingungen	66
5.2.1	Kinetik der mRNA-Expression von IL-9	66
5.2.2	IL-9-Expression in CD4 ⁺ T-Zellen.....	68
5.2.3	Cytokinprofil bei Normalprobanden	69
5.2.4	Kinetik der IL-9-mRNA-Expression bei spezifischer T-Zell-Stimulation.....	70
5.2.5	IL-9-Expression bei Patienten mit akuten atopischen Ekzemen.....	71
5.2.6	Cytokinprofil bei Patienten mit akuten atopischen Ekzemen im Vergleich zu Normalprobanden	72
5.2.7	Patientenstudie	74

5.3	Regulation der IL-9-Expression.....	80
5.3.1	rh IL-9 inhibiert die IL-9-Genexpression.....	80
5.3.2	IL-9-Antikörper steigern die IL-9-Genexpression.....	83
5.3.3	Hochregulation der IL-9-Genexpression durch IL-9-Antikörper	85
5.3.4	Negative Feedback-Regulation der IL-9-mRNA-Expression.....	87
5.3.5	Einfluß von rh IL-2 auf die IL-9-Genexpression	88
5.3.6	IL-2-Antikörper und IL-2-Rezeptor α -Antikörper inhibieren die IL-9- Expression auf unterschiedliche Weise	89
5.4	Regulation der IL-9-Proteinexpression.....	92
6	Diskussion	95-110
6.1	Interner Standard	96
6.2	Kinetik der IL-9-mRNA-Expression	98
6.3	Cytokinexpression unter pathologischen Bedingungen.....	99
6.4	Cytokinexpression nach spezifischer Immuntherapie	101
6.5	Regulation der IL-9-Genexpression.....	103
7	Zusammenfassung.....	111-114
8	Anhang	115-131
8.1	Literaturverzeichnis	116
8.2	Abkürzungen	126
8.3	Patientendaten.....	128
8.4	Danksagungen.....	130
8.5	Lebenslauf.....	131

2 EINLEITUNG

2.1 CYTOKINE

Cytokine sind Proteine, die von einer Zelle gebildet und sezerniert werden, und die die Eigenschaften oder das Verhalten dieser Zelle selbst oder anderer Zellen verändern. Die Cytokine spielen eine wichtige Rolle bei Regulationsvorgängen aller Zellsysteme des Organismus, wobei deren Bedeutung für die Hämpoese und das Immunsystem zuerst erkannt wurde und wohl am besten untersucht ist. Um die Cytokine von Peptidhormonen zu unterscheiden, kann man folgende Parameter aufführen: Cytokine sind Proteine von mehr als fünf Kilodalton. Sie werden von mehreren verschiedenen Zellarten produziert und wirken in der Regel lokal. Ihre Wirkung vermitteln sie über einen speziellen Rezeptor, der auf vielen verschiedenen Zellen vorkommen kann. Zu den Cytokinen gehören Interleukine, Interferone, koloniestimulierende Faktoren, der Tumor-Nekrose-Faktor und Transforming-Growth-Faktor. Die Cytokine zeigen häufig überlappende biologische Aktivitäten.

Interferone (IFN) werden als Cytokine definiert, die Einfluß darauf nehmen, daß Zellen gegen Virusbefall resistent werden. Interferone werden nach Stimulation freigesetzt. Ihre Synthese wird durch Cytokine, Viren und einige chemische Substanzen ausgelöst. Neben der antiviralen Wirkung können Interferone die Vermehrung von Zellen hemmen und zur Rückbildung von Tumoren führen. Außerdem haben sie ausgeprägte immunregulatorische Eigenschaften. Interferon α und β werden hauptsächlich von Monocyten/Makrophagen beziehungsweise Fibroblasten produziert. Interferon γ ist dagegen ein Produkt inflammatorischer $CD4^+$ -T-Zellen, $CD8^+$ -T-Zellen und natürlicher Killerzellen.

Für Faktoren mit verschiedenen Wirkungen innerhalb des Immunsystems wurde 1979 der Begriff der Interleukine geprägt. Der Name bedeutet: „zwischen den Leukocyten etwas bewirken“. Ein Cytokin darf nur dann Interleukin (IL) genannt werden, wenn es folgende Bedingungen erfüllt (WHO-Interleukinnomenklatur, 1992):

- Es muß als Protein in gereinigter Form vorliegen. Es muß kloniert und sequenziert sein und als rekombinantes Protein exprimiert vorliegen.
- Das Molekül sollte ein natürliches Produkt von Zellen des Immunsystems sein.
- Es sollte seine Hauptfunktion im Immunsystem haben.

2.2 T-LYMPHOZYTEN

Die T-Lymphozyten nehmen eine zentrale Stellung in der spezifischen Immunreaktion ein. Einerseits haben sie Steuerfunktionen, andererseits cytotoxische Aufgaben. Die T-Lymphozyten steuern die Immunantwort durch Helfer- und Suppressorzellen (T_H beziehungsweise T_S -Zellen), die die Reaktion des Immunsystems induzieren, fördern beziehungsweise hemmen. Die T_H -Zellen sind ein Bindeglied zwischen solchen Zellen, die den ersten Kontakt mit einem Antigen haben und dieses dann präsentieren (antigenpräsentierende Zellen, APC), und den Effektorzellen wie cytotoxischen T-Zellen und B-Zellen. T-Lymphozyten sind durch bestimmte Oberflächenmarker charakterisiert: Sie tragen einen T-Zell-Rezeptor, der für die spezifische Erkennung des Antigens in Kombination mit den Haupt-Histokompatibilitätsmolekülen (MHC-Molekülen) verantwortlich ist. Mit dem T-Zell-Rezeptor verbunden ist das CD3 Molekül, das ins Innere der Zelle signalisiert, daß eine Antigenerkennung stattgefunden hat. Weiterhin befinden sich sogenannte Co-Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Je nach T-Zell-Subpopulation handelt es sich dabei um CD8-Moleküle als Co-Rezeptoren für MHC-Klasse I Moleküle bei cytotoxischen T-Zellen oder um CD4-Moleküle als Co-Rezeptoren für MHC Moleküle der Klasse II bei den T-Helferzellen.

T-Lymphozyten sind in der Lage, fast sämtliche Cytokine zu produzieren und durch diese Effekte auf die verschiedenen Zelltypen auszuüben.

2.2.1 T_{H1} - UND T_{H2} -ZELLEN

CD4-positive T-Helferzellen (T_H) können aufgrund ihrer Fähigkeit, verschiedene Cytokine zu produzieren, in mindestens drei Populationen eingeteilt werden. Naive T-Lymphozyten reagieren zuerst auf Peptid:MHC-Klasse-II-Komplexe, indem sie IL-2 bilden und proliferieren. Diese Zellen wandeln sich dann in einen Zelltyp um, den man als T_{H0} -Zellen bezeichnet. Sie können sowohl IL-2 und IFN- γ als auch IL-4 produzieren. Diese sog. Vorläuferzellen differenzieren zu inflammatorischen T_{H1} -Zellen beziehungsweise zu T_{H2} -Zellen (Mosmann et al., 1996) ohne cytolytisches Potential und verlieren dabei die Fähigkeit, sämtliche Cytokine zu synthetisieren (Abbildung 1) (Mosmann et al., 1989, Romagnani, 1994, Janeway et al., 1995).

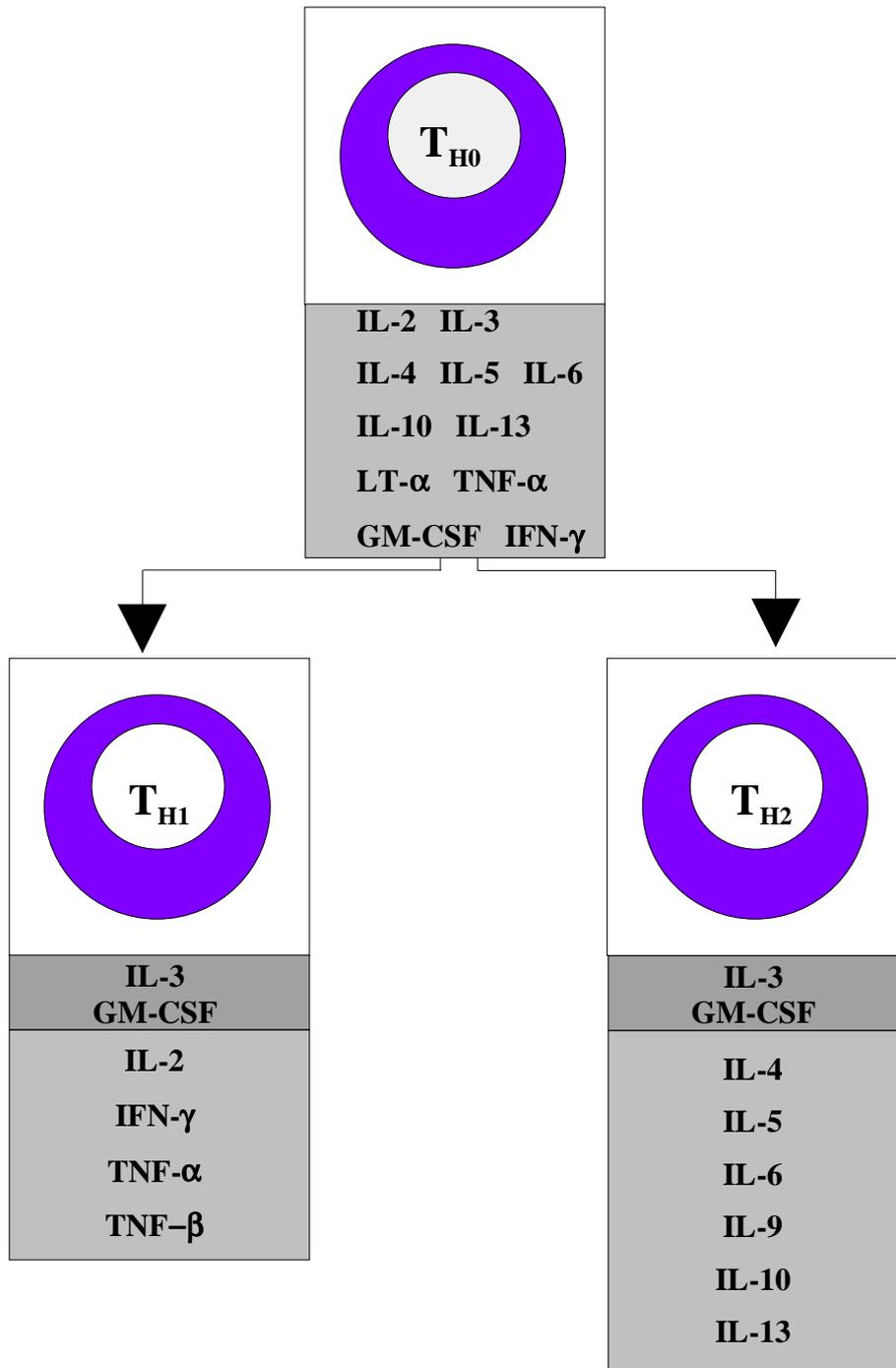


Abbildung 1: T_{H1}- und T_{H2}-Zellen und ihre T_{H0}-Vorläufer sezernieren eine verschiedene, sich jedoch überschneidende Auswahl von Cytokinen. (Abbildung verändert nach Ibelgauf's, 1995).

Die Funktionen der T_{H1}- und T_{H2}-Zellen gehen mit distinkten Cytokinprofilen einher. Eine Aktivierung von T_{H1}-Zellen führt zu zellvermittelten inflammatorischen Reaktionen (Mosmann et al., 1989). T_{H2}-Zellen dagegen lösen humorale Immunität aus. T_{H2}-Cytokine induzieren die Antikörperproduktion, im speziellen eine IgE Antwort, und verstärken die Proliferation von Eosinophilen und deren Funktion. T_{H2}-Cytokine werden im allgemeinen

in Assoziation mit einer starken Antikörperreaktion beziehungsweise bei einer allergischen Reaktion produziert (Mosmann et al., 1996). Schlüsselcytokine der T_{H1} - und T_{H2} -Zellen wie z. B. $IFN-\gamma$ und IL-4 wirken wechselseitig inhibitorisch auf die Differenzierung und auf die Effektorfunktionen des reziproken Phänotyps (Coffman et al., 1991, Swain et al., 1991, Maggi et al., 1992).

Über die Möglichkeit, T_{H1} und T_{H2} -Zellen aufgrund ihrer Oberflächenmoleküle unterscheiden zu können, gibt es unterschiedliche Ansichten. Del Prete et al. äußern die Ansicht, daß in allergenresponsiven T_{H2} -Zellen die CD30 Antigenexpression hochreguliert sei. Die Autoren äußern die Meinung, daß die Analyse der Expression dieses Oberflächenantigens zur Differenzierung von T_{H1} und T_{H2} -Zellen beitragen könnte (Del Prete et al., 1995). Dieser Hypothese widerspricht eine andere Studie, in der die Regulation der CD30-Expression in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) sowie in T-Zell-Klonen untersucht wurde. CD30 wird sowohl auf der Oberfläche von T_{H0} -, T_{H1} - und T_{H2} -Klonen als auch auf PBMC nach spezifischer T_{H0} -, T_{H1} - und T_{H2} -Stimulation exprimiert. Diese Resultate machen deutlich, daß CD30 auf aktivierten T-Lymphozyten, und zwar unabhängig von ihrem T_H -Typ, exprimiert wird und diese Moleküle daher nicht zur Unterscheidung von T_{H1} und T_{H2} -Zellen herangezogen werden können (Hamann et al., 1996).

Humane T_{H1} -Zellen entwickeln sich während bakterieller Infektionen (Barnes et al., 1993, Haanen et al., 1991), wogegen eine T_{H2} -Differenzierung während eines Parasitenbefalls (Urban et al., 1995, Else et al., 1994) und als Antwort auf ein Allergen induziert wird. Mehrere Studien haben gezeigt, daß bei HIV^+ Patienten im Krankheitsverlauf die T_{H1} -Cytokin-Produktion herabgesetzt und die T_{H2} -Cytokine hochreguliert werden (Clerici et al., 1993, Clerici et al., 1994, Maggi et al., 1994).

Obwohl die Art der antigenpräsentierenden Zellen (APC) keinen Einfluß auf die Entwicklung zum T_{H1} - oder T_{H2} -Phänotyp hat, beeinflussen die Costimulationsliganden B7.1 und B7.2 der APC die Richtung der T-Zell-Differenzierung. CD28 ist der Rezeptor sowohl für B7.1 als auch für B7.2 und wird auf ruhenden T-Lymphozyten exprimiert. Die Liganden werden zu unterschiedlichen Zeiten während der Immunantwort exprimiert. B7.2 wird 24 Stunden nach der Aktivierung als physiologischer Ligand für CD28 exprimiert und induziert die CD28-abhängige Costimulation der T-Lymphozyten. Im Gegensatz dazu wird B7.1 erst später exprimiert und deshalb als Costimulationsligand während der per-

sistierenden Infektion angesehen. So ist B7.2 als primärer Costimulationsligand in Verbindung mit einer hohen Antigenosis wichtig für die Initiierung einer T_{H2} -Antwort, wogegen B7.1 eine Rolle bei der Erhaltung eines T_{H1} -Profils spielt (Thompson et al., 1995).

Die Differenzierung zum T_{H1} - oder T_{H2} -Phänotyp wird weiterhin von Cytokinen beeinflusst, die von APC oder anderen Zelltypen zum Zeitpunkt der Antigenpräsentation sezerniert werden. Von Makrophagen und B-Zellen produziertes $IFN-\alpha$, IL-12 und $TGF-\beta$ fördern die Differenzierung von T-Lymphozyten zum T_{H1} -Profil. $IFN-\gamma$ unterstützt ebenfalls die Differenzierung zum T_{H1} -Phänotyp (Romagnani et al., 1992, Manetti et al., 1993).

Den wichtigsten Faktor für eine Entwicklung vom T_{H0} - zum T_{H2} -Typ repräsentiert das IL-4. IL-4 defiziente Mäuse sind nicht in der Lage, T_{H2} -Zellen zu generieren und IgE-Antikörper zu produzieren (Kopf et al., 1993). Ein weiteres wichtiges Cytokin, das die Entwicklung von T_{H2} -Zellen unterstützt, stellt das IL-10 dar (Hsieh et al., 1992).

Da bei einer primären Immunantwort die Frequenz der antigenspezifischen T-Lymphozyten sehr gering ist ($1/10^5$), müssen andere Zelltypen $IFN-\gamma$ und IL-4 für T-Zell-Differenzierung zur Verfügung stellen. $IFN-\gamma$ kann neben den T-Lymphozyten auch von NK-Zellen produziert werden. Bei Mäusen können Mastzellen, Basophile und $CD3^+CD4^+NK1.1$ -T-Zellen an der frühen IL-4-Produktion mitwirken. Diese kleine T-Zell-Subpopulation hat ein restringiertes TCR-Repertoire und ist in der Lage, zu Beginn einer Immunantwort große Mengen an IL-4 zu produzieren. Dadurch regulieren diese Zellen das Priming der naiven T-Lymphozyten, indem sie das IL-4 für die Entwicklung von IL-4-produzierenden T_{H2} -Zellen sezernieren (Yashimoto et al., 1994).

Die Tatsache allerdings, daß Allergene nur bei bestimmten Personen eine T_{H2} -Antwort auslösen, macht deutlich, daß bei diesem Personenkreis eine genetische Besonderheit in der IL-4-Produktion beziehungsweise in ihrer Regulation und damit in der Entwicklung oder Funktion der T_{H2} -Zellen vorliegt.

2.3 T_{H1}-CYTOKINE

2.3.1 INTERLEUKIN 2

Die Proliferation und Differenzierung naiver T-Lymphozyten wird durch IL-2 gesteuert, das die aktivierten T-Lymphozyten selbst bilden. Die Erstbeschreibung als T-Zell-Wachstumsfaktor erfolgte 1976 durch Morgan et al.. Der erste Kontakt mit einem spezifischen Antigen in Gegenwart des erforderlichen costimulierenden Signals bewirkt, daß die T-Zelle in die G1-Phase des Zellzyklus eintritt. Gleichzeitig wird die Synthese von IL-2 sowie von einem Rezeptor mit hoher Affinität für diesen Wachstumsfaktor induziert. Die Bindung von IL-2 an diesen Rezeptor läßt die Zellen dann den Rest des Zellzyklus durchlaufen und unterstützt so das T-Zell-Wachstum auf autokrine Weise (Smith et al., 1988). Weitere Effekte des IL-2 sind Wachstumsförderung von NK-Zellen (Suzuki et al., 1983), die Steigerung des B-Zell-Wachstums (Loughnan et al., 1989) und die Steigerung der Immunglobulinproduktion in B-Zellen (Waldmann et al., 1984). IL-2 induziert die cytotoxische Aktivität von NK-, LAK-Zellen (lymphokinaktivierte Killerzellen) (Henney et al., 1981, Trinchieri et al., 1984) und von Monocyten/Makrophagen (Herrmann et al., 1985, Malkovsky et al., 1987). In einigen Fällen zeigt IL-2 suppressive Effekte auf das T-Zell-Wachstum (Sugamura et al., 1994), verursacht eine T-Zell-Anergie (Boussiotis et al., 1994) und hat costimulatorische Effekte auf die T-Zell-Apoptose (Lenardo, 1991).

IL-2 hat bezogen auf die Aminosäuren ein Molekulargewicht von 15 Kilodalton, welches jedoch je nach Art der O-Glykosylierung tatsächlich höher liegt. Es wird zunächst in einer 153 Aminosäuren langen Form synthetisiert. Die ersten 20 Aminosäuren bilden eine hydrophobe Signalsequenz. Das IL-2-Gen befindet sich auf dem Chromosom 4 (Shows et al., 1984), besteht aus vier Exons und ist ca. fünf Kilobasen groß (Fujita, et al., 1983, Matsui et al., 1985).

2.3.1.1 INTERLEUKIN 2-REZEPTOR

IL-2 hat einen spezifischen Rezeptorkomplex, über den es seine Effekte an eine Zelle übermittelt. Dieser Komplex besteht aus den drei Ketten α , β und γ , die zusammen nur auf aktivierten T-Lymphozyten exprimiert werden. Auf ruhenden T-Lymphozyten werden nur

die β und γ -Kette exprimiert. Diese binden IL-2 mit geringerer Affinität. Daher können ruhende T-Lymphozyten nur auf hohe Konzentrationen von IL-2 reagieren. Die Aktivierung von T-Lymphozyten induziert die Synthese der α -Kette und die Bildung eines heterotrimeren Rezeptors mit einer hohen Affinität für IL-2, so daß die T-Lymphozyten auf sehr niedrige IL-2-Konzentrationen reagieren können (Abbildung 2) (Takeshita et al., 1992).

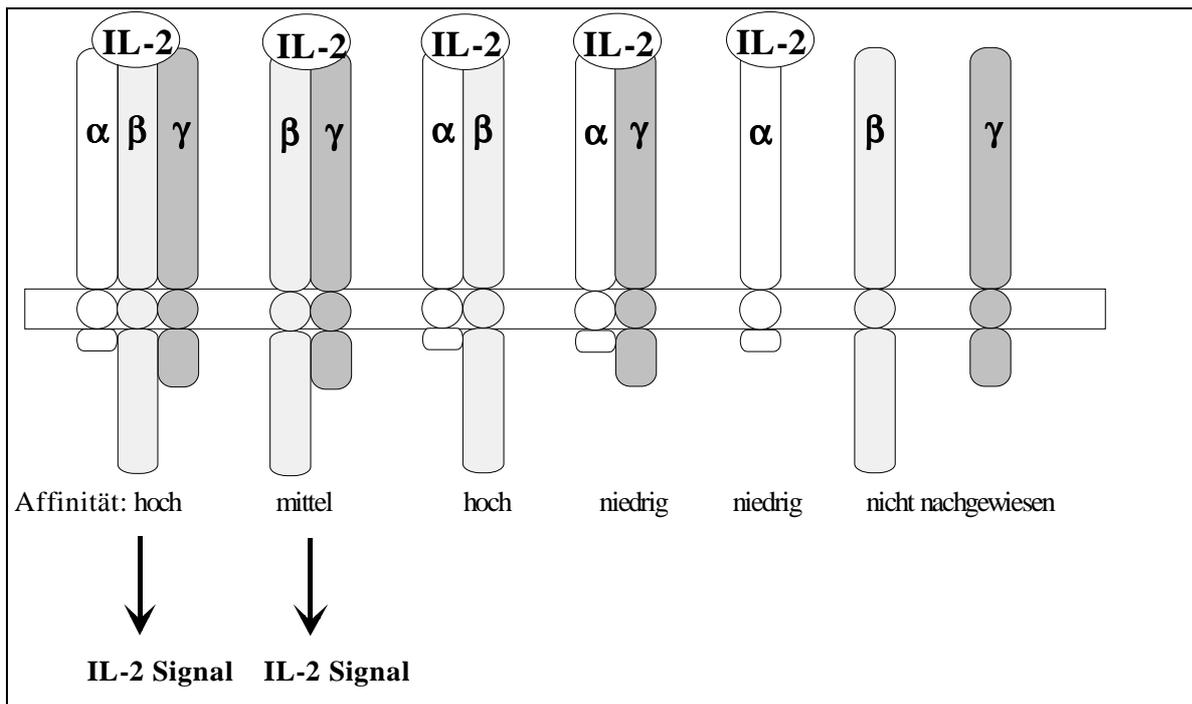


Abbildung 2: Affinitäten und Funktionen der verschiedenen IL-2-Rezeptoruntereinheiten.

Die cytoplasmatische Region der α -Kette besteht aus nur 13 Aminosäuren. Die niedrig-affine IL-2R- α -Kette ist daher alleine nicht in der Lage, ein IL-2-Signal zu vermitteln, sie ist allerdings entscheidend für die Formierung eines hochaffinen Rezeptorkomplexes (Hatakeyama et al., 1985, Greene et al., 1985). Die IL-2R β -Untereinheit gehört zur Cytokin-Rezeptor-Superfamilie. Rezeptoren dieser Familie weisen als gemeinsame Charakteristika zwei konservierte Cystein-Reste nahe dem aminoterminalen Ende sowie ein Tryptophan-Serin-X-Tryptophan-Serin-Motiv (WSXWS Motiv) in der extrazellulären Domäne auf (Bazan, 1990). Die α - und β -Kette bilden einen hochaffinen Rezeptor, allerdings ohne intrazelluläre Signaltransduktion (Hatakeyama et al., 1989). Die γ -Kette stellt die dritte Untereinheit des IL-2-Rezeptors dar und gehört ebenfalls zur Cytokin-Rezeptor-Superfamilie (Takeshita et al., 1992). Ein α - β - γ -Komplex bildet einen hochaffinen, und eine

β - γ -Anordnung einen mittelaaffinen IL-2-Rezeptor. Beide Komplexe haben die Fähigkeit, ein intrazelluläres Signal zu induzieren. Die IL-2R β -Untereinheit ist essentiell für diese rezeptorvermittelte Signaltransduktion, indem nach einer IL-2-Stimulation die Tyrosinkinase der src-Familie, das p56^{lck} aktiviert wird (Hatakeyama et al., 1991, Horak et al., 1991). Allerdings ist die Heterodimerisierung der β - und γ -Ketten des Rezeptors für die Signaltransduktion erforderlich (Nakamura et al., 1994). An der durch die cytoplasmatischen Domänen dieser Untereinheiten induzierten Signaltransduktion sind nach derzeitigem Literaturstand vier Protein-Tyrosinkinasen (PTK) beteiligt: p56^{lck}, Syk PTK und die Janus-Kinasen, Jak1 und Jak3 (Taniguchi et al., 1995).

Wie in Abbildung 3 dargestellt, bildet die IL-2R γ -Kette eine gemeinsame Untereinheit der Rezeptoren für IL-2, IL-4 (Kondo et al., 1993, Russel et al., 1993), IL-7 (Kondo et al., 1994, Noguchi et al., 1993), IL-9 (Kimura et al., 1995), IL-13 und IL-15 (Giri et al., 1994, Giri et al., 1995):

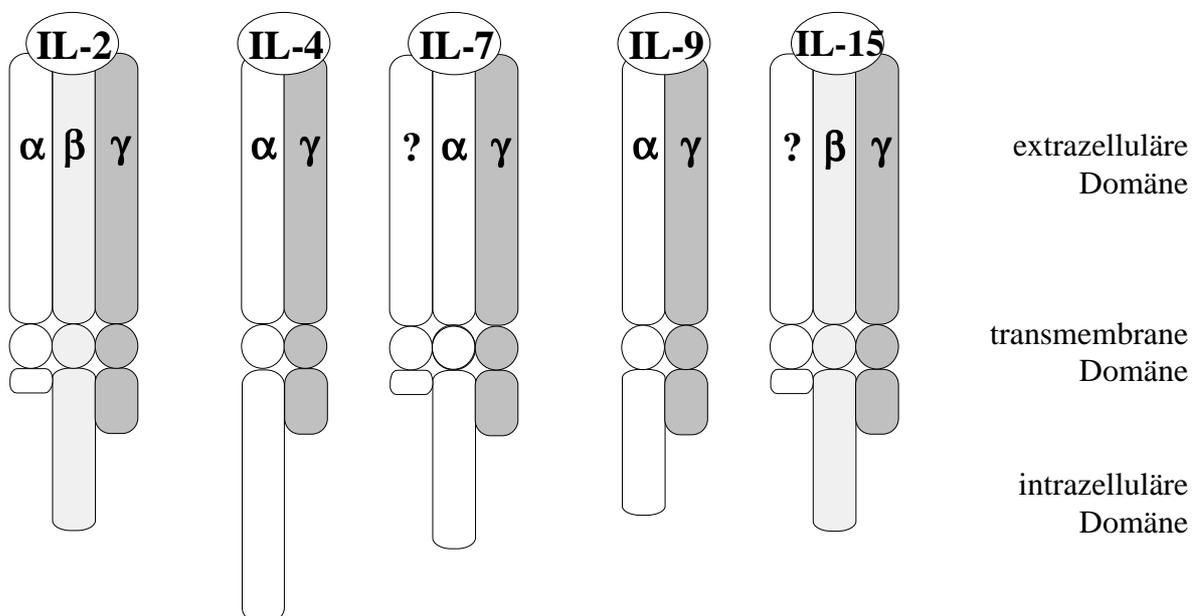


Abbildung 3: Die gemeinsame γ -Kette der Rezeptoren für IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 und IL-15. Die α -Ketten der IL-2, IL-4, IL-7 und IL-9-Rezeptoren sind unterschiedlich. Die β -Kette des IL-2-Rezeptors ist identisch mit der β -Kette des IL-15 Rezeptors (Sugamura et al., 1995).

2.3.2 INTERFERON γ

Ein wichtiges Cytokin, das von CD8-T-Effektorzellen sowie von CD4-T-Zellen (T_{H1} -Zellen) freigesetzt wird, ist IFN- γ . IFN- γ hat die Aufgabe, Makrophagen zu aktivieren. Es

wird als Immuninterferon (Typ-II-Interferon) bezeichnet und ist ein Glykoprotein, das aus 146 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 22 Kilodalton besitzt. Zwei dieser Polypeptidketten assoziieren *in vivo* zu einem Dimer. Das Gen ist auf Chromosom 12 lokalisiert und besitzt drei Introns. Eine T-Zell-unabhängige IFN- γ Produktion konnte in NK-Zellen gezeigt werden (D'Andrea et al., 1992). Die IFN- γ Synthese wird durch IL-2 eingeleitet. IFN- γ übt synergistische Effekte auf die IL-2-induzierte Immunglobulinsekretion aus, es erhöht die IgG_{2a}-Produktion in LPS-stimulierten B-Zellen der Maus. Eine sehr wichtige antagonistische Interaktion besteht zwischen IL-4 und IFN- γ in der Art, daß IL-4 induzierte Effekte, wie z. B. IgG- und IgE-Sekretion, durch Interferon γ gehemmt werden (Del Prete et al., 1988, Pene et al., 1988). Die T_{H1}-Differenzierung wird *in vitro* (Gajewski et al., 1989) sowie *in vivo* (Locksley et al., 1991) durch IFN- γ unterstützt.

2.4 T_{H2}-CYTOKINE

2.4.1 INTERLEUKIN 4

IL-4 wurde 1982 als eine Substanz beschrieben, die das B-Zell-Wachstum (Howard et al., 1982) und die B-Zell-Differenzierung (Isakson, et al., 1982) unterstützt. IL-4 wird vornehmlich von aktivierten T_{H2}-Zellen produziert und fördert die Differenzierung von T_{H0} zu T_{H2}-Zellen (Swain, 1991). Eigenschaften des IL-4 sind z. B. die Steigerung der MHC-Klasse-II-Expression (Müller et al., 1991) und der Antigenpräsentation, die Stimulation der IgG1- und IgE-Produktion durch B-Zellen (Trepper et al., 1990), die Steigerung des T-Zell-Wachstums sowie die Wirkung als autokriner Wachstumsfaktor für antigenspezifische T-Lymphozyten in Verbindung mit IL-1. Weiterhin reguliert IL-4 die Proliferation und Differenzierung von Mastzellen sowie die Proliferation von Stammzellen (Paul, 1991). Besonders hervorzuheben ist der antagonistische Effekt zu IFN- γ (Del Prete et al., 1988, Pene et al., 1988).

IL-4 ist ein stark glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 25 Kilodalton in seiner nativen Form. IL-4 wird primär als 153 Aminosäuren langes Protein synthetisiert. Die ersten 22-24 Aminosäuren bilden ein Signalpeptid, der Rest das aktive IL-4-Molekül

(Yokota et al., 1986). Das humane IL-4-Gen hat eine Größe von 9 Kilobasen, enthält vier Exons (Arai et al., 1989) und liegt auf dem Chromosom 5 (van Leeuwen et al., 1989).

2.4.2 INTERLEUKIN 5

IL-5 wird ausschließlich von ausdifferenzierten Zellen exprimiert wie Eosinophilen, Mastzellen und in der Hauptsache von aktivierten T_{H2} -Zellen (Cousins et al., 1994). Die humane IL-5-cDNA codiert für ein 115 Aminosäuren langes Protein. In seiner biologisch aktiven Form ist IL-5 ein N-glycosyliertes antiparalleles Homodimer, das durch Disulfidbrücken zusammengehalten wird. Das humane IL-5-Gen hat eine Länge von ca. 4 Kilobasen, enthält vier Exons und ist auf Chromosom 5 lokalisiert (van Leeuwen et al., 1989).

IL-5 wirkt maßgebend auf die Differenzierung und Aktivierung von eosinophilen Granulocyten sowie auf die Proliferation der eosinophilen Granulocytenvorläufer (Ohnishi et al., 1993, Teran et al., 1993). In den B-Zellen induziert IL-5 die IgA-Produktion. Die Bindung des IgA an den $Fc\alpha R$ der Eosinophilen bewirkt deren Degranulierung (Kita et al., 1992, Abu-Ghazaleh et al., 1989). Die IL-5-Produktion ist abhängig von IL-2, einem T_{H1} -Cytokin. Das IL-2, das während einer allergischen Reaktion sezerniert wird, kann *in vivo* an der IL-5-Synthese der T-Lymphozyten beteiligt sein (Mori et al., 1995).

2.4.3 INTERLEUKIN 9

Interleukin 9 ist ein multifunktionales Cytokin, das *in vitro* von aktivierten T_{H2} -Klonen und *in vivo* bei einer dem T_{H2} -Phänotyp entsprechenden T-Zell-Antwort produziert wird. Die humane IL-9-cDNA konnte unabhängig durch Expressionsklonierung (Yang et al., 1989) und durch Kreuz-Hybridisierung mit dem murinen Gen (Renauld et al., 1990) identifiziert werden.

IL-9 ist ein Protein mit einem Gewicht von 14 Kilodalton. Die cDNA hat einen offenen Leserahmen von 432 Nukleotiden (Kelleher et al., 1991) und codiert für ein Vorläuferprotein von 144 Aminosäuren mit einer 18 Aminosäuren langen hydrophoben Signalsequenz am aminoterminalen Ende. Das Protein ist stark glykosyliert und enthält zehn an der Ausbildung von Disulfidbrücken beteiligte Cysteinreste (Simpson et al., 1989, Renauld et al., 1990).

Das humane IL-9-Gen ist auf Chromosom 5 lokalisiert (Modi et al., 1991), enthält fünf Exons und erstreckt sich über eine Länge von ca. 4 Kilobasen (Renauld et al., 1990). Der Transkriptionsstart liegt 22 bis 24 Nukleotide hinter der TATA-Box. Im 5'-Promotorbereich des Gens befinden sich potentielle regulatorische Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie AP-1, -2, -3 und AP-5, SP1, NF- κ B und CRE binding Protein (cAMP response element) (Kelleher et al. 1992). Das humane Gen enthält zwischen Translations-Terminations-Codon und dem Poly(A)-Signal 4 Kopien einer AT-reichen Sequenz, die auch bei anderen transient exprimierten Cytokinen gefunden werden und dort die Stabilität der mRNA reduzieren (Renauld et al., 1995).

Ohne Stimulation oder eine Aktivierung durch B-Zellen oder Monocyten konnte bisher in normalen PBMC keine IL-9-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Es handelt sich demnach bei IL-9 um ein nicht konstitutiv exprimiertes Cytokin. T-Zell-Mitogene wie PHA oder eine spezifische T-Zell-Aktivierung induzieren allerdings eine IL-9-Expression in PBMC (Houssiau et al., 1992). Eine konstitutive IL-9-Expression ist bei Patienten mit Morbus Hodgkin und großzellig-anaplastischen Lymphomen (Merz et al., 1991) sowie in HTLV-1 transformierten T-Lymphozyten nachgewiesen worden (Kelleher et al., 1991). Überdies wurde ein autokriner Regulationsmechanismus für das *in vitro* Wachstum einiger Hodgkin-Lymphom-Zell-Linien beschrieben (Gruss et al., 1992).

Fraktionierungen mononukleärer Zellen haben gezeigt, daß IL-9 von stimulierten CD4⁺ T-Lymphozyten exprimiert wird (Renauld et al., 1990). IL-2 muß als relevantes Sekundärsignal für die IL-9-Induktion in aktivierten PBMC betrachtet werden (Houssiau et al., 1992). Zusätzlich wird die IL-2-induzierte IL-9-Expression durch IL-4 und IL-10 verstärkt (Houssiau et al., 1995).

Bei der Analyse der IL-9-Aktivität auf T-Lymphozyten konnte gezeigt werden, daß alle humanen T-Zell-Linien nach wöchentlicher Stimulation mit PHA, IL-2 und allogenen PBMC als Feeder-Zellen eine starke Expression des IL-9-Rezeptors zeigen. Diese Linien werden bereits nach wenigen wöchentlichen Passagen IL-9 responsiv. IL-9 stimuliert zudem die Proliferation einer Reihe humaner T-Zell-Klone. Das Erstaunliche daran ist, daß diese restimulierten Klone ungeachtet ihres CD4- oder CD8-Phänotyps eine proliferative Antwort auf IL-9 zeigen (Houssiau et al., 1993).

Die Aktivität von IL-9 auf T-Zell-Linien steht im krassen Gegensatz zur Unfähigkeit des IL-9, die Proliferation frisch isolierter T-Lymphozyten zu induzieren. Im humanen System ist IL-9 im Gegensatz zu anderen T-Zell-Wachstumsfaktoren wie IL-2, IL-4 und IL-7 weder allein noch in Synergismus mit anderen Cytokinen oder T-Zell-Costimulatoren in der Lage, die Proliferation frisch isolierter T-Lymphozyten zu induzieren, obwohl diese Zellen bereits zu diesem Zeitpunkt eine IL-9R mRNA exprimieren (Houssiau et al., 1993). Lediglich bei murinen fetalen Thymocyten konnte eine Induktion der Proliferation durch IL-9 in Synergismus mit IL-2 nachgewiesen werden (Suda et al., 1990, Uyttenhove et al., 1988, Schmidt et al., 1989).

IL-9 hat neben der Proliferationsinduzierung von Mastzellen zusätzlich einen Effekt auf die Mastzellendifferenzierung. In Gegenwart von IL-3 verstärkt IL-9 die Proliferation von Mastzellen aus dem Knochenmark. IL-9 induziert in Mastzellen und einigen Zell-Linien die Produktion von IL-6, dieser Effekt wird durch IL-4 unterstützt (Möller et al., 1989, Hültner et al., 1989, 1990). Zusätzlich zur Proliferationsaktivität spielt IL-9 eine Rolle bei der Regulation von Mastzell-Effektor-Molekülen. Die Stimulation der Mastzellen durch IL-9 induziert die Genexpression der Mastzellproteasen mMCP-1, mMCP-2 und mMCP-4 (Eklund et al., 1993), und weiterhin die Expression von Granzymen und der α -Kette des hochaffinen IgE-Rezeptors in murinen T-Helferzellklonen (Louahed et al., 1995).

Die Tatsache, daß IL-9 an der Mastzellaktivierung beziehungsweise an deren Proliferation beteiligt ist, ferner während einer Parasiteninfektion IL-9 produziert wird, legt die Beteiligung des IL-9 an einer IgE vermittelten Immunantwort nahe. Untersuchungen der Fähigkeit zur Modulation der IgE-Produktion durch IL-9 haben ergeben, daß IL-9 die durch IL-4 induzierte IgE und IgG Produktion peripherer B-Lymphocyten potenziert, die Produktion von IgM dagegen nicht beeinflusst (Dugas et al., 1993).

IL-9 hat auch Effekte auf die Hämopoese. Der erste Hinweis auf die Beteiligung von IL-9 im hämatopoetischen System ist die Tatsache, daß IL-9 die Proliferation der megakaryoblastischen Leukämie-Zell-Linie Mo7E stimuliert (Yang et al., 1989). IL-9 unterstützt die proliferative Antwort von erythroiden CD34⁺ Progenitoren des Knochenmarks, des peripheren Blutes und des Nabelschnurblutes auf Erythropoetin (Donahue et al., 1990). Hingegen wird die frühe Makrophagen und Granulocyten Entwicklung durch IL-9 nicht beeinflusst .

2.4.3.1 INTERLEUKIN 9-REZEPTOR

Der IL-9-Rezeptor wird bei der Maus auf T-Lymphozyten, Mastzellen und Makrophagen exprimiert (Druez et al., 1990). Die extrazelluläre Domäne der IL-9- α -Rezeptorkette enthält ein WSXWS-Motiv und ist damit ein Mitglied der Cytokin-Rezeptor-Superfamilie und tritt in einer löslichen sowie einer membrangebundenen Form auf.

Die meisten Cytokinrezeptoren bestehen aus mindestens zwei Ketten: die eine Kette ist spezifisch für die Ligandenbindung und die andere Kette teilen sich verschiedene Cytokinrezeptoren. Die cytoplasmatische Domäne der spezifischen α -Kette des IL-9-Rezeptors weist eine hohe Homologie zur IL-2R β -Kette auf. Diese α -Kette und als zweite Untereinheit die gemeinsame γ -Kette des IL-2-Rezeptors bilden den funktionellen IL-9-Rezeptor (Renauld et al., 1995).

Über Mechanismen der Signaltransduktion durch den Rezeptor ist wenig bekannt, IL-9 induziert keine Phosphorylierung der Serin/Threonin-Proteinkinasen Raf-1 und MAP. Allerdings induziert IL-9 Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung von Mitgliedern der Tyrosinkinasefamilie, wie JAK1, JAK3 und TyK2 (Yin et al., 1995).

2.5 DIE ROLLE DER CYTOKINE BEI EINER ALLERGISCHEN REAKTION

Allergien oder Überempfindlichkeitserkrankungen beruhen auf Immunantworten gegenüber als Antigene erkannten Substanzen. Antigene beziehungsweise Allergene sind meist 10-50 kD große Proteine pflanzlichen oder tierischen Ursprungs (Neerven et al., 1996, Pichler, 1996). Allergene sind relativ inert, vermehren sich nicht im Körper und sind nicht zytotoxisch. Jeder allergischen Reaktion geht eine Sensibilisierungsphase voraus, während der es zu einer Expansion der spezifisch reagierenden B- und T-Lymphozyten kommt. Symptome der allergischen Reaktion treten erst bei einem Zweitkontakt oder nach längerer Exposition des Allergens auf. Eine atopische Allergie ist ein genetisch prädisponiertes Krankheitsbild, das durch eine gesteigerte IgE-Antikörperproduktion als Reaktion auf einen Allergenkontakt charakterisiert ist. IgE-Antikörper binden die hochaffinen Fc ϵ -Rezeptoren (Fc ϵ RI) auf Mastzellen und basophilen Granulocyten. Durch die allergenvermittelte Quervernetzung des Rezeptors kommt es zu einer Degranulation der Mastzellen und damit zur Freisetzung vasoaktiver Mediatoren, chemotaktischer Faktoren und Cytokinen.

Der Anstieg der IgE-Produktion resultiert aus dem Zusammenspiel zwischen T_{H2}-Zellen und B-Zellen (Vercelli et al., 1991).

T_{H2}-Zellen übermitteln den B-Zellen mindestens zwei Signale: Ein Signal wird ausgelöst durch Zell-zu-Zell-Interaktion zwischen dem CD40 Liganden auf aktivierten T-Lymphozyten und dem CD40 Rezeptor, der konstitutiv auf B-Zellen exprimiert wird. Das zweite Signal wird durch IL-4 ausgelöst (Spriggs, et al., 1992). Das von den T-Lymphozyten sezernierte IL-4 und IL-13 (Punnonen et al., 1993) induziert die somatische Rekombination der Keimbahn-DNA der ϵ -Kette des IgE in den B-Zellen, wogegen die CD40L/CD40 Interaktion für die Produktion der IgE-mRNA und die IgE-Proteinsynthese erforderlich ist (Gauchat et al., 1992). Die IL-4-abhängige IgE-Produktion der B-Zellen wird durch das T_{H1}-Cytokin IFN- γ gehemmt (Del Prete et al., 1988, Pene, et al., 1988). Wie in Abbildung 4 dargestellt, haben außerdem eine Reihe weiterer Faktoren negative oder positive regulatorische Effekte auf die IgE-Synthese.

Zusätzlich zu den IgE-produzierenden B-Zellen und den IgE-bindenden Mastzellen beziehungsweise basophilen Granulocyten, sind die eosinophilen Granulocyten ebenfalls an der Pathogenese atopischer Erkrankungen beteiligt. Die Zellen akkumulieren bei einer allergischen Reaktion in den Zielorganen der Patienten, und die Bindung von IgE an den Fc ϵ -Rezeptor (Butterworth et al., 1977, Capron et al., 1984) beziehungsweise die Bindung von IgA an den Fc α R der Eosinophilen (Kita et al., 1992, Abu-Ghazaleh et al., 1989) bewirkt die Degranulation ihrer Mediatoren.

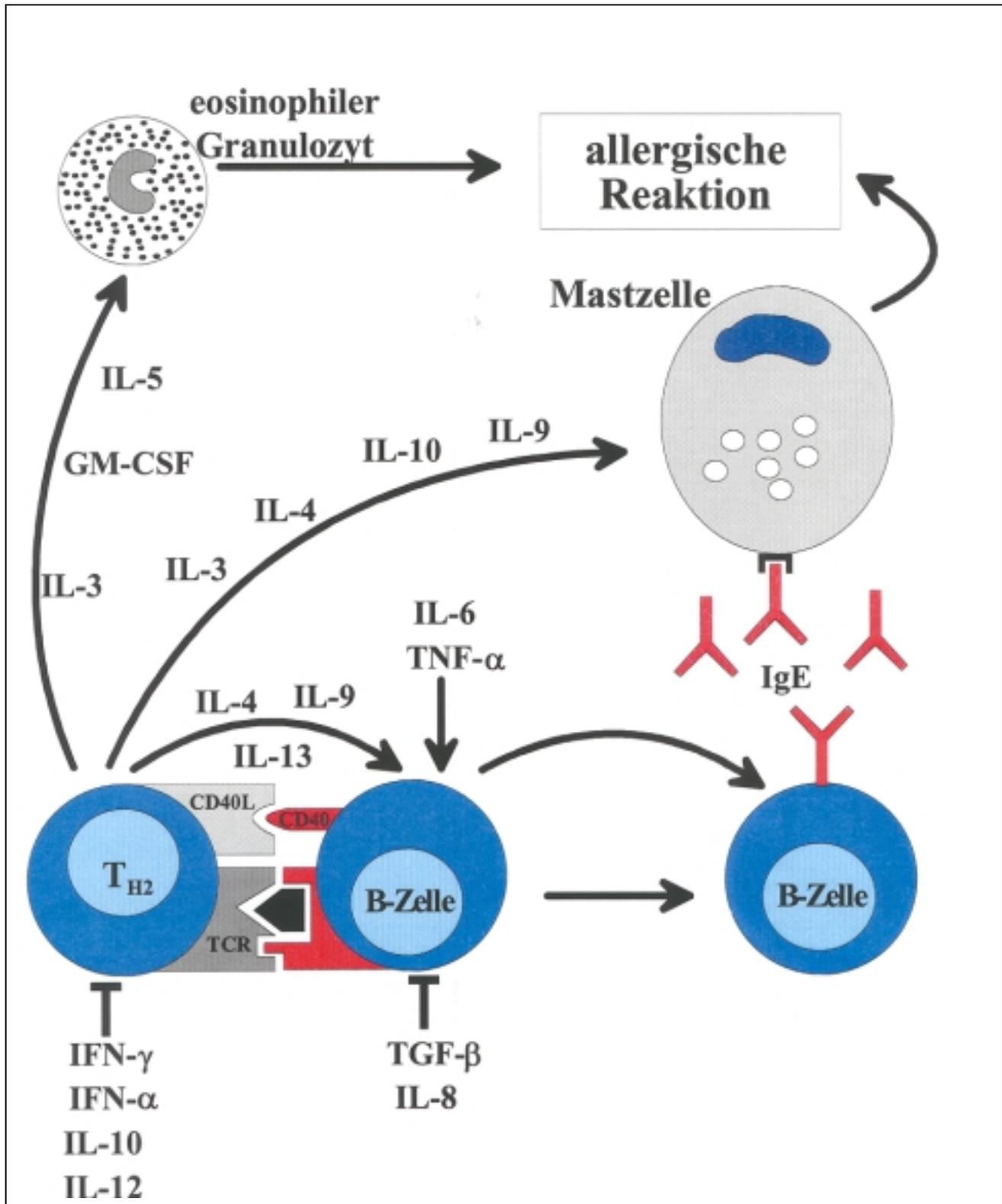


Abbildung 4: Die Rolle der Cytokine bei der Auslösung einer allergischen Reaktion als Antwort auf ein Allergen: IL-3, GM-CSF und IL-5 aktivieren und induzieren die Differenzierung der Eosinophilen. IL-3, IL-4, IL-10 und IL-9 wirken als Wachstums- und Differenzierungsfaktoren auf Mastzellen. Die Interaktion zwischen CD40L/CD40 und IL-4, IL-9 bzw. IL-13 induziert die IgE-Synthese der B-Zellen. IL-6 und TNF- α verstärken die IgE-Produktion. IFN- γ , IFN- α , IL-10, IL-12, TGF- β und IL-8 können inhibitorische Effekte auf die IgE-Synthese ausüben.

Der Nachweis, daß Allergene vornehmlich die Aktivierung von T_{H2}-Zellen induzieren, wird anhand von allergenspezifischen CD4⁺ T-Zell-Klonen erbracht, die von PBMC atopischer Patienten expandiert werden. Beinahe sämtliche T-Zell-Klone sezernieren als Reaktion auf eine Allergenstimulation ein T_{H2}- oder T_{H0}-Cytokinprofil mit einer gesteigerten IL-4- und IL-5-Produktion (Wierenga et al., 1991).

T_{H2}-Cytokine, wie z. B. IL-4 (induziert die IgE-Synthese) und IL-5 (fördert die Differenzierung von Eosinophilen) sind an der Pathogenese atopischer Erkrankungen, wie z.B. allergisches Asthma, allergische Rhinitis und atopische Dermatitis, regulativ beteiligt.

2.6 FRAGESTELLUNG

Über die funktionelle Bedeutung von IL-9 und seiner Stellung im Cytokin-Netzwerk ist im Vergleich zu anderen Cytokinen noch wenig bekannt. Der Weg zu einem besseren Verständnis der Physiologie von IL-9 soll in dieser Arbeit über Untersuchungen seiner Regulation führen.

Hierbei war zunächst zu prüfen, ob IL-9 ähnlich wie IL-2 eine autokrine Stimulation aufweist. Die Annahme einer solchen Stimulation ist wegen ihres Vorhandenseins bei Hodgkin-Zellen (Merz et al., 1991, Gruss et al., 1992) plausibel. Prinzipiell konnte auch das Gegenteil, ein negativer autokriner Feedback, in Erwägung gezogen werden, doch ist eine derartige Form der Regulation bei Cytokinen bisher nicht beschrieben worden.

Die Regulation von IL-9 sollte weiterhin durch den Vergleich mit der Expression anderer Cytokine gleicher zellulärer Herkunft nach mitogener Stimulation untersucht werden. Zwar wurde für T-Lymphozyten beschrieben, daß die Sekretion von IL-2 eine obligate (Houssiaus et al., 1992), und die von IL-4 und IL-10 eine fakultative Voraussetzung für die IL-9-Expression darstellt (Houssiaus et al., 1995), doch gilt dieses keineswegs auch für die IL-9-Expression durch Mastzellen (persönliche Mitteilung von Herrn Dr. Hültner, Exp. Hämatologie). Es erschien insgesamt zweckmäßig, die IL-9-Expression in PBMC nach Stimulation vergleichend mit einem größeren Spektrum von Cytokinen zu untersuchen.

Viele Funktionen von Zellen lassen sich besonders gut erkennen, wenn man sie unter pathologischen Bedingungen prüft. Mit diesem Ansatz sollte auch die Bedeutung von IL-9 untersucht werden. Als Modell wurde die Hausstaubmilbenallergie mit asthmatischer

Komponente vor und nach desensibilisierender Therapie gewählt. Patientenmaterial für diese Erkrankung wurde im Rahmen einer Kooperation mit der Pneumologischen Klinik und dem Institut für Zellbiologie und Histologie der Universität Amsterdam zur Verfügung gestellt.

Da für Cytokine im allgemeinen eine Parallelität der Protein- und RNA-Expression gegeben ist (Houssiau et al., 1995) sollten die vorliegenden Untersuchungen wegen der höheren Empfindlichkeit vornehmlich auf RNA-Ebene durchgeführt werden, danach ist allerdings eine Validierung durch Proteindaten erforderlich. Hierzu sollte die quantitative PCR eingesetzt werden (Wang et al., 1989). Da kein PCR-Standard für die IL-9-Quantifizierung erhältlich war, bestand die erste Aufgabe dieser Arbeit in der Konstruktion von PCR-Standards für alle in der Arbeit zu untersuchenden Cytokine. Auch ein IL-9-Proteinnachweis war nicht verfügbar, so daß zunächst mit einem polyklonalen IL-9-Antikörper ein entsprechender ELISA etabliert werden mußte.

3 MATERIAL

3.1 ANTIKÖRPER

Gegen Antigene des Menschen:

polyklonaler IL-9-spezifischer Antikörper (Ziege)	IC Chemikalien GmbH, Ismaning
polyklonaler IL-2- spezifischer Antikörper (Kaninchen)	Genzyme Diagnostics, Rüsselsheim
monoklonaler IL-2 α R-spezifischer Antikörper (Kaninchen)	Immunotech, Hamburg
Goat IgG	Sigma, München

MACS-Antikörper-Microbeads:

CD4 Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD33 Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

3.2 BAKTERIEN

E. coli DH5 α : Genotyp: F-, λ -, recA1, endA1, hsdR17, Δ (lacZYA-argF), U169, Φ 80dlacZ Δ M15, supE44, thi-1, gyrA96, relA1

3.3 CHEMIKALIEN

Die verwendeten Chemikalien wurden vornehmlich von den Firmen Sigma Chemical Company (München), Boehringer Mannheim, Biochrom KG (Berlin), ICN Biochemicals (Meckenheim), Pharmacia Biotech (Freiburg), Merck (Darmstadt) und Biozym (Hess. Olfendorf), Difco (USA) bezogen.

3.4 COMPUTERPROGRAMME

Die computergestützte Analyse der PCR-Produkte wurde unter Verwendung der Win-Cam 2.1 Software (Fa. Cybertech, Berlin) durchgeführt. Diese Arbeit wurde mit Microsoft WORD für Windows 95 7.0 angefertigt. Die Erstellung der Graphiken und Abbildungen

erfolgte mit EXCEL für Windows 95 7.0 und Micrografx DESIGNER 4.0 (Microsoft, USA).

3.5 ENZYME

EcoR I, BamH I, Hind III, Sac I	Boehringer Mannheim
SP6-RNA-Polymerase	Boehringer Mannheim
RQ1-DNase	Promega Corporation, USA
Proteinase K	Boehringer Mannheim
DNA Polymerase	Pharmacia Biotech, Freiburg
M-MLV RT	Gibco BRL Life Technologies, USA
T4 DNA Ligase	Promega Corporation, USA
rRNasin	Promega Corporation, USA
Sequenase	USB, USA

3.6 GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN

Spektralphotometer	Beckmann Instruments, München
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge	Sigma, München
Thermocycler	Biozym, Hess. Oldendorf
MiniMACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Zentrifugenröhrchen	Greiner, Nürtingen
PCR-Reaktionsgefäße	Biozym, Hess. Oldendorf
MaxiSorb Platten	Nunc, Wiesbaden

3.7 KITS

Geneclean II Kit	Bio 101, USA
RNeasy RNA Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Kit	Qiagen, Hilden

3.8 KULTURMEDIUM, SERUM UND WEITERE ZUSÄTZE

RPMI 1640	Gibco BRL, USA
Fötales Kälberserum	Boehringer, Mannheim
PHA-M	Boehringer, Mannheim
Ampicillin	Gibco BRL, USA
Streptomycin	Gibco BRL, USA

3.9 NUKLEOTIDE

Die dNTP für die PCR und die Reverse Transkription und die Ribonukleosid-Triphosphate (rNTP) für die *in vitro* Transkription wurden von Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen. Desoxy-Nukleosid-Triphosphate und Didesoxy-Nukleosid-Triphosphate (ddNTP) wurden dem Kit für DNA Sequenzierung mit Sequenase entnommen (USB, USA).

3.9.1 RADIOISOTOPE

Desoxyadenosin 5'-[α -³⁵S]-Triphosphat (1000 Ci/mmol) wurde von der Firma Amersham Buchler (Braunschweig) bezogen.

3.9.2 SEQUENZIERPRIMER

M13revers und SP6 (Pharmacia Biochemicals, Freiburg):

Primer	Sequenz
M13rev	5`CAGGAAACAGCTATGAC3`
SP6	5`GATTTAGGTGACACTATAG3`

3.9.3 OLIGONUKLEOTIDE

Die Synthese der verwendeten Oligonukleotide (Primer) für die PCR beziehungsweise für die Reverse Transkription übernahm das Institut für Säugetiergenetik der GSF. Die verwendeten Primer wurden so konstruiert, daß keine 3` Komplementarität vorliegt, keine längeren Polypurinabschnitte vorkommen und sich am 3`-Ende grundsätzlich ein Purin befindet. Bei der Primerwahl galt es außerdem, Intronbereiche zu überbrücken, um evtl. amplifizierte genomische DNA erkennen zu können. Alle verwendeten Primer haben eine Länge von 22 bis 25 Bp und einen CG-Gehalt von $\geq 50\%$. Unter diesen Bedingungen liegt die kalkulierte Schmelztemperatur (T_m) aller Primer bei über 65°C . Für kurzkettige Oligonukleotide kann ein angenäherter T_m -Wert nach der Formel:

$$T_m = 4^\circ\text{C} \times (\text{Anzahl der G+C-Basen}) + 2^\circ\text{C} \times (\text{Anzahl der A+T-Basen})$$

ausgerechnet werden.

	5` Primersequenz 5` 3`	3` Primersequenz 5` 3`	Größe
IL-4	CATTGTCACTGCAAATCGACACC	CCGTTTCAGGAATCGGATCAGC	356 Bp
IL-5	CGAACTCTGCTGATAGCCAATG	CCACTCGGTGTTTCATTACACCAAG	268 Bp
IL-2	CAAGAATCCCAAACCTCACCAGG	CAATGGTTGCTGTCTCATCAGC	250 Bp
IL-9	GATCCTGGACATCAACTTCCTC	CTTGCCTCTCATCCCTCTCATC	351 Bp
IFN- γ	AGCTCTGCATCGTTTTGGGTTC	CAAATATTGCAGGCAGGACAACC	492 Bp
IL-9R	GCCAAGGTCTAGAACCTTCACC	GCAGGAGAAAGATGGACACAGC	702 Bp
c-myb	CGACACAGCATCTACAGTAGCG	CAGTGGTTCTTGATAGCATTATCG	538 Bp
GAPDH	GCACCACCAACTGCTTAGCACC	GTCTGAGTGTGGCAGGGACTC	645 Bp

Standard	Sequenzen der Verlängerungsprimer
IL-9 / IL-10 / c-myb	5': 5'GATCCTGGACATCAACTTCCTCCCGTGGAGCAGGTGAAGAATG CCGACACAGCATCTACAGTAGCG3'
Amplikonlänge: 600 Bp	3': 5'CAGCTAGAAAGCGTGGTCAGGC CTTGCCTCTCATCCCTCTCATC CAGTGGTTCTTGATAGCATTATCAG3'
IL-4 / IL-5 / c-myb	5': 5'CATTGTCACTGGAAATCGACACC GAACTCTGCTGATAGCCAATG CGACACAGCATCTACAGTAGCG3'
Amplikonlänge: 600 Bp	3': 5'CCACTCGGTGTTTCATTACACCAAGCCGTTTCAGGAASTCGGATC AGC CAGTGGTTCTTGATACGATTATCAG3'
IL-1 / IL-2 / IFN- γ / c-myb	5': 5'CGATCACTGAACTGCACGCTCCGCAAGAATCCCAAACCTCACCA GGAGCTCTGCATCGTTTTGGGTTCCGACACAGCATCTACAGTAGC 3'
Amplikonlänge: 630 Bp	3': 5'CAAATATTGCAGGCAGGACAACCCAATGGTTGCTGTCTCATCAG CGGTGAAGTCAGTTATATCTGGCCGCAGTGGTTCTTGATAGCAT TATCAG3'

Schnittstellenprimer**Sequenzen der Primer mit Schnittstellen**

Bam HI plus IL-9	5': 5' <u>CCTCGAGGATCC</u> GATCCTGGACATCAACTTCCTC3'
Sac I plus IL-10	3': 5' <u>CCTCGAGAGCTC</u> CAGCTAGAAGCGTGGTCAGGC3'
Bam HI plus IL-4	5': 5' <u>CCTCGAGGATCC</u> CATTGTCACTGCAAATCGACACC3'
Sac I plus IL-5	3': 5' <u>CCTCGAGAGCTC</u> CCACTCGGTGTTTCATTACACCAAG3'
Bam HI plus IL-1	5': 5' <u>CCTCGAGGATCC</u> CGATCACTGAACTGCACGCTCC3'
Sac I plus IFN- γ	3': 5' <u>CCTCGAGAGCTC</u> CAAATATTGCAGGCAGGACAACC3'

3.10 PLASMIDE

pGEM 3Z	Promega Corporation, USA
pSP64 (PolyA)	Promega Corporation, USA

3.11 PRIMÄRE ZELLEN

Sämtliche Kontrolluntersuchungen wurden mit Zellen des peripheren Blutes freiwilliger gesunder Probanden durchgeführt. Quelle für Vollblut atopischer Patienten: Dermatologische Klinik, München. Die Patienten hatten ihr Einverständnis zur Durchführung dieser Untersuchungen gegeben. In Zusammenarbeit mit der Abteilung für Pulmonologie der Universität Amsterdam wurden die PBMC von 11 Patienten, die an Asthma bronchiale litten, durchgeführt. Die PBMC dieser Patienten wurden in Amsterdam isoliert und die weitere Analyse im Verlauf dieser Arbeit durchgeführt (klinische Daten siehe Anhang).

3.12 REKOMBINANTE PROTEINE

rh IL-9 Pepro Tech, USA

rh IL-2 PBH, Hannover

3.13 STANDARDS FÜR ELEKTROPHORESEN

Als DNA-Längenstandard für die PCR-Produkte diente ein 100-Bp-Marker von Pharmacia (Freiburg), für größere DNA ein 1-kB-Marker von Gibco BRL (USA).

4 METHODEN

4.1 ARBEITEN MIT BAKTERIEN

4.1.1 HERSTELLEN TRANSFORMATIONS-KOMPETENTER BAKTERIEN

Bakterien vom Typ DH5 α wurden auf LB-Platten (siehe 4.1.3) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. 250 ml SOB-Medium wurden mit 1 Kolonie angeimpft und bei 18 °C und 250 rpm bis zu einer optischen Dichte von 0,6 (bei 600 nm) geschüttelt. Die Bakterien wurden nach 10 Minuten Eisschock abzentrifugiert (2500 x g, 4 °C), das Sediment in 80 ml TB-Puffer resuspendiert und wieder für 10 Minuten auf Eis gestellt. Nach erneutem Abzentrifugieren (10 Minuten, 4 °C, 2500 x g) wurde das Sediment mit 20 ml TB-Puffer resuspendiert und mit 7% DMSO (Inoue et al., 1990) versetzt. Diese Suspension wurde wieder 10 Minuten auf Eis gestellt, je 1-2 ml in Einfrierröhrchen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

TB-Puffer:

10	mM	PIPES
55	mM	MnCl ₂
15	mM	CaCl ₂
250	mM	KCl
mit KOH auf pH 6,7 eingestellt		

SOB-Medium:

2	% (w/v)	Bacto Trypton
0,5	% (w/v)	Hefeextrakt
10	mM	NaCl
2,5	mM	KCl
mit 5 N NaOH auf pH 7,0 eingestellt		
10	mM	MgCl ₂
10	mM	MgSO ₄

4.1.2 TRANSFORMATION VON BAKTERIEN

100 μ l der kompetenten Bakterien wurden mit 5 ng Plasmid-DNA gut gemischt und 30 Minuten im Eis geschüttelt. Nach 45 Sekunden Hitzeschock bei 42 °C und 2 Minuten Abkühlen auf Eis wurden 900 μ l SOC-Medium dazupipettiert und für 1 Stunde bei 37 °C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde in verschiedenen Verdünnungen auf Agarplatten mit Ampicillin (100 μ g/ml) ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

SOC-Medium:

		SOB-Medium
20 mM		Glucose

4.1.3 VERMEHRUNG VON BAKTERIEN AUF AGARPLATTEN

Bakterien vom Typ DH5 α wurden nach der Transformation mit Plasmid-DNA auf Agarplatten (LB-Medium plus Antibiotikum) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. LB-Medium wurde mit 1,2% Bacto-Agar aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf 50 °C wurde Ampicillin (100 μ g/ml) zugegeben und die Agarlösung in Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren des Agars wurden die Bakterien ausplattiert.

LB-Medium:

10	g/l	Bacto Trypton
5	g/l	Hefeextrakt
10	g/l	NaCl

mit NaOH auf pH 7,0 einstellen.

4.1.4 VERMEHRUNG VON BAKTERIEN IN FLÜSSIGKULTUR

Das auf 37 °C vorgewärmte LB-Flüssigmedium wurde mit der oben genannten Ampicillinmenge versetzt, mit Bakterien angeimpft und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

4.1.5 AUFBEWAHRUNG VON BAKTERIEN

Zur kurzzeitigen Aufbewahrung der Übernachtskulturen wurden die Bakterien abzentrifugiert, mit 10 mM MgSO₄ aufgefüllt und im Kühlschrank aufbewahrt. Um die Bakterien längerfristig aufbewahren zu können, wurden Glycerinkulturen angelegt. Dafür wurden 500 μ l einer Übernachtskultur mit 172 μ l Glycerin (87%, autoklaviert) und 328 μ l LB-Medium gemischt und sofort bei -70 °C eingefroren.

4.2 ARBEITEN MIT ZELLEN

4.2.1 ISOLIERUNG MONONUKLEÄRER ZELLEN AUS HUMANEM VOLLBLUT

Humane mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) lassen sich mit einer Dichtegradientenzentrifugation isolieren. In einem 50-ml-Zentrifugenröhrchen wurden 6 ml Percoll-Trennlösung (Seromed-Biochrom KG) (Dichte: 1,077 g/ml) vorgelegt. 20 ml verdünntes (1:2 mit PBS), heparinisiertes Vollblut wurde über die Trennlösung geschichtet und 30 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. In der Interphase zwischen Plasma und Percoll-Trennlösung reichern sich die mononukleären Zellen an, während die Erythrocyten und die Granulocyten auf den Boden des Röhrchens sedimentieren. Das Plasma wurde abgesaugt und die mononukleären Zellen geerntet. Die Zellsuspension wurde dann noch zweimal zu gleichen Teilen mit PBS verdünnt und gewaschen (250 x g /10 Minuten).

PBS:

137	mM	NaCl
2,7	mM	KCl
6,5	mM	Na ₂ HPO ₄
1,5	mM	KH ₂ PO ₄ pH 7,0 bis 7,2

4.2.2 ISOLIERUNG CD4-POSITIVER ZELLEN MIT MACS CD4-MICROBEADS

Bei dem Verfahren der magnetischen Zellsortierung (MACS-Magnetic Cell Sorting) werden sehr kleine superparamagnetische Partikel (≤ 50 nm φ) eingesetzt, an die für die Trennung direkt oder indirekt Antikörper gekoppelt sind. Mit diesen MACS-Partikeln lassen sich sehr spezifische und quantitative Markierungen durchführen. Zur Trennung sind allerdings sehr starke Magnetfelder nötig, denn die Partikel sind nur schwach magnetisch, weswegen sie auch nicht aggregieren. Starke Magnetfelder werden in speziellen Säulen aus Stahlwolle zwischen den Magnetpolen eines Hochleistungspermanentmagneten erzeugt. Magnetpartikel werden spezifisch über die monoklonalen Antikörper an die entsprechenden Zellen gebunden. Die Zellsuspension mit den magnetisch markierten Zellen wird im Magnetfeld über die mit der Stahlwollmatrix gefüllte Säule gegeben. Zwischen den Fäden der Stahlwolle, die außerhalb des Magneten unmagnetisch ist, entsteht im Magnetfeld ein sog. „Hochgradientenfeld“, in dem auf magnetisierbare Partikel äußerst hohe Kräfte ausgeübt werden. Magnetisch markierte Zellen bleiben in der Matrix hängen, wäh-

renddessen die unmarkierten Zellen diese passieren und als negative Fraktion aufgefangen werden können. Die markierten Zellen werden durch Elution außerhalb des Magnetfeldes gewonnen. Wenn bei der magnetischen Markierung gleichzeitig auch Fluorochrom-konjugierte Antikörper zugesetzt werden, kann die magnetische Sortierung im Durchflußzytometer kontrolliert werden.

4.2.2.1 ENTFERNUNG DER MONOCYTEN

Es wurden maximal 5×10^8 über Percoll-Gradienten separierte PBMC sedimentiert (300 x g, 5 Minuten, 20 °C) und in 70 µl MACS-Puffer resuspendiert. Daraufhin wurden 20 µl CD33-Microbeads (konjugiert mit monoklonalen humanen CD33-spezifischen Antikörpern) zugegeben und 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen und Resuspension in 500 µl MACS-Puffer erfolgte die Auftragung der markierten Zellen auf die äquilibrierte MiniMACS-Säule. Mit 500 µl MACS-Puffer wurde die nicht markierte Fraktion eluiert. Im Anschluß an zwei Waschschrte wurde die CD33-positive Monocyten-Fraktion außerhalb des Magnetfeldes eluiert.

MACS-Puffer:

		PBS
0,5	% (w/v)	BSA
5	mM	EDTA

4.2.2.2 ANREICHERUNG DER CD4⁺ T-LYMPHOZYTEN AUS MONOCYTEN-DEPLETIERTEN PBMC

1×10^7 Monocyten-depletierte PBMC wurden bei 300 x g und 20 °C 5 Minuten sedimentiert und anschließend in 70 µl MACS-Puffer resuspendiert. Im Anschluß wurden 20 µl CD4-Microbeads (konjugiert mit monoklonalen humanen CD4-Antikörpern) dazugegeben und 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen und Resuspension in 500 µl MACS-Puffer wurden die markierten Zellen auf die äquilibrierte MiniMACS-Säule im Magnetfeld aufgetragen. Mit 500 µl MACS-Puffer wurde die CD4-negative Fraktion eluiert. Die CD4⁺-T-Zell-Fraktion wurde im Anschluß an zwei Waschschrte außerhalb des Magnetfeldes gesammelt.

4.2.3 KULTIVIERUNG DER PBMC

Die PBMC wurden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml Zellkulturmedium 1 Stunde bis zu 4 Tage in 24-well-Platten beziehungsweise in Kulturflaschen in einem Feuchtinkubator mit 5% CO₂ bei 37 °C kultiviert.

Zellkulturmedium:

		RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin
10	% (v/v)	FCS
1	%	Penicillin, Streptomycin

4.2.3.1 MITOGENSTIMULATION DER PBMC

Phytohämagglutinin (PHA), ein pflanzlicher Lektinextrakt, besitzt potente mitogene Eigenschaften. Für die Stimulation der Zellproliferation in den Lymphocytenkulturen wurde PHA in einer Konzentration von 5 µg/ml Medium eingesetzt.

4.2.3.2 SPEZIFISCHE STIMULATION DURCH MONOKLONALE ANTIKÖRPER ODER INTERLEUKINE

Für eine spezifische T-Zell-Stimulation wurden CD2 und CD28-Antikörper eingesetzt (1 mg/ml). In den Versuchen zur IL-9-Regulation wurden die PBMC zusätzlich zur PHA-Stimulation mit IL-9-Antikörpern (1 mg/1 ml), mit rekombinantem humanem IL-9 (100 ng/µl), mit IL-2-Antikörpern (1 mg/ml), mit CD25-Antikörpern (200 µg/ml) und mit rekombinantem humanem IL-2 (10 ng/ml) inkubiert.

4.3 ARBEITEN MIT RNA UND DNA

4.3.1 DNA-GELELEKTROPHORESE

DNA-Fragmente und PCR-Produkte wurden in horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Hierzu wurden 0,8-1,5% Agarose in 1 x TBE-Puffer gelöst, als Laufpuffer wurde ebenfalls 1 x TBE-Puffer verwendet. Zur Größenbestimmung wurden unterschiedliche Längenstandards mitgeführt, z. B. eine 1-Kilobasen- oder eine 100-Basenpaar-Leiter. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen Auftragspuffer versetzt und aufgetragen. Für analytische Gele

wurde eine Spannung von 5 V/cm Gellänge angelegt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele 20 Minuten mit Ethidiumbromid (10 µg/ml) gefärbt. Die DNA wurde durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht und fotografiert.

1 x TBE-Puffer:

90	mM	Tris
90	mM	Borsäure
2,5	mM	EDTA

4.3.2 SPALTUNG VON DNA MIT RESTRIKTIONSENZYMEN

Alle Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen wurden nach den Angaben der Hersteller durchgeführt. Es wurden 5 bis 10 Enzymeinheiten pro µg DNA mit den geeigneten Puffern verwendet. Die Restriktionsansätze wurden für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und im Agarosegel aufgetrennt.

4.3.3 DNA-LIGATION MIT T4-DNA-LIGASE

Mit Hilfe der T4-Ligase wurden DNA-Fragmente mit den Vektoren kovalent verknüpft. Dazu wurden DNA-Mengen von Vektor und Fragment im molaren Verhältnis von 1:2 beziehungsweise 1:3 mit vom Hersteller mitgeliefertem Ligationspuffer und einer Weiss-Einheit T4-DNA-Ligase in einem Reaktionsansatz von 20 µl bei 16 °C über Nacht inkubiert.

5 x Ligasepuffer:

250	mM	Tris-HCl, pH 7,6
50	mM	MgCl ₂
5	mM	ATP
5	mM	DTT
25	% (w/v)	Polyethylenglycol-8000

4.3.4 ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN

Die Isolierung der DNA-Fragmente aus Agarosegelen erfolgte durch Bindung an Silikatpartikel mit dem „GeneClean II Kit“ entsprechend der beigefügten Anleitung. Für die Elution der DNA mit dieser Methode wurden 1 x TAE-Agarosegele zur Auftrennung der DNA verwendet.

1 x TAE-Puffer:

0,04 M Tris-Acetat

0,001 M EDTA

4.3.5 BESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREKONZENTRATIONEN

Die Messungen der Absorption im UV-Licht wurden mit einem Beckmann DU-64 Spektralphotometer durchgeführt. Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde bei 260 nm und 280 nm gemessen. Der Quotient der bei 260 nm und 280 nm gemessenen Absorption gibt Aufschluß über die Reinheit der Nukleinsäure-Präparation. Bei sehr reinen DNA-Lösungen liegt der Quotient zwischen 1,8 und 1,95; bei RNA-Lösungen zwischen 1,9 und 2,0. Aus den ermittelten Extinktionswerten bei 260 nm werden die Konzentrationen der Lösungen und die Gesamtmenge für die einzelnen Ansätze berechnet. Dabei entspricht 1 OD₂₆₀ einer Konzentration von 40 ng/µl bei RNA und einer Konzentration von 50 ng/µl bei doppelsträngiger DNA.

4.3.6 ISOLIERUNG DER GESAMT-RNA AUS PBMC

Die Isolierung der RNA aus Zellen des peripheren Blutes erfolgte mit dem RNeasy RNA Präparationskit von Qiagen, Hilden, nach den Vorschriften des Herstellers.

Diese Methode kombiniert die selektiven Bindungsmöglichkeiten einer Silicagelmembran mit Zentrifugation. Das Hochpuffersystem erlaubt eine Bindung von bis zu 100 µg RNA. Diese Methode isoliert lediglich RNA Moleküle, die länger als 200 Basen sind. Kleine RNA-Spezies binden nicht unter den angewandten Konditionen. Da niedermolekulare RNA bis zu 15-20% der totalen RNA ausmachen, werden durch diese Methode größere RNA-Moleküle angereichert.

Die PBMC wurden zuerst unter hochdenaturierenden Bedingungen lysiert, um RNasen zu inaktivieren und so die Isolation intakter RNA zu gewährleisten (dem vom Hersteller mitgelieferten Lysepuffer wurden 10 µl β-Mercaptoethanol/ml Puffer zugefügt). Das Lysat wurde vor der Weiterbehandlung bei -20 °C eingefroren. Nach dem Anpassen der lysierten Zellen an die verwendeten Bindungskonditionen erfolgte das Auftragen auf ein RNeasy Zentrifugationsröhrchen. Nach zweimaligem Waschen (Waschpuffer RW1 und RPE sind Bestandteile des Kits) Elution der RNA mit 30 µl DEPC-Wasser (autoklaviertes Diethyl-

pyrocarbonat 0,1 Vol%). Anschließend erfolgte zur Konzentrationsbestimmung die Messung der optischen Dichte im Spektralphotometer. Die RNA wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C gelagert.

4.3.7 CDNA-SYNTHESE

Das Enzym für die Synthese der cDNA ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die M-MLV reverse Transkriptase. Sie verwendet Desoxyribonukleosid-Triphosphate als Substrate und benutzt die RNA als Matrize für die Synthese des DNA-Stranges.

5 x Erststrangsynthese Puffer:

250	mM	Tris-HCl, pH 8,3
375	mM	KCl
15	mM	MgCl ₂

20 µl Reaktionsansatz:

	DEPC-Wasser
	RNA (500ng Poly(A) RNA oder bis zu 20 µg Gesamt RNA)
4 µl	Erststrangsynthese Puffer
2 µl	DTT
1 µl	Oligo(dT ₁₅) Primer (0,5 µg/µl)
1 µl	dNTP (je 10 mM)
	Denaturierung für 2 Minuten bei 65 °C
1 µl	M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)
1 µl	RNase-Inhibitor (40 U/µl)

Dieser Reaktionsansatz wurde 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und nachfolgend 1 Minute bei 95 °C denaturiert. Die einzelsträngige cDNA konnte direkt als Template für die PCR eingesetzt werden oder bei -20 °C gelagert werden.

Dieser Ansatz wurde für die cDNA Synthese der zellulären RNA sowie für die *in vitro* synthetisierte Poly(A) RNA des internen Standards benutzt.

4.3.8 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht eine selektive *in vitro* Amplifikation einer bestimmten DNA-Sequenz. Folgende Komponenten werden für die Reaktion benötigt: einzelsträngige DNA als Template, Primer (Oligonukleotide, deren Sequenzen komplementär zu der Sequenz des DNA-Templates sind), Desoxyribonukleosid-Triphosphate

(dNTP) und eine thermostabile DNA-Polymerase. Die enzymatische DNA-Synthese beginnt am freien 3'-OH-Terminus der Primer.

Die PCR erfordert drei sich wiederholende Temperaturschritte: 1. Denaturierung der Doppelstrang-DNA, 2. Annealing der Primer an das Template und 3. Extension der Primer am 3'-OH-Ende und sukzessiver Einbau der dNTP. Diese sich wiederholenden Zyklen der Amplifikation führen theoretisch zu einer exponentiellen Synthese eines DNA-Fragments mit einer Größe, die durch die Position der Primer auf dem zu amplifizierenden DNA-Strang vorgegeben ist..

Die exponentielle DNA-Synthese wird mit folgender Formel beschrieben:

$(2^n - 2n)x$	
n	= Anzahl der Zyklen
2n	= erste und zweite Extensionsprodukte
x	= Anzahl der Kopien des Originaltemplates

PCR-Reaktionsansatz:

2,5	µl	10 x PCR-Puffer
0,5	µl	dNTP (je 10 mM)
1,25	µl	3' Primer (10 µM)
1,25	µl	5' Primer (10 µM)
1	µl	Template-DNA (unterschiedlichster Menge)
0,1	µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
18,4	µl	DEPC-Wasser

10 x PCR-Puffer:

500	mM	KCl
100	mM	Tris-HCl (pH 9,0)
15	mM	MgCl ₂

Die Reaktionen wurden in dünnwandigen 0,5-ml-PCR-Reaktionsgefäßen in einem programmierbaren Thermocycler (Biozym PTC 100-60HB) durchgeführt.

Die Parameter der einzelnen Zyklen sind:

Denaturierung:	95 °C	30 Sekunden.
Annealing:	65 °C	30 Sekunden.
Extension:	72 °C	30 Sekunden.

Die Synthese endet nach 40 Zyklen mit einer 10minütigen Extension bei 72 °C, um eventuell nicht vollständig synthetisierte Fragmente aufzufüllen.

Alle Reaktionen wurden erst bei erreichten 95 °C im Thermocycler durch Zugabe der Taq Polymerase gestartet, um einen sog. „hot start“ der PCR zu gewährleisten. In allen PCR-Experimenten wurden Kontrollen ohne Zugabe von cDNA durchgeführt, um Kontaminationen auszuschließen. Weiterhin wurden regelmäßig Kontrollen mit c-myb Primern durchgeführt, um Kontaminationen der PCR-Reagenzien und der zu untersuchenden cDNA mit Standardmolekülen (Standard: Fragment einer Maus c-myb-Sequenz) auszuschließen.

Je 10 µl eines jeden PCR-Ansatzes wurden auf ein 1,5%iges Agarosegel zur Trennung aufgetragen, gefärbt und fotografiert, beziehungsweise auf einer Diskette zur späteren Auswertung gespeichert.

4.3.9 PRINZIP DER QUANTITATIVEN RT-PCR

Die Anwendung der quantitativen RT-PCR erfolgte, um Quantifizierungen der mRNA verschiedener Cytokine nach reverser Transkription und Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) vornehmen zu können. Die hier beschriebene Technik beruht auf dem Prinzip der kompetitiven PCR unter Verwendung eines internen RNA-Standards, der die gleichen Primersequenzen enthält wie die zu untersuchende mRNA, allerdings ein PCR-Produkt geringfügig unterschiedlicher Größe ergibt. Durch die Verwendung eines RNA-Standards spielt die Effizienz der reversen Transkription für den Vergleich verschiedener Versuchsansätze keine Rolle.

Drei Vorbedingungen sind für eine exakte Quantifizierung von entscheidender Bedeutung:

- Die Quantifizierung muß im exponentiellen Bereich der Amplifikation der cDNA erfolgen.

- Die cDNA des internen Standards und die cDNA der zu quantifizierende RNA müssen mit der gleichen Effizienz amplifiziert werden.
- Die Kontrollsequenz und die cDNA der zu quantifizierende RNA müssen in einer „vergleichbaren Menge“ vorliegen, so daß beide Sequenzen identische Amplifikationskinetiken aufweisen.

Unter diesen Voraussetzungen ist eine exakte Quantifizierung von PCR-Produkten möglich (Ferre, 1992).

4.3.10 KONSTRUKTION DER INTERNEN STANDARDS

Ein interner Standard für die quantitative PCR besteht aus einem zentralen Stück einer irrelevanten Sequenz, die nicht mit den Sequenzen der zu untersuchenden Probe hybridisieren soll und die Funktion hat, einen definierten Abstand zwischen definierten Primerbindungsstellen zu beiden Seiten dieses sogenannten Spacer-Fragments zu schaffen.

Die verschiedenen internen Standards zur Quantifizierung verschiedener Cytokin mRNA wurden unter Anwendung der PCR synthetisiert. Beide Seiten des Spacer-Fragments wurden mittels PCR um die spezifischen Primersequenzen und zusätzlich um eine Restriktionsschnittstelle verlängert. Als Spacer wurde ein 538 Bp langes Fragment einer klonierten Maus c-myb cDNA verwendet. Dieses Fragment zeigte keine Hybridisierung mit humanen cDNA-Sequenzen und wurde aus dem pGEM3Z Vektor isoliert und aufgereinigt, um als Template für die erste PCR zu dienen. Ein Primer mit einer Länge von 66 Basen verlängerte das 5'-Ende des c-myb-Templates. Dieses Oligonukleotid setzte sich aus der Primersequenz I und II und der Sequenz für das 5'-Ende des c-myb-Fragmentes zusammen (Abbildung 5). Über das Annealing der c-myb-Primersequenz an das komplementäre DNA-Fragment war die Amplifikation der c-myb-Sequenz inklusive der in 5' überhängenden zusätzlichen Primersequenzen I und II zu erwarten. Auf diese Weise sollten 3' sowie analog 5' vom Spacer-Fragment die verschiedenen Primersequenzen für die zu untersuchenden Cytokine synthetisiert werden. Es stellte sich an dieser Stelle heraus, daß es nicht möglich war, unter diesen Bedingungen ein PCR-Produkt definierter Größe zu erhalten. Aufgrund dieser Schwierigkeiten bei der Konstruktion des internen Standards wurde sodann versucht, die richtige Fragmentgröße mittels eines zusätzlichen, terminalen Primers anzureichern (Abbildung 5). Die Quantität an unspezifischen Fragmentgrößen wurde zwar geringer, eine spezifische Bande wurde jedoch nicht erhalten. Erst durch die

sukzessive Verringerung der Konzentration der längeren Oligonukleotide (500 nM, 50 nM, 5 nM und 0,5 nM) und eine geringere Ausgangsmenge an Template (1-2 pg) in dieser „Drei-Primer-PCR“ ließ sich eine selektive Amplifikation des gewünschten Produktes erreichen. Unter Anwendung dieser Technik wurden nacheinander beide Seiten des c-myb-Fragmentes um die spezifischen Primersequenzen verlängert. Die PCR-Produkte mußten nach jedem Schritt im präparativen Maßstab amplifiziert, im Agarosegel aufgetrennt und gereinigt werden.

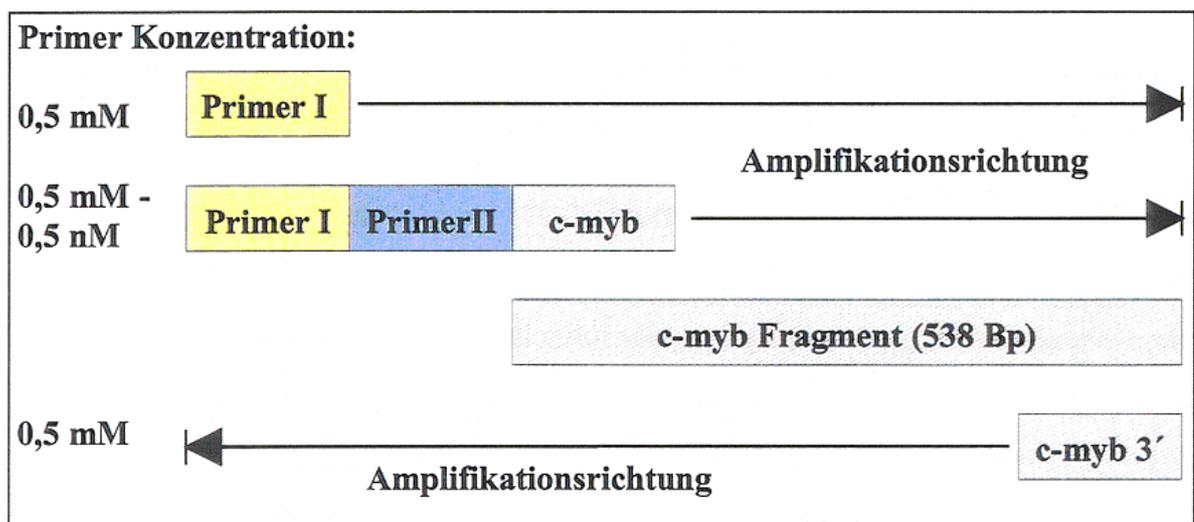


Abbildung 5: Schema der Konstruktion eines internen Standards: Die Darstellung zeigt die Verlängerung des Spacer-Fragments auf der 5'-Seite.

Im Anschluß an die Verlängerung des Spacer-Fragments um die spezifischen Primersequenzen wurde mit Hilfe eines weiteren 5'-Primers eine Restriktionsschnittstelle an das PCR-Produkt angehängt (Abbildung 6). Die Modifikation des 3'-Endes erfolgte analog zur Konstruktion auf der 5'-Seite.

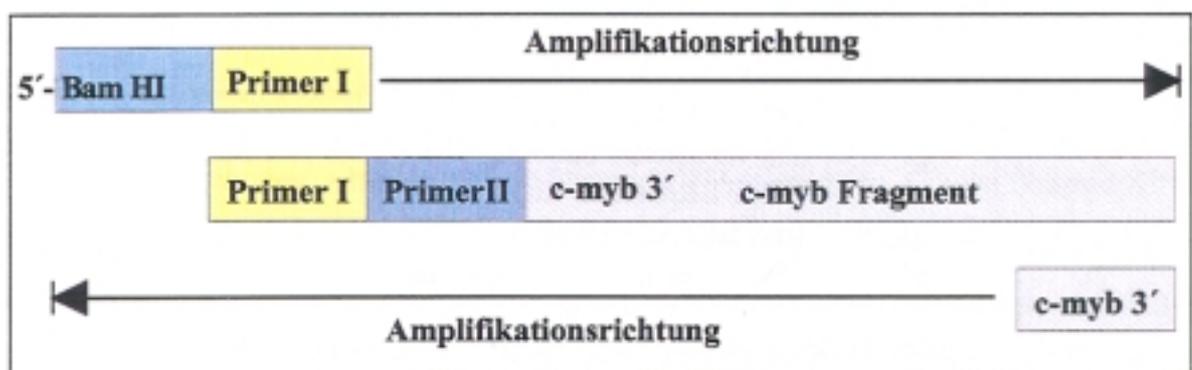


Abbildung 6: Verlängerung des 5'-Endes des PCR-Produktes um eine Restriktionsschnittstelle.

4.3.11 KLONIERUNG

Die Wahl geeigneter Schnittstellen an den Enden des Standards ermöglichte, daß das PCR-Produkt gerichtet in den pSP64 (PolyA)-Transkriptionsvektor kloniert werden konnte. Die cytokinspezifischen Primer werden jetzt 5' von einem SP6-RNA-Polymerase-promotor und 3' von einer Poly(A)-site begrenzt. Diese Vorgehensweise erlaubt die *in vitro* Synthese eines korrespondierenden Poly(A)⁺-Transkripts des Standards für die RT-PCR.

4.3.12 SEQUENZIERUNG

Die Sequenzierung der Standards erfolgte nach der Sanger Didesoxy-Methode (Sanger et al., 1977). In die Reaktion wurden 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Als Radionukleotid wurde [α -³⁵S]-dATP verwendet.

Denaturierung und Annealing der Primer:

6 µl	DNA (1 µg)
1 µl	SP6- oder M13rev Primer (2,5 ng/µl)
1 µl	1 M NaOH

10 Minuten bei 68 °C denaturieren

2 µl	TES-Puffer
------	------------

TES-Puffer:

560	mM	TES
240	mM	HCL
100	mM	MgCl ₂

10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

Markierungsreaktion:

0,5	µl	H ₂ O
1	µl	100 mM DTT
2	µl	1:5 verdünnter Labeling Mix (je 0,6 µM dGTP, dCTP und dTTP Sequenase-Kit)
0,5	µl	[α - ³⁵ S]-dATP (5 µCi)
2	µl	DNA Polymerase (Sequenase 13.000 U/ml, 1:8)

6 µl wurden zu jeder Reaktion gegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Termination wurden pro Reaktionsansatz 2,5 µl des jeweiligen Terminationsmixes auf Mikrotiterplatten verteilt (je 8 µM ddGTP, ddATP, ddTTP und ddCTP), 3,5 µl der Markierungsreaktion dazugegeben und 5-15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 4 µl der Stopplösung zupipettiert und der Reaktionsansatz bei -20 °C gelagert oder direkt auf das Gel auftragen.

Stopplösung:

98	%	Formamid
50	mM	Tris/Borat
1	nM	EDTA
0,05	%	Bromphenolblau
0,05	%	Xylencyanol

4.3.13 DENATURIERENDE POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE

Nach 3minütiger Denaturierung bei 100 °C wurden 2 µl die Sequenzreaktion auf einem 6%igen denaturierenden (7 M Harnstoff) Polyacrylamidgel (1.200 V für 35 cm Gellänge) aufgetrennt, anschließend getrocknet und autoradiografiert. Für die Autoradiographie wurden Kodak Filme (BioMax MR-1 35-43a) eingesetzt. Die Sequenz des Standards konnte nach dem Entwickeln direkt vom Röntgenfilm abgelesen werden.

Polyacrylamidgel:

0,2	g	Harnstoff
28,5	g	Polyacrylamid
1,5	g	Bisacrylamid
50	ml	10 x TBE
ad 500	ml	H ₂ O, filtriert und entgast

4.3.14 ISOLIERUNG VON PLASMID DNA

4.3.14.1 QIAGEN PLASMIDPRÄPARATION

Bei dieser Methode zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde der „Qiagen Plasmid Kit“ verwendet. Dabei wurde die DNA im Anschluß an die alkalische Lyse nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Diese Art der Plasmidpräparation basiert auf der modifizierten Methode von Birnboim und Doly (1979) und der DNA-Adsorption an Silicagelmembranen unter Hochsalzbedingungen.

4.3.14.2 DICHTEGRADIENTEN-METHODE

Konnte durch die Sequenzierung der Standards die korrekte Basenabfolge der Primersequenzen sichergestellt werden, wurde das entsprechende Plasmid im präparativen Maßstab in reiner Form isoliert. Hierzu wurde ein alkalischer Aufschluß nach Birnboim und Doly (Birnboim, Doly, 1979) mit anschließender Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation (Ish-Horowicz, Burke, 1981) durchgeführt.

Bakterien aus einer 500 ml Übernachtskultur wurden 10 Minuten bei 4.000 rpm bei 4 °C (Sorvall-GS3) abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 20 ml STE-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (4.000 rpm, 4 °C, 10 Minuten) wurde das Sediment in 10 ml Lösung A resuspendiert und nach Zugabe von einem 1/10 Volumen (10 mg/ml) Lysozym für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Lösung B dazupipettiert und abermals 10 Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1,5 ml eiskalter Lösung C wurde die Suspension weitere 10 Minuten auf Eis belassen und 60 Minuten bei 4 °C mit 18.000 rpm abzentrifugiert. Zum Überstand wurden 0,7 Volumina Isopropanol gegeben und die DNA 60 Minuten bei -20 °C ausgefällt. Die DNA wurde 30 Minuten bei 10.000 rpm sedimentiert, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 4 ml TE-Puffer gelöst. Anschließend wurden 1 g CsCl/ml Suspension eingewogen, 1/10 Volumen Ethidiumbromid (10 mg/ml) dazugegeben und durch eine sterile Gaze filtriert. Diese Lösung wurde in ein Quick-seal-Zentrifugenröhrchen überführt, mit Mineralöl aufgefüllt, austariert und verschweißt. Bei 40.000 rpm wurde ein Dichtegradient in der Ultrazentrifuge (40 Stunden bei 20 °C) aufgebaut. Die Plasmidbande wurde unter UV-Licht mit einer Kanüle abgezogen und das Ethidiumbromid mittels Butan-2-ol entfernt. Die DNA wurde über Nacht in TE-Puffer dialysiert. Nach einer Phenolextraktion wurde die DNA mit absolutem Ethanol für 3 Stunden bei -20 C gefällt und abzentrifugiert (5.000 rpm, 30 Minuten bei Raumtemperatur). Das Sediment wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet, in TE-Puffer resuspendiert, und die DNA-Konzentration durch OD-Messung bestimmt.

STE-Puffer:

100	mM	NaCl
10	mM	Tris-HCl, pH 8,0
1	mM	EDTA

Lösung A:

50	mM	Glucose
25	mM	Tris-HCl, pH 8,0
10	mM	EDTA

Lösung B:

0,2	N	NaOH
1	%(w/v)	SDS

Lösung C:

5	M	Kaliumacetat
11,5	%(v/v)	Eisessig

TE-Puffer:

10	mM	Tris-HCl, pH 8,0
1	mM	EDTA

4.3.15 LINEARISIERUNG DES VEKTORS

Vor der *in vitro* Transkription wurde das Plasmid auf der dem SP6-Promotor abgewandten Seite linearisiert. 30 µg Plasmid-DNA wurden mit 300 U EcoR I und Enzympuffer für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde dem Reaktionsansatz 1,5 µl Proteinase K (20 mg/ml) und Proteinase K-Puffer zugegeben und das Gemisch eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion wurde der Ansatz mit Ethanol zur Fällung der DNA versetzt und bei -20 °C aufbewahrt. Ein Aliquot des linearisierten Vektors wurde auf einem 1%igen Agarosegel analysiert. Wenn kein ungeschnittener Vektor mehr nachweisbar war, wurden 1 µg des linearen Vektors in die *in vitro* Transkription eingesetzt.

10 x Proteinase K-Puffer:

100	mM	Tris-HCl, pH 7,4
1	M	NaCl
10	mM	EDTA pH 8,0
1	%(w/v)	SDS

4.3.16 *In vitro* TRANSKRIPTION

Das Enzym für die spezifische *in vitro* RNA-Synthese ist die SP6-RNA-Polymerase. Der SP6-Promotor, der im Plasmid pSP64 Poly(A) 5' vor der integrierten DNA lokalisiert ist, steuert die Initiierung der Transkriptionsreaktion. Das gewählte Plasmid erlaubt auf-

grund einer vorhandenen poly(T)-Sequenz die Transkription einer polyadenylierten RNA. Die Spaltung des pSP64-Vektors mit einem Restriktionsenzym an einer Stelle stromabwärts von der einklonierten DNA liefert den Terminus für das RNA-Transkript. Auf diese Weise konnten polyadenylierte RNA Transkripte definierter Länge hergestellt werden.

10µl Transkriptionsansatz:

2	µl	5 x Inkubationspuffer
1	µl	DTT (0,1 M)
2	µl	rNTP (je 2,5 mM)
1	µl	linearisierter Vektor (1 µg)
0,5	µl	RNasin (40 U/µl)
0,5	µl	SP6 RNA-Polymerase (20 U/µl)
3	µl	DEPC Wasser

Dieser Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend zur Entfernung der DNA-Matrize mit 1,5 µl RQ1 RNase-freier DNase (1 U/µl) weitere 30 Minuten inkubiert. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung wurde die Konzentration der *in vitro* transkribierten RNA durch OD-Messung bestimmt.

5 x Inkubationspuffer:

200	mM	Tris-HCl, pH 7,5
30	mM	MgCl ₂
10	mM	Spermidin
50	mM	NaCl

4.3.16.1 BERECHNUNG DER ANZAHL DER RNA-MOLEKÜLE

CMP	323,2 g/mol	
GMP	363,2 g/mol	
AMP	347,2 g/mol	
UMP	324,2 g/mol	durchschnittliches Molekulargewicht der Nukleotide: 340 g/mol.

Für das Template des IL-9-Standards, das 680 Basen enthält, ergibt sich ein Molekulargewicht von $2,3 \times 10^5$ g/mol.

500 ng (5×10^{-7} g) des Templates wurden in die *in vitro* Transkription eingesetzt:

$$\begin{aligned}
 2,3 \times 10^5 \text{ g} &= 1 \text{ mol} \\
 5 \times 10^{-7} \text{ g} &= 2,2 \times 10^{-12} \text{ mol} \\
 1 \text{ mol} &= 6,023 \times 10^{23} \text{ Moleküle} \\
 2,2 \times 10^{-12} \text{ mol} &= 1,3 \times 10^{12} \text{ Moleküle pro } 20 \mu\text{l Ansatz} \\
 6,6 \times 10^{10} &\text{ RNA-Moleküle pro } 1 \mu\text{l Ansatz.}
 \end{aligned}$$

4.3.17 RNA-GELELEKTROPHORESE

Zur Auftrennung und Längenbestimmung von RNA-Molekülen müssen die intra- beziehungsweise intermolekulare Sekundärstrukturen aufgelöst werden. Dazu werden stark denaturierende Reagenzien wie Formamid, Formaldehyd, Harnstoff oder Glyoxal benutzt. Zur Kontrolle, ob während der *in vitro* Transkription eine mRNA definierter Größe synthetisiert wurde, erfolgte die Auftrennung von 1 μg RNA in einem 1,5%igen Agarosegel (50 ml Volumen) mit 1 x MOPS-Puffer und 8,5 ml 37%iges (w/w) Formalin. Zu 1 μl RNA-Probe wurden 8 μl FA/FA zugegeben und für 15 Minuten bei 65 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 μl RNA Laufpuffer schloß sich die elektrophoretische Auftrennung in 1 x MOPS-Puffer bei 150 V an. Die Elektrophoresekammer, die Gelträger und die Gelkämme wurden zur Zerstörung von RNasen für 2 Stunden mit 0,2%iger NaOH vorbehandelt.

FA/FA:

12,5	μl	deionisiertes Formamid
4	μl	Formalin
2,5	μl	10 x MOPS
4	μl	DEPC-Wasser

10 x MOPS-Puffer:

0,1	M	Na-Acetat, pH 7,0
0,4	M	MOPS
20	mM	EDTA

RNA-Laufpuffer:

50	%	Glycerin
1	mM	EDTA (pH 8,0)
0,25	%	Bromphenolblau
0,25	%	Xylen Cyanol

4.3.18 DUCHFÜHRUNG DER QUANTITATIVEN PCR

Nach der reversen Transkription liegen die RNA Moleküle des Standards und die zelluläre RNA als cDNA vor. Die cDNA-Konzentrationen wurden nicht bestimmt, sondern es wurde bei jeder Quantifizierung von der jeweils eingesetzten RNA-Konzentration ausgegangen. Da es sich bei der quantitativen RT-PCR immer um einen Vergleich von cDNA aus zwei verschiedenen Quellen handelt, nämlich einerseits der aus zellulärer mRNA und andererseits der aus Standard Poly(A)⁺RNA transkribierten cDNA, muß gewährleistet sein, daß die Transkriptionseffizienz für beide cDNA dieselbe ist. Dieses wurde experimentell bestätigt und aus diesem Grund wurde auf eine parallele cDNA Synthese verzichtet (siehe Kapitel 5.1.5). Die cDNA der *in vitro* transkribierten Poly(A)⁺RNA des internen Standards wurde in absteigender Konzentration in einer Reihe von PCR Ansätzen eingesetzt. Jeder dieser Ansätze wurde mit konstanten Mengen der zellulären cDNA coamplifiziert (Abbildung 7).

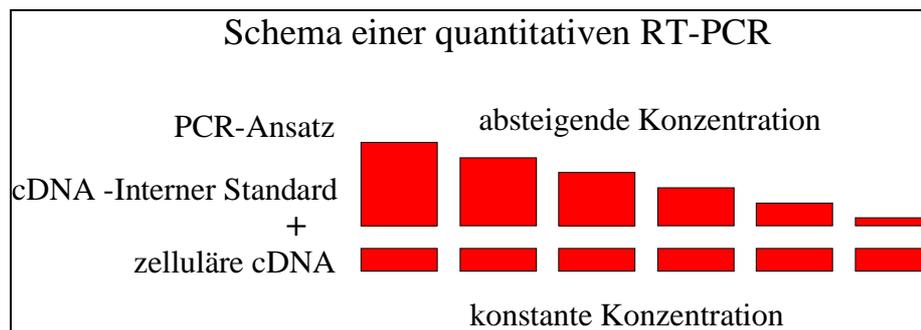


Abbildung 7: Schema der quantitativen RT-PCR: In parallelen Ansätzen wurden die cDNA des internen Standards und die cDNA der zellulären RNA coamplifiziert. Dabei blieb die eingesetzte Konzentration der zellulären cDNA immer konstant. Die Anzahl der cDNA-Moleküle des internen Standards verringerte sich sukzessive.

Die zwei entstandenen PCR-Produkte konnten anhand der unterschiedlichen Größen der Amplifikate im Agarosegel unterschieden und ausgewertet werden (Tabelle 1).

	Größe der PCR-Produkte der Cytokin-mRNA (Bp)	Größe der PCR-Produkte der internen Standards (Bp)	Korrekturfaktor: Interner Standard / Cytokin-mRNA
IL-9	351	604	1,7
IL-4	356	605	1,7
IL-5	268	605	2,2
IL-2	250	627	2,5
IFN- γ	492	627	1,3

Tabelle 1: Größen der PCR-Produkte der Cytokin mRNA und der internen Standards. Der Korrekturfaktor gibt die Größe an, um die bei der Quantifizierung die Intensität des kleineren PCR-Produktes korrigiert werden muß.

4.3.19 AUSWERTUNG DER MENGE AN PCR PRODUKTEN

Die Zunahme der Amplifikationsprodukte verläuft nur in einer bestimmten Anzahl von Zyklen exponentiell, bevor die Amplifikationsrate gegen ein Plateau strebt. In der späten Phase der Amplifikationen ist die Quantität der PCR-Produkte nicht mehr proportional zur Ausgangsmenge. Da die Ausgangskonzentration durch Extrapolation zwischen zwei Banden ermittelt wird, muß die Quantifizierung der PCR-Produkte in der exponentiellen Phase der Amplifikation erfolgen.

Um diesen Bereich festzulegen, wurden PCR-Ansätze mit verschiedenen cDNA- und damit respektive RNA-Konzentrationen untersucht. Grundsätzlich wurde so verfahren, daß die zelluläre cDNA zunächst so weit verdünnt wurde, daß die Reihe der kompetierenden Standardkonzentrationen zwischen 3300 und 66 Molekülen lag. Nach Abstimmung des Auswertungsbereiches, d. h. wenn die Fluoreszenzintensitäten der zwei PCR-Produkte im vergleichbaren Bereich lagen, wurde die eigentliche Quantifizierung durchgeführt.

Je 10 μ l der PCR-Produkte wurden auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen, getrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt, um die DNA im UV-Licht sichtbar zu machen. Eine

CCD-Kamera (Cybertech CS-1) mit einer angeschlossenen Aufnahmeeinheit speicherte die Daten, so daß die Auswertung anschließend mit einer entsprechenden Wincam-Software durchgeführt werden konnte. Die quantitative Auswertung der PCR-Produkte erfolgte durch Intensitätsmessung der Banden. Die integrierten Fluoreszenzintensitäten jeder Bande wurden als Flächen ausgedrückt und in Prozent der größten Fläche einer Meßreihe (Area%) angegeben.

Die Ausrechnung der absoluten Zahl von Molekülen einer Cytokin-mRNA beruht auf folgenden Überlegungen: Die Emission von Fluoreszenz ethidiumbromidgefärbter Banden ist unter der Annahme eines konstanten Basenverhältnisses proportional zu der gewichtsbezogenen DNA-Menge der PCR-Produkte. Da es sich bei der kompetitiven PCR um eine Konkurrenz zweier verschiedener Templates um die Primerbindung handelt, müssen die Reaktionsprodukte auf molarer Ebene miteinander verglichen werden. Das Fluoreszenzsignal des kleineren der beiden Konkurrenten muß deshalb zunächst mit dem in Tabelle 1 angegebenen Korrekturfaktor multipliziert werden, um äquimolare Bedingungen zu schaffen. Hat das PCR-Produkt des Standards beispielsweise eine Größe von 600 Bp und dasjenige der Cytokin-cDNA von 350 Bp, muß zur Umrechnung von gewichtsbezogenen in molare Mengen die Fluoreszenz der kleineren Bande mit dem Faktor 650/350 multipliziert werden (Piatak et al., 1993). Dadurch erhält man ein Verhältnis (Ratio) der molaren Mengen:

$$\text{Ratio} = \text{Area\% Interner Standard} / \text{Area\%} \times \text{Korrekturfaktor der cDNA}$$

Zwei PCR-Produkte mit einer Ratio von 1 sind unter dem Gesichtspunkt der Primerkonkurrenz äquivalent. Rechnerisch läßt sich mit Hilfe der vorhandenen Meßdaten der Ablauf so gestalten, daß man eine Ratio von 1 als Äquivalenzpunkt definiert, wobei die Fluoreszenzemissionen an diesem Punkt ungleich 1 sind, da sich die Größen der beiden zu vergleichenden PCR-Produkte unterscheiden. Durch Interpolation zwischen zwei Meßreihen kann die äquivalente gewichtsbezogene Menge an spezifischer zellulärer Cytokin-

mRNA berechnet werden, die mit einer vorgegebenen Menge an Standardmolekülen äquivalent ist:

Beispiel:

Ratio = 1 bei Einsatz von 660 Standard Molekülen und 0,05 µg zellulärer cDNA

entspricht: $660 \times (1/0,05 \mu\text{g}) = 13.200$ Cytokin-mRNA Moleküle/µg zellulärer RNA

Zur Problematik einer exakten Quantifizierung zellulärer mRNA wird ausführlich im Diskussionsteil Stellung genommen.

4.4 ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Da zur Durchführung des Nachweises für das IL-9 lediglich ein einziges IL-9-spezifisches-Antiserum zur Verfügung stand, der sowohl gebunden an die Platte als auch als sekundärer Antikörper verwendet wurde, wurde an den zweiten IL-9-Antikörper das Co-Enzym Biotin gebunden. Die Bindung von Biotin an den Antikörper wurde durch Biotinyl-N-Hydroxysuccinimid erreicht. Streptavidin kann im Anschluß an die Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes an das Biotin binden. Die Affinität des Streptavidins zu Biotin ist sehr hoch, ein Streptavidin Molekül bindet vier Moleküle Biotin.

Der IL-9-ELISA wurde nach dem Sandwich-System durchgeführt (Abbildung 8). Das Antigen wurde nicht direkt an die feste Phase gebunden, sondern mit Hilfe von vorher an die feste Phase gebundenen polyklonalen IL-9-Antikörpern. Das spezifisch gebundene IL-9 wurde über den biotinmarkierten IL-9-Antikörper und eine anschließende Bindung von Streptavidin-Peroxidase an das Biotin nachgewiesen. Dieser Nachweis erfolgte durch eine spezifische Farbreaktion. Dabei reagierte das Enzym mit o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid (OPD). Die Umsetzung von OPD durch das Enzym Meerrettichperoxidase ergab ein gefärbtes Produkt, das sich bei 405 nm nachweisen ließ.

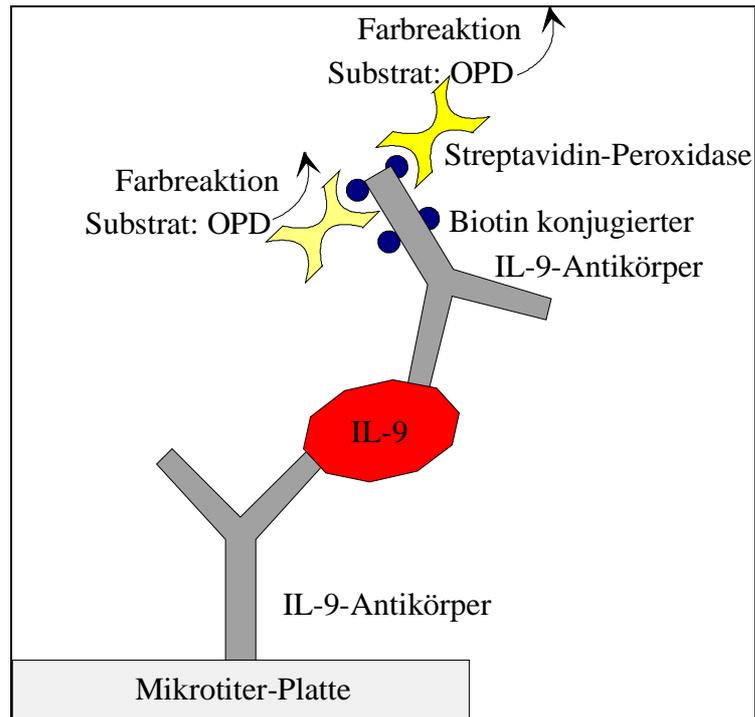


Abbildung 8: Sandwich-ELISA zum Nachweis von IL-9: Biotin-Streptavidin-System.

Beschichten der MaxiSorb Platten:

Der polyklonale IL-9-Antikörper wurde auf 10 µg/ml eingestellt. Je Vertiefung wurden 50 µl dieser Lösung eingebracht. Die Bindung an die feste Phase erfolgte über Nacht bei 4 °C. Waschen der Platte mit PBS.

Blockierung freier Bindungsstellen :

Zur Sättigung nicht besetzter Bindungsstellen der Festphase wurde die Platte mit einer konzentrierten Proteinlösung (1% Magermilchpulver in PBS) 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. - 2maliges Waschen der Platte mit PBS.

Einbringen der Zellkulturüberstände:

Die Zellkulturüberstände wurden unverdünnt eingesetzt. Als positive Kontrolle diente rh IL-9 in absteigender Konzentration (50 ng, 10 ng, 5 ng, 2 ng und 0,1 ng pro ml PBS). Als negative Kontrolle diente RPMI-Medium. Pro Vertiefung wurden 300 µl eingebracht und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. - Entfernen der nicht gebundenen Proteine durch 2maliges Waschen mit PBS.

Bindung des biotinylierten IL-9-Antikörpers:

Der biotinylierte polyklonale IL-9-Antikörper wurde auf 10 µg/ml in 1%iger Magermilchlösung eingestellt. Je Vertiefung wurden 50 µl dieser Lösung eingebracht. Die Bindung an das Antigen erfolgte bei Raumtemperatur (45 Minuten). - Waschen der Platte mit PBS.

Nachweis des gebundenen biotinylierten α IL-9-Antikörpers:

Zugabe von 50 µl Streptavidin-Peroxidase in einer Verdünnung von 1:2.000, Bindung an das Biotin bei 4 °C für 45 Minuten. 4maliges Waschen der Platte mit PBS.

Enzymreaktion mit OPD:

Die Peroxidase-katalysierte Umsetzung des Substrates OPD erfolgt in einer relativ kurzen linearen Kinetik, d.h. bereits nach 10-15 Minuten erreicht die Substratumsetzung ein Plateau.

Substratlösung:

		Substrattablette OPD
10	ml	Substatpuffer
5	µl	H ₂ O ₂

Ablesen der Reaktion im ELISA-Reader bei 405 nm (Nachweisgrenze ≤ 2 ng IL-9).

5 ERGEBNISSE

5.1 INTERNER STANDARD

5.1.1 KONSTRUKTION INTERNER STANDARDS

Zur Quantifizierung der Cytokin mRNA wurden, wie in Kapitel 4.3.10 beschrieben, drei verschiedene Standards konstruiert. Diese Standards enthalten Primer-Sequenzen für verschiedene humane Cytokingene:

Standard I: IL-9 und IL-10.

Standard II: IL-1, IL-2 und IFN- γ

Standard III: IL-4 und IL-5.

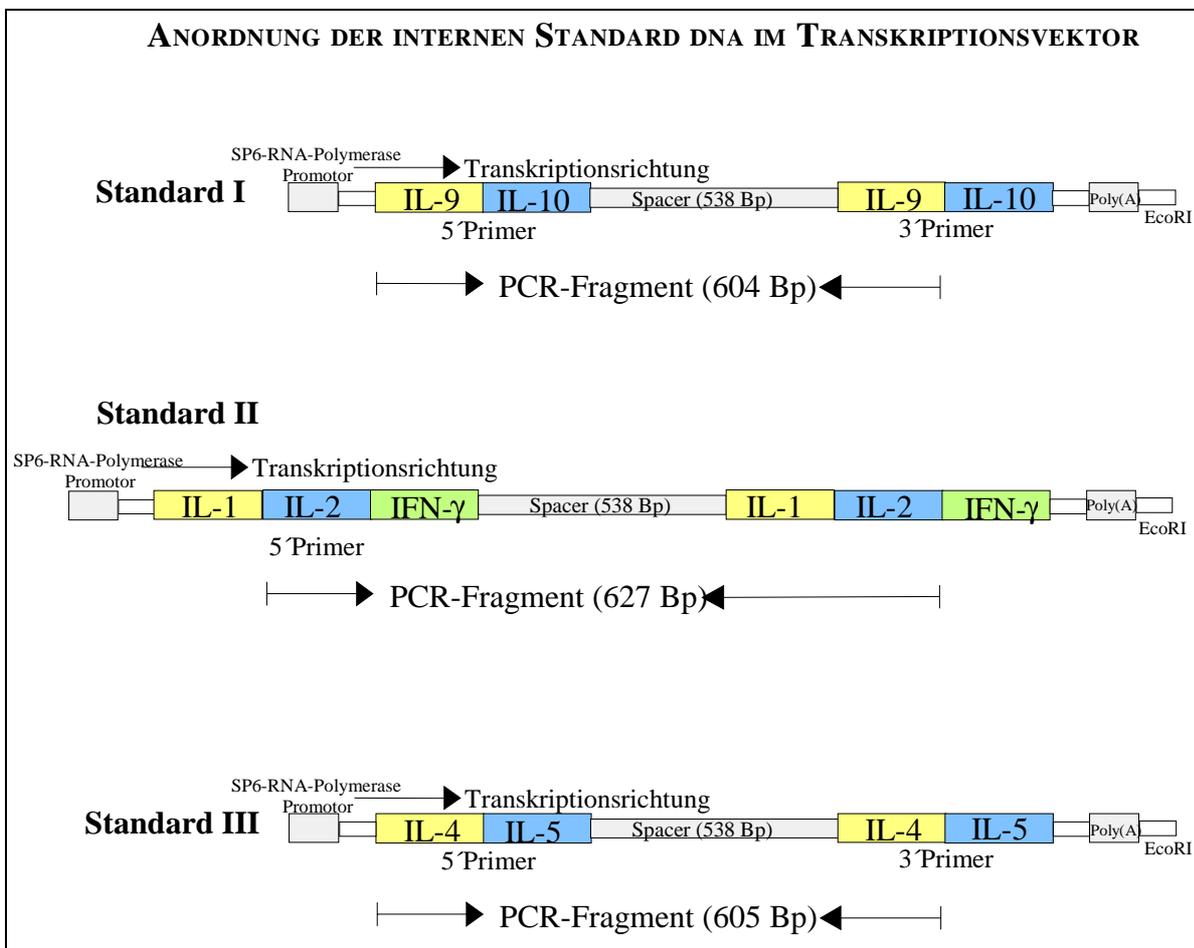


Abbildung 9: Struktur der internen Standards: Die Standards enthalten 5' und 3' Primersequenzen in der gleichen Reihenfolge, ein Spacer Fragment und Restriktionsstellen. Die Standards wurden in den pSP64 Poly(A)-Vektor kloniert. Die cytokinspezifischen Primer werden 5' von einem SP6 RNA-Polymerase-Promotor und 3' von einer Poly(A)-Sequenz flankiert. Diese Sequenz ermöglicht die *in vitro* Synthese einer Poly(A)⁺-RNA als Standard für die RT-PCR.

5.1.2 IDENTIFIZIERUNG DER STANDARDS

Von je ca. 20 Plasmidpräparationen der drei Standards wurden Restriktionsanalysen durchgeführt. Wenn Klone identifiziert werden konnten, deren Insertionen der erwarteten Größe entsprachen, wurden diese Klone mittels PCR charakterisiert. Die DNA, die sich mit den verschiedenen Primerkombinationen amplifizieren ließen, konnten als potentiell korrekte Konstrukte angesehen werden. Klon Nr. 12 des Internen Standards I, Nr. 20 des internen Standards II, Nr. 5 des Standards III wurden sequenziert. Die Sequenzen für die Klone II/20 und III/5 weisen keinen Fehler auf, in der Sequenz des Klons Nr. I/12 konnte ein Mismatch nachgewiesen werden. Dieser Klon konnte für Quantifizierungen der IL-9-mRNA allerdings ohne Einschränkungen benutzt werden, da sich dieser Fehler im Bereich der Primersequenz für IL-10 befindet und eine Quantifizierung von IL-10 innerhalb dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde.

In allen Experimenten zur Quantifizierung der entsprechenden Cytokin-mRNA wurden ausschließlich diese drei Standards verwendet.

5.1.3 QUALITÄTSKONTROLLE DER RNA DER STANDARDS

Die *in vitro* Transkription der linearisierten Vektoren ergab 3,6, 3,7 und 5,5 µg Poly(A)⁺RNA mit einer Ratio von 1,7, 1,8 und 1,8 für die korrespondierenden Standards I, II und III.

Im Anschluß an die *in vitro* Transkription der Standards wurden 1 µg RNA in einem Formalingel aufgetrennt. Es ergaben sich für die *in vitro* Transkripte definierte Banden der erwarteten Größe.

5.1.4 QUANTIFIZIERUNG DER PCR-PRODUKTE

Beispiel einer quantitativen PCR für den Nachweis von IL-9 Transkripten:

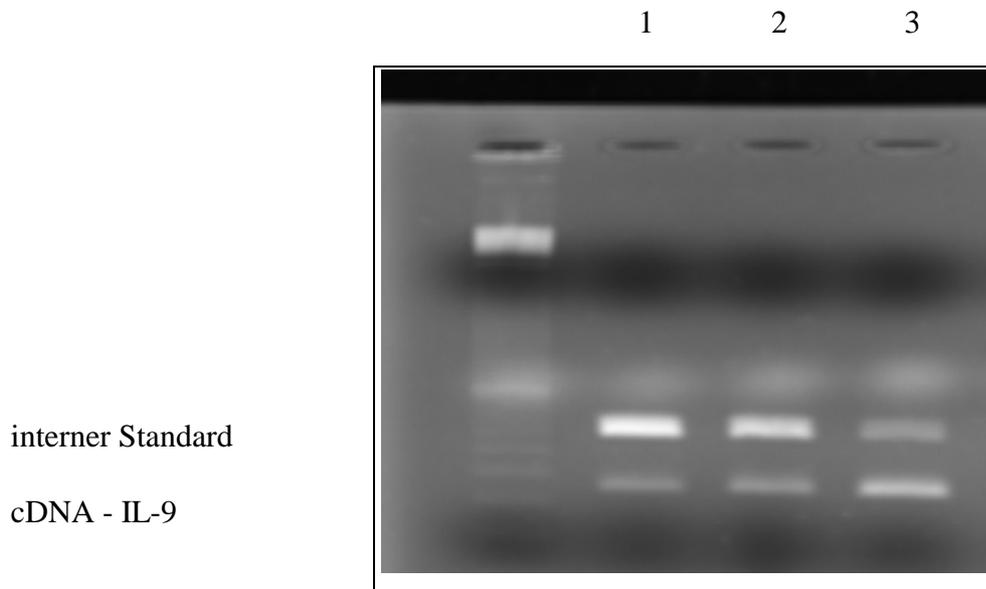


Abbildung 10: Zu einer absteigenden Menge an Standard-cDNA, aus 660, 330 beziehungsweise 66 revers transkribierten RNA-Molekülen, wurde eine konstante Menge (0,01µg RNA) an zellulärer cDNA zugegeben. Diese zelluläre cDNA stammt aus PBMC eines gesunden Probanden, die über 4 Stunden *in vitro* mit PHA stimuliert wurden.

Bahn 1: PCR-Produkte der 660 Standard-RNA-Moleküle (604 Bp) und unten das PCR-Produkt der IL-9 cDNA (0,01µg). Bahn 2: PCR-Produkte der 330 Standard-RNA-Moleküle (604 Bp) und unten das PCR-Produkt der IL-9 cDNA (0,01µg). Bahn 3: PCR-Produkte der 66 Standard-RNA-Moleküle (604 Bp) und unten das PCR-Produkt der IL-9 cDNA (0,01µg).

Auswertung des oben gezeigten Gels:

	Bahn 1	Bahn 2	Bahn 3
Anzahl der eingesetzten RNA-Standard-Moleküle	660	330	66
cDNA für den Nachweis von IL-9 Transkripten (µg RNA)	0,01µg	0,01µg	0,01g

Verhältnis Standard / IL-9 Transkript	82,58% /	69,17% /	32,57% /
Area(%) Standard / (Area(%) IL-9 Transkript x 1,7)	(17,42% x 1,7) = 2,79	(30,83% x 1,7) = 1,32	(7,43% x 1,7) = 0,28
Verhältnis bei eingesetzten Molekülen	2,79 = 660	1,32 = 330	0,28 = 66
Äquivalenz (Verhältnis gleich 1)	1,00 = 236,56	1,00 = 250	1,00 = 236
IL-9 RNA-Moleküle für die eingesetzten 0,01µg	236,56 x 0,01 2,3656	250 x 0,01 2,5000	236 x 0,01 2,3600
pro 1µg Gesamt RNA	23656	25000	23600

Durchschnitt: IL-9 RNA-Moleküle 24085,33
pro µg Gesamt RNA

Nach der Auswertung ergaben sich durch den Vergleich der IL-9 PCR-Produkte mit jeweils der bekannten Anzahl der eingesetzten Poly(A)⁺RNA-Moleküle des Internen Standards in diesem Beispiel $2,4 \times 10^4$ IL-9 mRNA-Moleküle/µg Gesamt-RNA. Es handelt sich hier um PBMC eines Normalprobanden nach 4stündiger mitogener *in vitro* Stimulation mit PHA.

5.1.5 KONTROLLE DER EFFIZIENZ DER REVERSEN TRANSKRIPTION

Um den Einfluß variierender Effizienzen bei der reversen Transkription ausschließen zu können, wurden im ersten Ansatz RNA-Standard-Moleküle zusammen mit der RNA aus PBMC revers transkribiert und anschließend in der PCR coamplifiziert. In einem zweiten parallelen Ansatz wurden die cDNA des Standards und die cDNA der PBMC erst im Anschluß an die separat durchgeführte reverse Transkription im PCR-Ansatz zusammengeführt und coamplifiziert. Beide Ansätze wurden nach Durchführung der PCR quantifiziert.

	Reverse Transkription	
	gemeinsamer Ansatz	getrennte Ansätze
IL-9-mRNA-Moleküle/ µg Gesamt-RNA	2000	2000

Abbildung 11: Quantifizierung der IL-9-mRNA-Expression in unstimulierten PBMC

Die Resultate zeigen identische Werte für die beiden unterschiedlichen Strategien. Die Methode der gemeinsamen reversen Transkription ist sehr aufwendig, da erhebliche Vorversuche notwendig sind, um die richtigen RNA-Konzentrationen des Standards und der zu untersuchenden RNA festzulegen, die eine spätere Quantifizierung überhaupt möglich machen. Da dieses Vorgehen keine verbesserte Quantifizierung ergab, und da keine Effizienzunterschiede nachgewiesen werden konnten, wurde auf dieses zeitaufwendige und materialintensive Verfahren verzichtet. Alle folgenden Quantifizierungen wurden mit separat revers transkribierter RNA des Standards und der zu untersuchenden RNA durchgeführt.

5.2 EXPRESSION UNTER NORMALEN UND PATHOLOGISCHEN BEDINGUNGEN

5.2.1 KINETIK DER mRNA-EXPRESSION VON IL-9

Mit der Technik der quantitativen PCR wurde die IL-9-Expression in mononukleären Zellen des peripheren Blutes normaler Probanden bestimmt. IL-9 wurde beim gesunden Menschen in unstimulierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes nahezu nicht exprimiert. Bei normalen Probanden ergaben sich ohne eine Stimulation Werte von lediglich 2000 IL-9-mRNA-Molekülen/µg Gesamt-RNA. Nach mitogener Stimulation mit PHA *in vitro* stieg die IL-9-mRNA-Molekülzahl jedoch innerhalb von vier Stunden auf $6,2 \cdot 10^4$ Moleküle/µg Gesamt-RNA an und erreichte dann nach 28 Stunden einem Maximalwert von $4 \cdot 10^7$ IL-9-mRNA-Moleküle/µg Gesamt-RNA.

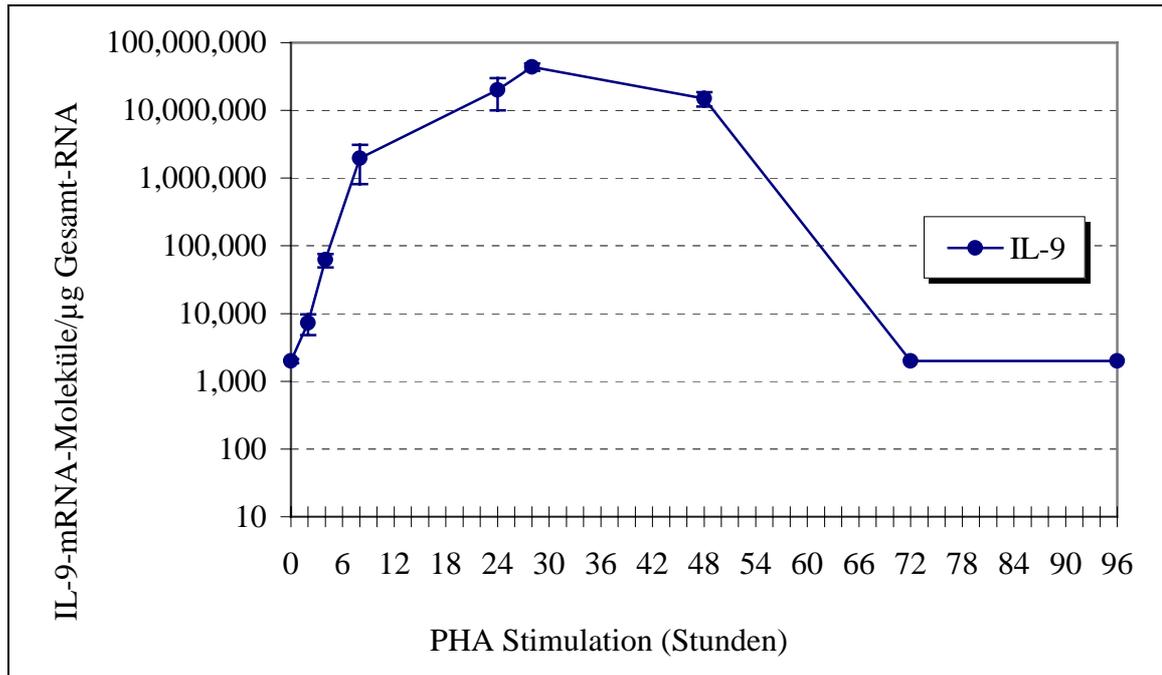


Abbildung 12: IL-9-mRNA-Expression nach PHA-Stimulation von PBMC bei Normalprobanden (n=5): Die Resultate sind in IL-9-mRNA-Moleküle/ μ g Gesamt-RNA bei verschiedenen Stimulationszeiten angegeben (Mittelwerte \pm Standardabweichung).

Eine andere Darstellungsweise der vorliegenden Ergebnisse zeigt die

Abbildung 13. Bei dieser Abbildungsform ist die Zeitachse der PHA-Stimulation nicht maßstabsgerecht, was bei den Ergebnissen entbehrlich erschien, bei denen das Hauptinteresse auf der Höhe der erreichten Molekülzahl einer Cytokin-mRNA/ μ g Gesamt-RNA liegt.

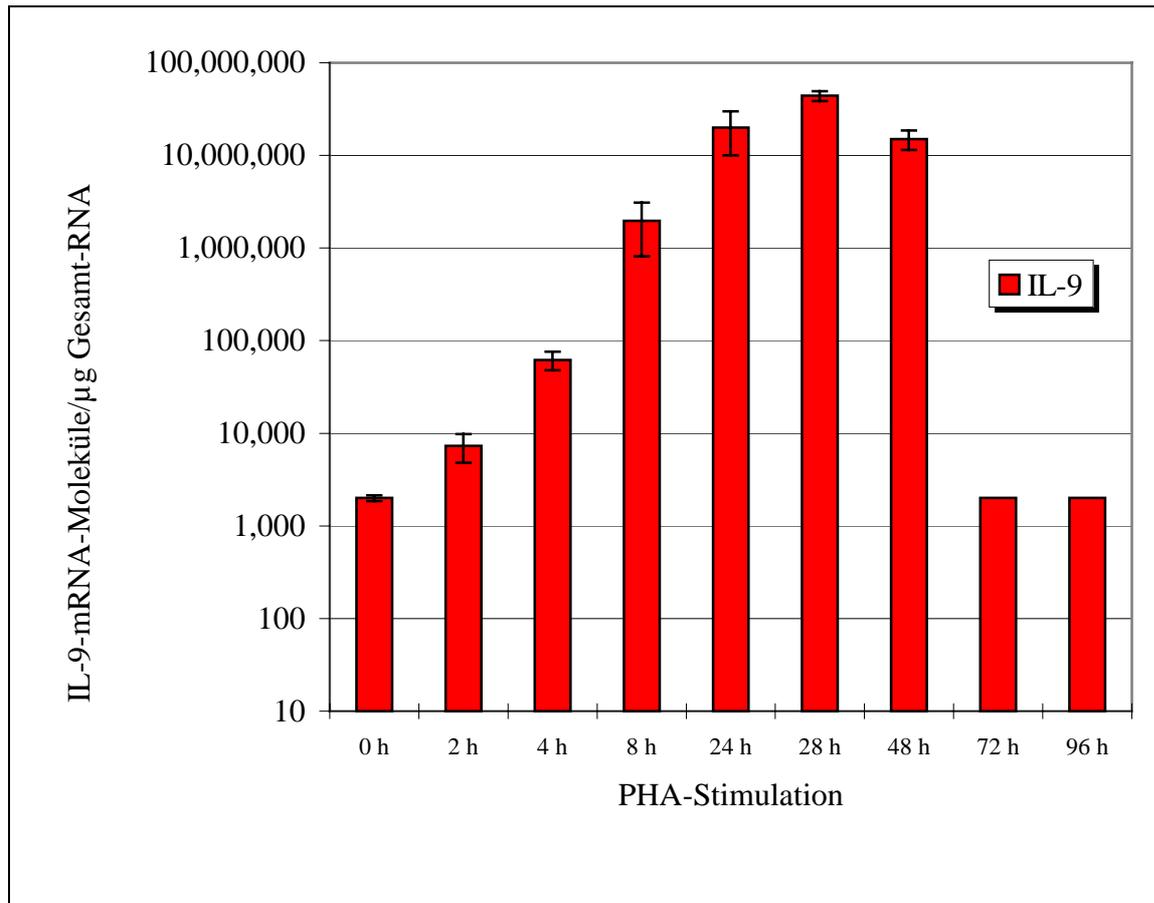


Abbildung 13: IL-9-mRNA-Expression nach PHA-Stimulation von PBMC bei Normalprobanden (n=5): Die Resultate sind in IL-9-mRNA-Moleküle/ μ g Gesamt-RNA bei verschiedenen Stimulationszeiten angegeben (Mittelwerte \pm Standardabweichung).

5.2.2 IL-9-EXPRESSION IN CD4⁺ T-ZELLEN

Unstimulierte PBMC normaler Probanden wurden wie in Kapitel 4.2.2.2 beschrieben, nach der Depletion von Monocyten, in CD4⁺ und CD4⁻-T-Zellen fraktioniert. Nach der Isolierung der RNA und reverser Transkription konnten mit Hilfe der PCR IL-9 und IL-9R mRNA in der CD4⁺ T-Zell-Fraktion eindeutig nachgewiesen werden. In CD4⁻ T-Zellen und Monocyten konnte nach 40 Zyklen PCR keine IL-9 respektive IL-9R mRNA detektiert werden.

PCR-Produkt	CD4 ⁺ -T-Zellen	CD4 ⁻ -T-Zellen	Monocyten
IL-9	+	-	-
IL-9R	+	-	-

Abbildung 14: IL-9 und IL-9R-mRNA-Expression in fraktionierten unstimulierten normalen PBMC. Je 50 ng Gesamt-RNA der entsprechenden Zellfraktionen wurden nach der cDNA-Synthese in die PCR eingesetzt und amplifiziert.

5.2.3 CYTOKINPROFIL BEI NORMALPROBANDEN

Im nächsten Schritt wurde die Expression der Cytokine IL-2, IFN- γ und IL-4 untersucht. Bei normalen Probanden wurden ohne Stimulation für IL-2 $3,4 \cdot 10^5$ mRNA-Moleküle und für IL-4 $1,6 \cdot 10^5$ mRNA-Moleküle pro μg Gesamt-RNA ermittelt. Diese Werte lagen deutlich höher als der Ausgangswert für IL-9. Nach bereits 8 Stunden erreichte die IL-9-Expression den Wert des IL-4. Weiterhin war die mRNA-Zunahme innerhalb von 24 Stunden bei keinem der untersuchten Cytokine so hoch wie bei IL-9. Für IL-9 ergab sich der Faktor 10.000, im Gegensatz zu Faktor 200, 100 und 60 bei IL-2, IFN- γ und IL-4.

Abbildung 15 zeigt den Vergleich der mRNA-Expression der verschiedenen Cytokine vor und nach mitogener *in vitro* Stimulation mit PHA.

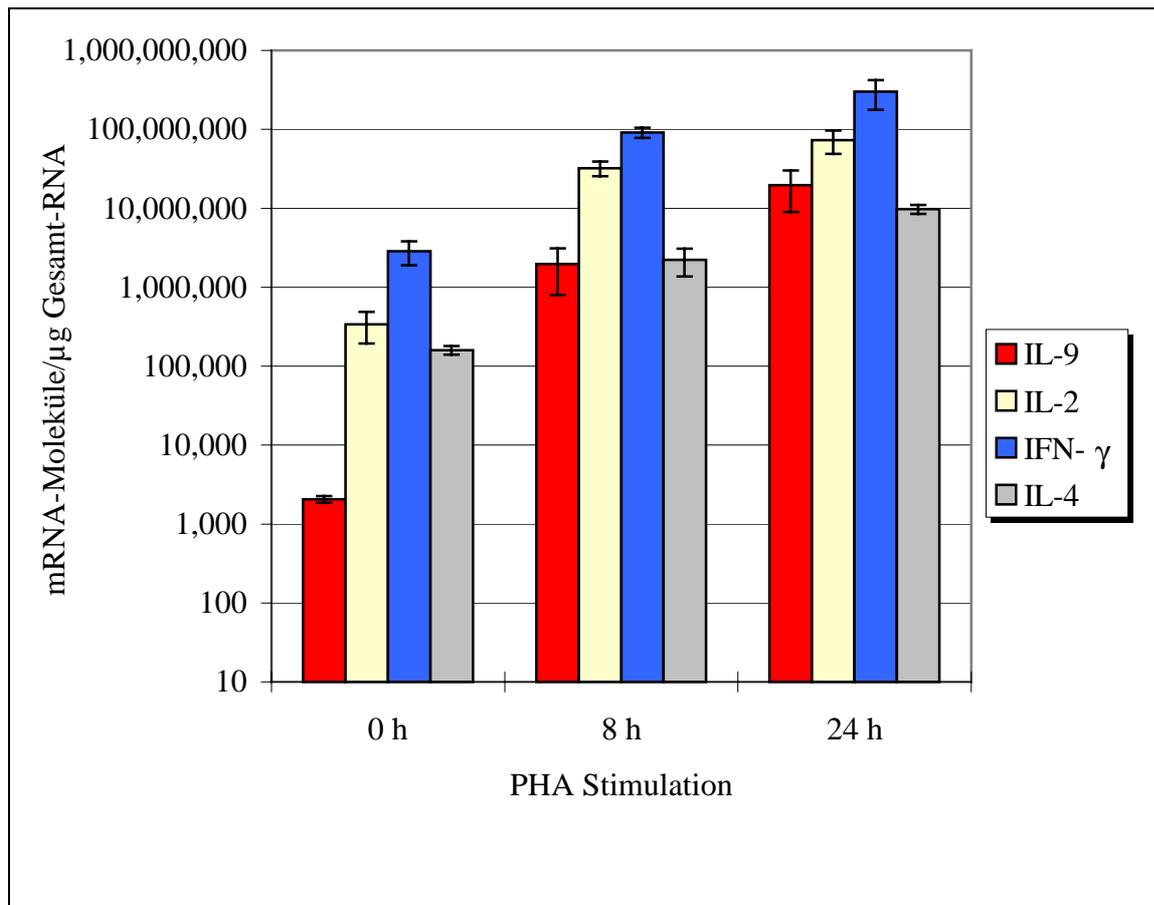


Abbildung 15: Vergleich der Cytokin-mRNA-Expression in PBMC nach Stimulation mit PHA bei Normalprobanden (n=5): Resultate sind in mRNA-Moleküle/ μ g Gesamt-RNA bei verschiedenen Stimulationszeiten angegeben (Mittelwerte \pm Standardabweichung).

5.2.4 KINETIK DER IL-9-mRNA-EXPRESSION BEI SPEZIFISCHER T-ZELL-STIMULATION

Um sicherzustellen, daß eine mitogene PHA Stimulation vergleichbare Cytokinexpression induziert wie eine spezifische T-Zellaktivierung durch die Liganden von CD2 und CD28, wurden eine T-Zell-spezifische Stimulation der PBMC eines Normalprobanden mit anti CD2/CD28 untersucht. In parallelen Ansätzen wurde die spezifische Stimulation im Gegensatz zur mitogenen Stimulation untersucht. Das folgende Ergebnis zeigt am Beispiel der IL-9-Genexpression, daß die Induktion der IL-9-mRNA-Moleküle bei Normalprobanden nicht von der Art des Stimulus abhängig war. Dieses Resultat bedeutet, daß die Cytokinexpression auch bei unterschiedlicher Stimulation zu vergleichbaren Ergebnissen führt. Daher wurde für die folgenden Untersuchungen durchweg PHA zur Stimulation verwendet.

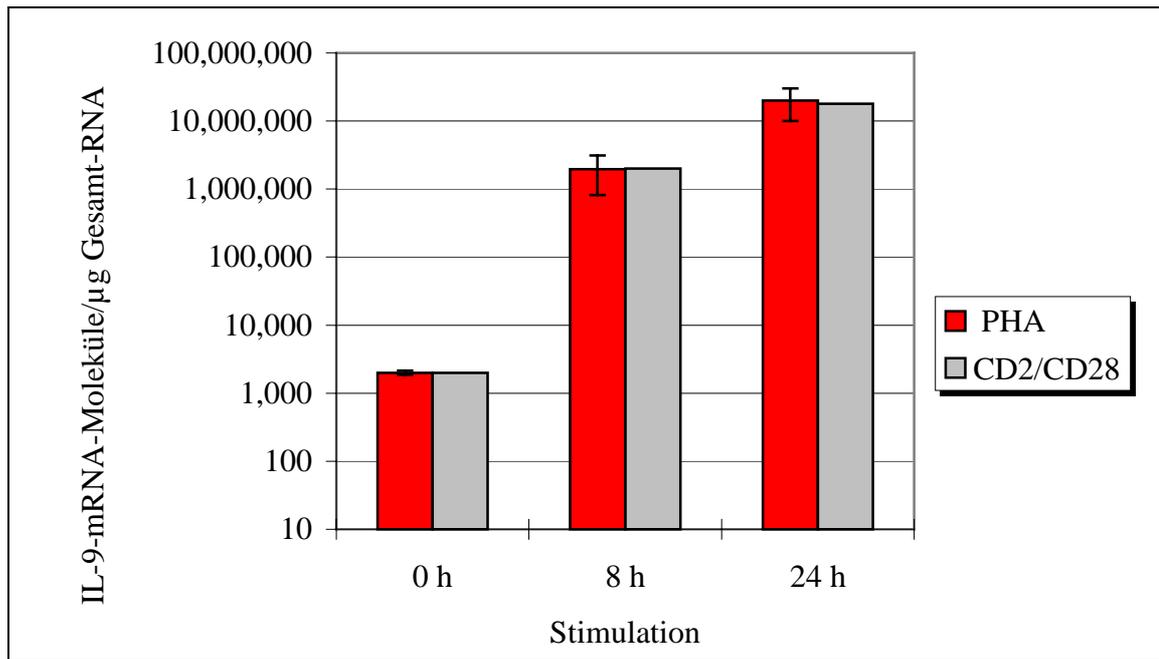


Abbildung 16: Kinetik der IL-9-Expression bei spezifischer und mitogener T-Zell-Stimulation: PBMC von Normalprobanden (n=5 bei PHA- bzw. 1 Proband bei CD2/CD28 Stimulation) wurden für 8 und 24 Stunden mit PHA beziehungsweise mit CD2 (50 µg/ml) und CD28 (50 µg/ml) Antikörpern stimuliert. Die Resultate sind in IL-9-mRNA-Moleküle/µg Gesamt-RNA angegeben (bei PHA Stimulation (n=5): Mittelwerte ± Standardabweichung bei PHA-Stimulation).

5.2.5 IL-9-EXPRESSION BEI PATIENTEN MIT AKUTEN ATOPISCHEN EKZEMEN

Es stellt sich hier die Frage, ob die zu erwartende Stimulation der Cytokinexpression auf solche Zellen beschränkt ist, die sich im Bereich der allergischen Reaktion befinden, oder ob systemisch zumindest die Zellen des peripheren Blutes ebenfalls betroffen sind. Als Modell wurden atopische Erkrankungen gewählt. Die Haut ist ein bevorzugtes Manifestationsorgan für allergische IgE-vermittelte Reaktionen. Daher wurde die IL-9-Expression der PBMC bei Patienten mit einem akuten endogenen atopischem Ekzem im Vergleich zu Normalpersonen auf RNA-Ebene untersucht. Endogen ausgelöste Hautreaktionen exprimieren einen T_{H2} -Phänotyp, wogegen Kontaktekzeme dem T_{H1} -Typ zugeordnet werden.

Es zeigte sich, daß im unstimulierten Zustand ein signifikanter Unterschied zwischen Normalpersonen und Patienten in der IL-9-Expression der PBMC zu finden war. Während bei Normalpersonen im unstimulierten Zustand lediglich 2000 IL-9-mRNA-Moleküle detektierbar waren, ergaben sich für Atopiker $5,3 \cdot 10^5$ IL-9-mRNA-Moleküle/µg Gesamt-

RNA. Ebenso nach verschiedenen Stimulationszeiten *in vitro* ergaben sich bis zu 40fach erhöhte IL-9-Expressionswerte bei den untersuchten Ekzempatienten.

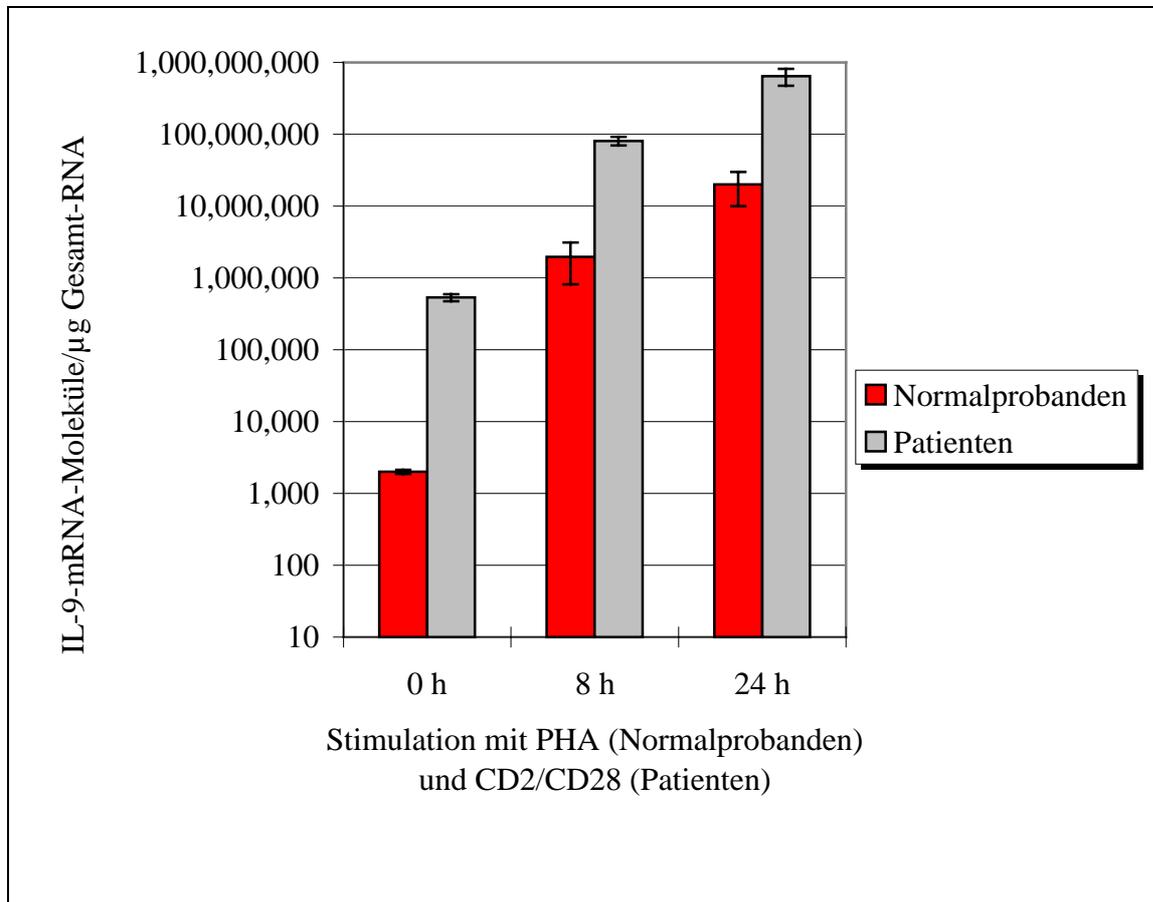


Abbildung 17: Vergleich der IL-9-mRNA-Expression bei Normalprobanden (n=5) und Ekzempatienten (n=3) bei verschiedenen Stimulationszeiten. Die Resultate sind in IL-9-mRNA-Moleküle/μg Gesamt-RNA angegeben (Mittelwerte ± Standardabweichung).

5.2.6 CYTOKINPROFIL BEI PATIENTEN MIT AKUTEN ATOPISCHEN EKZEMEN IM VERGLEICH ZU NORMALPROBANDEN

Nach diesen deutlichen Unterschieden in der IL-9-Expression von PBMC zwischen Gesunden und atopischen Patienten war zu fragen, ob IL-9 sich genauso verhält wie andere Cytokine oder eine Sonderstellung einnimmt. Die Untersuchungen wurden daher auf IL-2, IFN- γ und IL-4 ausgedehnt.

Bei dieser Analyse ergab sich bei den Atopikern im unstimulierten Stadium eine erhöhte Genexpression für IL-9, IL-4 und IL-2. Es zeigte sich, daß im unstimulierten Zustand

der größte Unterschied zwischen Normalpersonen und atopischen Patienten in der IL-9-Expression zu finden war. Die mRNA-Werte der Patienten für die IL-9-, IL-2- und IL-4 Expression lagen auch nach der Stimulation deutlich über dem Mittelwert der Normalprobanden.

Das Niveau der IFN- γ mRNA-Expression in den PBMC atopischer Patienten lag dagegen weder im unstimulierten Zustand noch nach PHA-Stimulation höher als bei den Kontrollprobanden. Die Stimulierbarkeit der mRNA der untersuchten Cytokingene in PBMC bei Atopikern verhielt sich analog zur derjenigen bei Normalprobanden. Auch hier war die Stimulierbarkeit der IL-9-Expression mit dem Faktor 1.200 am höchsten. Für IL-2, IFN- γ und IL-4 ergaben sich Werte von 800, 600 und 200.

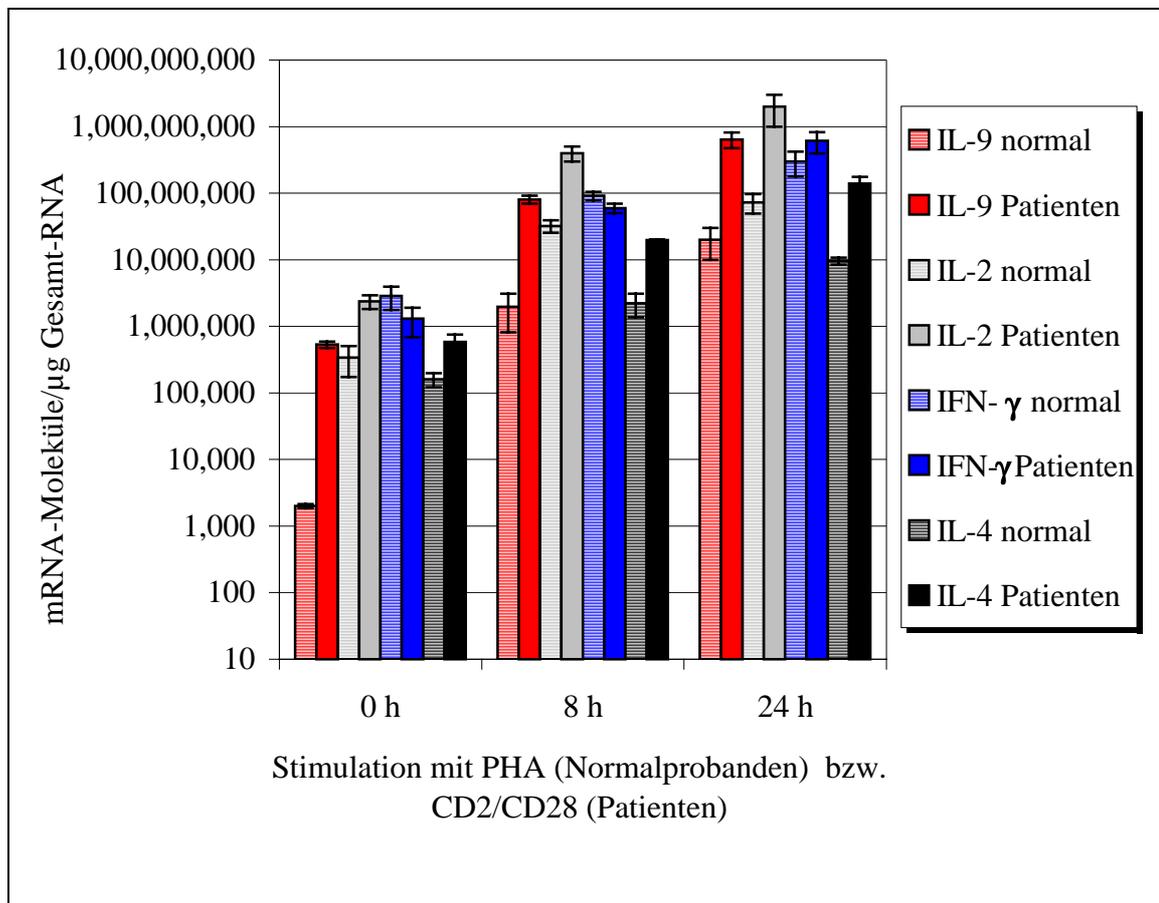


Abbildung 18: Vergleich der Cytokin mRNA-Expression (Mittelwerte \pm Standardabweichung) bei Normalprobanden (n=5) und atopischen Patienten (n=3) bei verschiedenen Stimulationszeiten. Die Resultate sind in mRNA-Moleküle/ μ g Gesamt-RNA angegeben. Die Ergebnisse der IL-9-mRNA-Expression entsprechen denen aus Abbildung 19.

5.2.7 PATIENTENSTUDIE

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. H. M. Jansen, Abteilung für Pulmonologie der Universität Amsterdam, wurde in einer Studie an 11 Patienten, die an Asthma bronchiale litten, die Cytokin mRNA-Expression systematisch untersucht. Die klinischen Daten dieser Patienten sind im Anhang aufgeführt. Asthma bronchiale ist eine vorwiegend anfallsweise auftretende Atemwegsobstruktion auf dem Boden einer chronischen, eosinophilenreichen, mit Abschilferung des Epithels einhergehenden Entzündung, die zur Hyperreaktivität führt (Britisch Thoracic Society, 1990). Bei den hier untersuchten Patienten lag ein allergisches Asthma mit IgE-vermittelter Sensibilisierung durch Hausstaubmilben (*Dermatophagoides pteronyssinus*) vor. Die Allergene der Milben sind gut charakterisiert und, obwohl sie Enzyme sind, weisen sie keine speziellen biochemischen Eigenschaften auf, die die bevorzugte Immunantwort vom IgE-Typ bei Atopikern erklären könnten. Allerdings reagieren Nichtatopiker gegen die gleichen Proteine mit IgG-Bildung (Thomas, 1994). Im Rahmen dieser Studie wurden die Patienten über einen längeren Zeitraum beobachtet, und es konnten PBMC vor und nach einer Immuntherapie isoliert werden. Im Verlaufe dieser Therapie werden die Patienten einer kontrollierten Exposition mit dem bekannten Allergen unterzogen. Bei einer Hausstaubmilbenallergie kann eine Immuntherapie gegen die Milbenallergene erfolgreich sein, vor allem, wenn die Symptome lediglich durch Hausstaubmilben ausgelöst werden und keine Polyallergie besteht (Bousquet et al., 1994).

Diese PBMC der zu untersuchenden Patienten wurden einer 24stündigen spezifischen Allergenstimulation mit Hausstaubmilbenantigenen, dem sog. Der-p-I-Antigen, einer 25 kD großen Cystein-Protease mit 80-100% IgE-Bindung, (Thomas, 1994), unterzogen. Ein paralleler Ansatz der Zellen wurde 24 Stunden ohne Stimulation inkubiert. Für die Cytokine IL-9, IL-4, IL-5 und IFN- γ wurde die Anzahl der mRNA-Moleküle vor und nach der Therapie bestimmt.

IL-9-Expression:

Bei der Auswertung der IL-9-mRNA-Molekülzahlen zeigte sich (Abbildung 19), daß die IL-9-mRNA-Expression sowohl vor, als auch nach der Immuntherapie durch Hausstaubmilbenantigene induziert werden konnte. In den unstimulierten PBMC konnte bei keinem der Patienten eine IL-9-mRNA nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Nach einer der 24stündigen spezifischen Stimulation ergaben sich mRNA-Werte, die bei 7 der 11 Patien-

ten nach der Immuntherapie gegenüber den Werten vor der Therapie deutlich vermindert waren. Bei den Patienten 7, 8, 9 und 10 wurde eine Hochregulation der IL-9-Genexpression nach der Therapie nachgewiesen. Patienten 7 und 8 waren die einzigen, bei denen durch die Desensibilisierung keine Verbesserung der Lungenfunktion in Antwort auf eine erneute Allergenexposition erreicht wurde, gemessen an dem Expirationsvolumen.

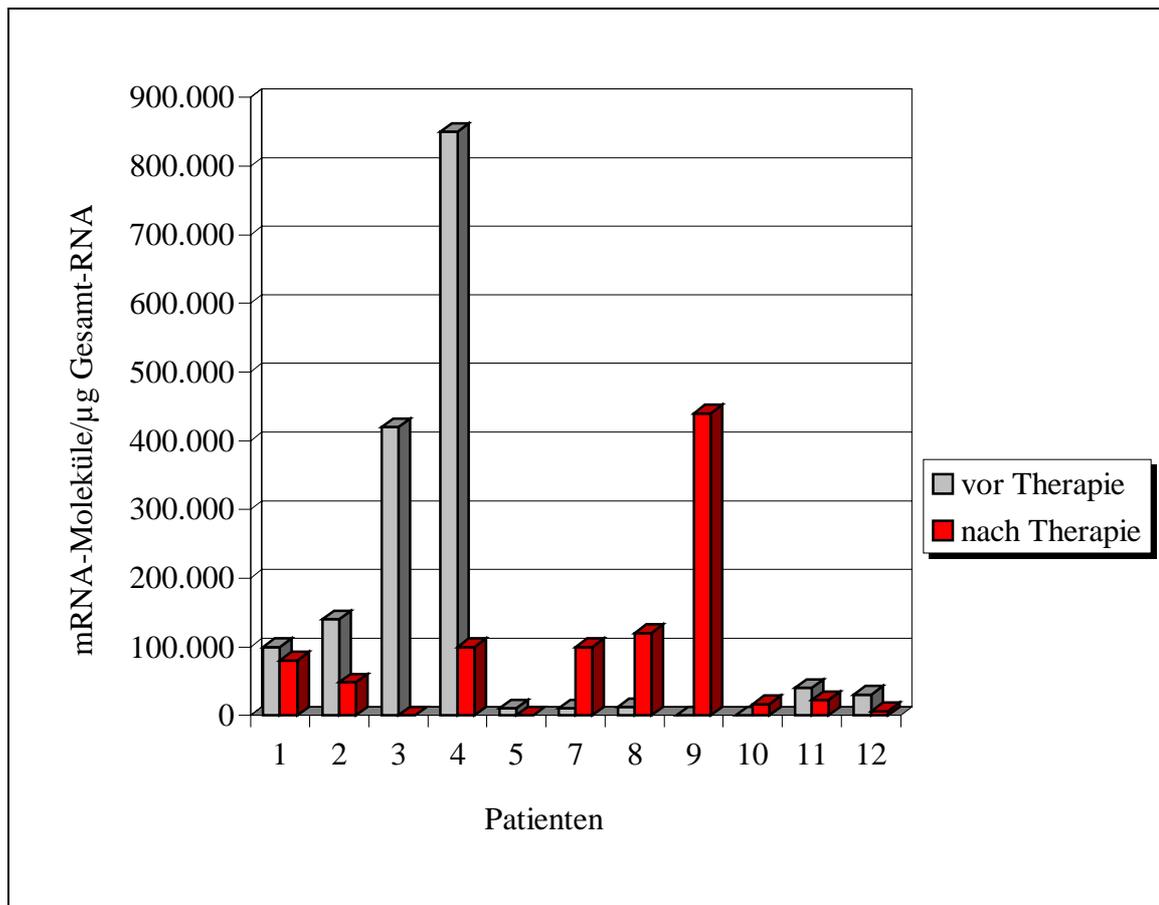


Abbildung 19: IL-9-Expression vor und nach Immuntherapie: Die PBMC wurden 24 Stunden mit Der-p-I stimuliert. Die Resultate sind in IL-9-mRNA-Moleküle/µg Gesamt-RNA angegeben.

IL-4-Expression:

Wie in Abbildung 20 dargestellt, konnte die IL-4-Expression sowohl vor, als auch nach der Immuntherapie durch Hausstaubmilbenantigene induziert werden. Es ergaben sich auch für die IL-4-Expression nach der 24stündigen spezifischen Stimulation mRNA-Werte, die bei 7 der 11 Patienten nach der Immuntherapie gegenüber den Werten vor der Therapie vermindert waren. Da die Veränderung der IL-4-mRNA-Expression vor und nach der Der-p-I-Stimulation gezeigt werden sollte, sind die gezeigten mRNA-Daten, Werte nach Abzug

der mRNA-Moleküle, die in den unstimulierten PBMC exprimiert wurden. Bei den Patienten 7, 8, 9 und 10 wurde, wie bei der IL-9-Expression, eine Hochregulation der IL-4-Produktion nach der Therapie nachgewiesen.

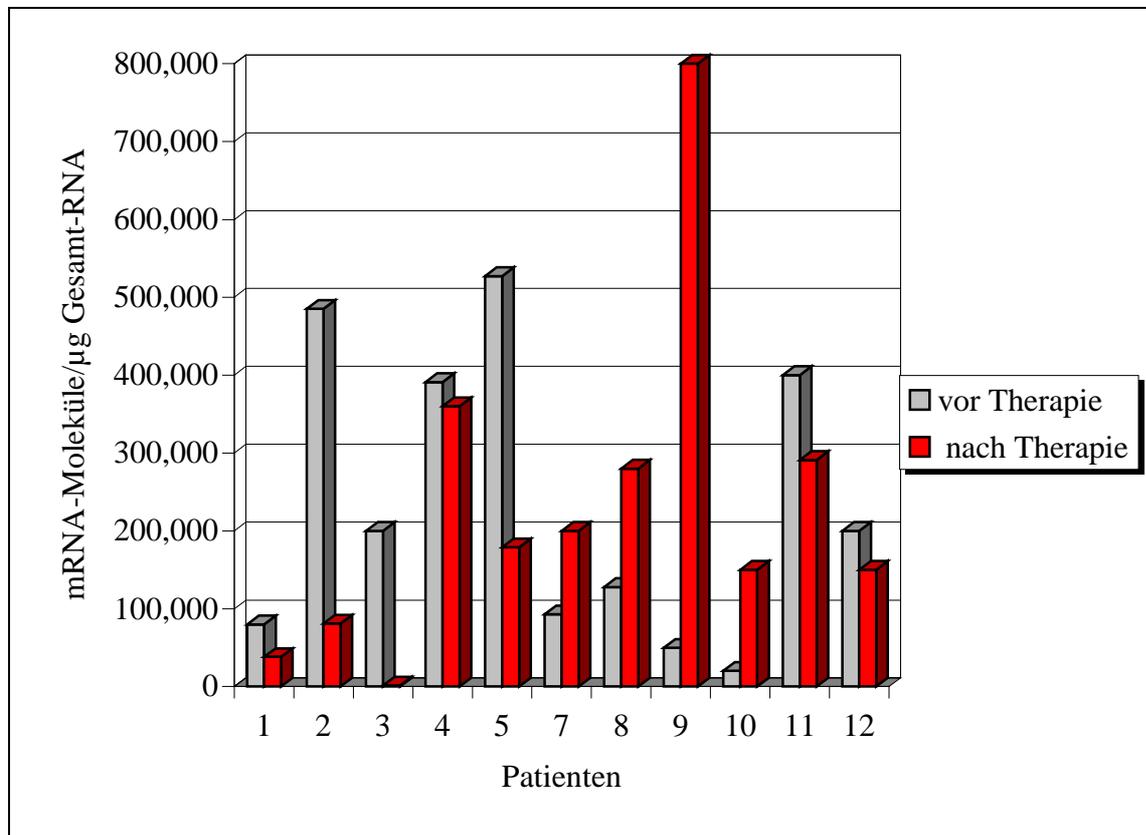


Abbildung 20. IL-4-Expression vor und nach Immuntherapie: Die PBMC wurden 24 Stunden mit Der-p-I stimuliert. Die Resultate sind in IL-4-mRNA-Moleküle/µg Gesamt-RNA angegeben.

IL-5-Expression:

Für die IL-5-Genexpression ergab sich ein ähnliches Resultat. Wie in Abbildung 21 dargestellt, konnte die IL-5-Expression ebenfalls sowohl vor, als auch nach der Therapie durch Hausstaubmilbenantigene induziert werden. Es ergaben sich für die IL-5-Expression nach der 24stündigen spezifischen Stimulation mRNA-Werte, die bei 5 der 11 Patienten nach der Immuntherapie gegenüber den Werten vor der Therapie vermindert waren. Die hier gezeigten mRNA-Daten sind Werte nach Der-p-I-Stimulation. IL-5-mRNA-Moleküle in unstimulierten PBMC konnten nicht nachgewiesen werden. Bei den Patienten 7, 9, 10 und 12 wurde eine Hochregulation der IL-5-Produktion nach der Therapie nachgewiesen. Bei den Patienten 8 und 11 waren die Expressionswerte so gut wie gleichgeblieben.

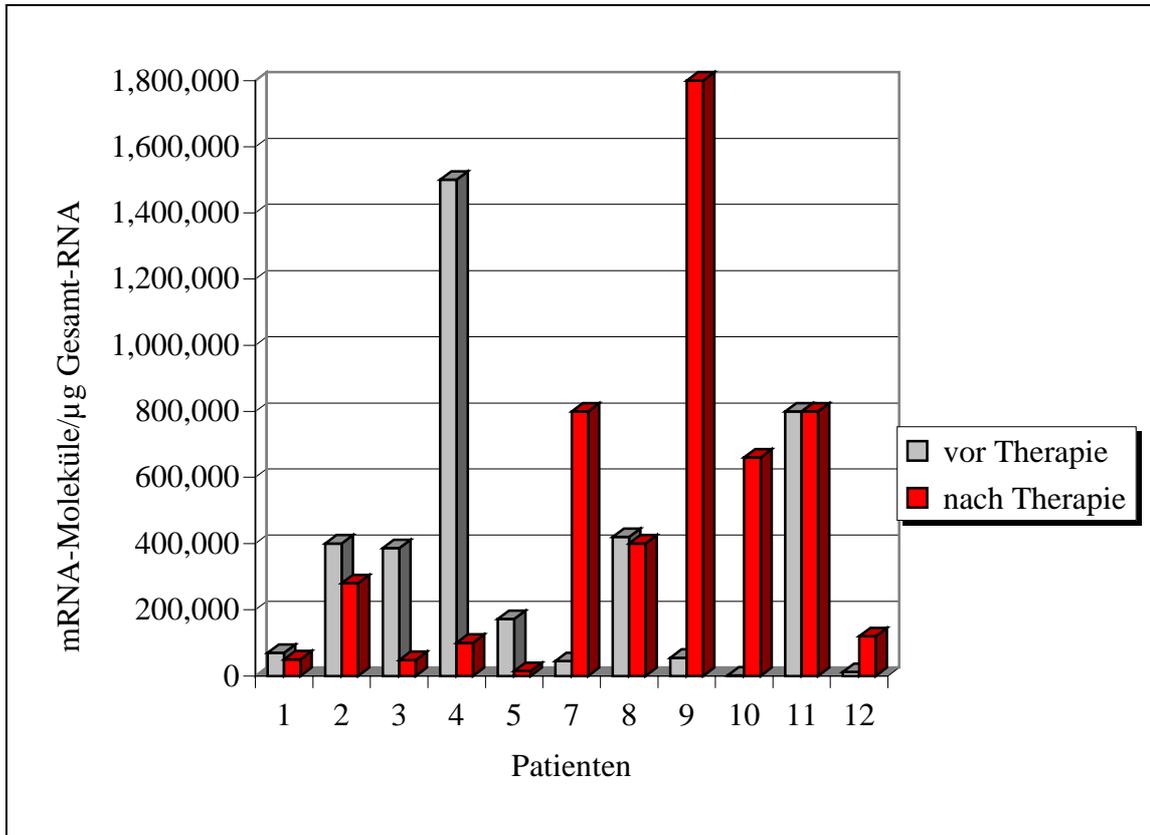


Abbildung 21: IL-5-Expression vor und nach Immuntherapie: Die PBMC der 11 Patienten wurden 24 Stunden mit Der-p-I stimuliert. Die Resultate sind in IL-5-mRNA-Moleküle/µg Gesamt-RNA angegeben.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß für die T_{H2} -Cytokine IL-4, IL-5 und IL-9 nach der Therapie bei 7 der 9 Patienten, bei denen durch die Immuntherapie eine Verbesserung des Expirationsvolumens nach einer Allergen-Exposition erreicht werden konnte, eine Verminderung der Induzierbarkeit der Genexpression stattgefunden hat.

IFN- γ -Expression:

Für die Veranschaulichung der IFN- γ -Genexpression wurde eine veränderte Darstellung gewählt (Abbildung 22), da hier die Expression der IFN- γ -mRNA mit und ohne eine spezifische Stimulation vor und nach Immuntherapie verglichen werden sollte. Vor der Immuntherapie war bei 10 der 11 Patienten keine Induzierbarkeit des IFN- γ -mRNA-Expression durch das Hausstaubmilbenantigen nachweisbar. Die Werte der IFN- γ -Genexpression waren nach Der-p-I-Stimulation bei diesen Patienten entweder gegenüber der unstimulier-

ten Expression deutlich vermindert oder gleichgeblieben. Beim Patient 8 konnte eine minimale Induzierbarkeit nachgewiesen werden.

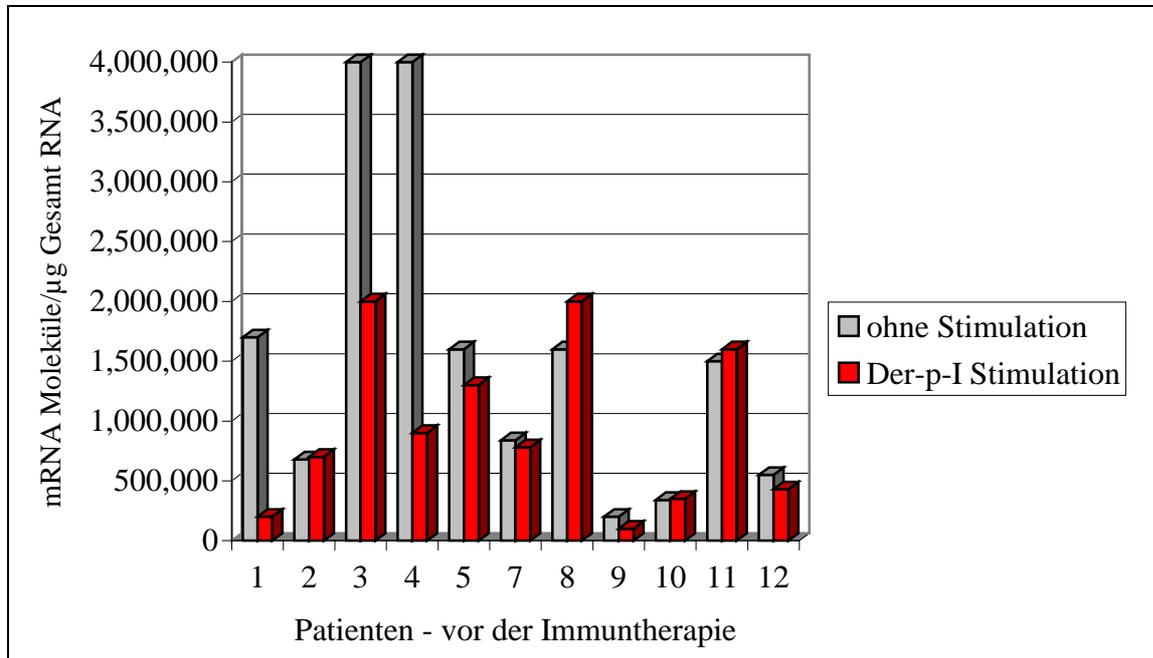


Abbildung 22: IFN- γ -Expression vor der Immuntherapie: Die PBMC der 11 Patienten wurden 24 Stunden ohne Stimulation oder mit Der-p-I inkubiert. Die Resultate sind in IFN- γ mRNA-Moleküle/ μ g Gesamt-RNA angegeben.

Die Abbildung 23 zeigt das Profil der Induzierbarkeit des IFN- γ mRNA nach der Immuntherapie. Von den 11 Patienten war die IFN- γ -Expression durch die Der-p-I-Stimulation bei 6 Patienten induzierbar und bei den Patienten 1 und 2 eher konstant. Bei den Patienten 3, 7 und 8 war dagegen keine IFN- γ Induktion nachweisbar.

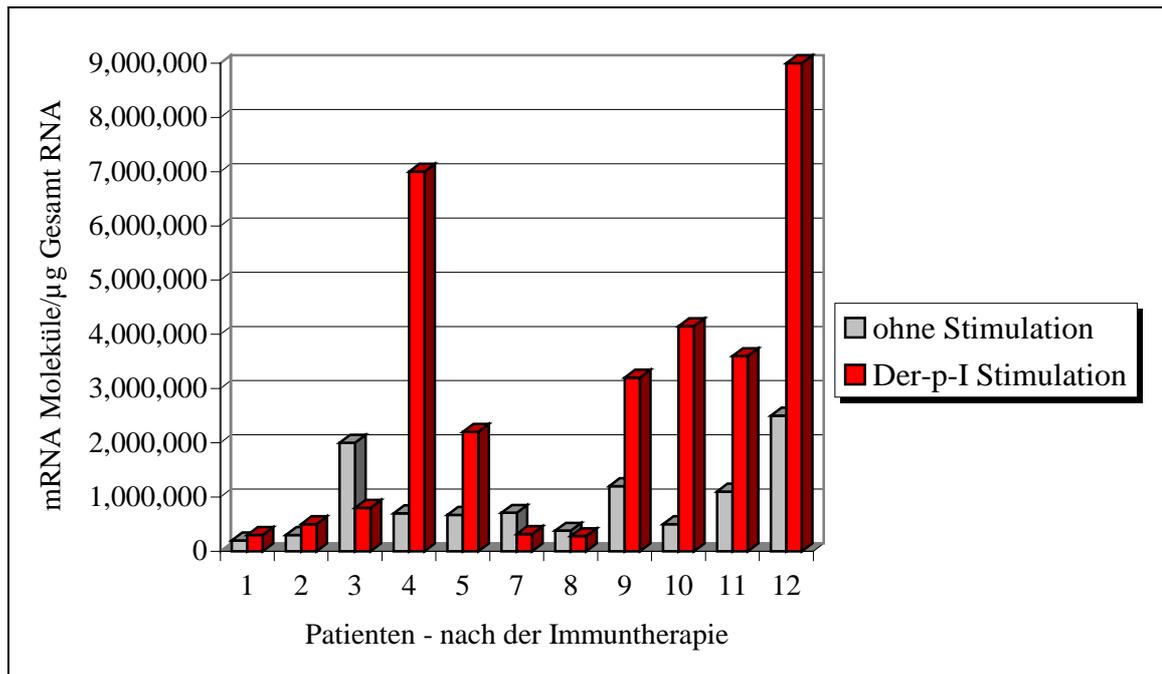


Abbildung 23: IFN- γ -Expression nach der Immuntherapie: Die PBMC der 11 Patienten wurden 24 Stunden ohne Stimulation oder mit Der-p-I inkubiert. Die Resultate sind in IFN- γ mRNA-Moleküle/ μ g Gesamt-RNA angegeben.

5.3 REGULATION DER IL-9-EXPRESSION

5.3.1 rh IL-9 INHIBIERT DIE IL-9-Genexpression

Der Vergleich der Expression von Cytokin-mRNA vor und einigen Stunden nach mitogener oder antigener Stimulation in den bisherigen Untersuchungen hat ergeben, daß IL-9 zum Zeitpunkt 0 eine besonders geringe Anzahl von Molekülen aufweist, die nach Stimulation außerordentlich stark zunehmen. Auch war der Unterschied in der Anzahl von IL-9-mRNA Molekülen in PBMC von Normalpersonen und Atopikern besonders groß. Besonderheiten der Genregulation von IL-9 im Vergleich zu anderen Cytokingenen können deshalb vermutet werden. Bekannt ist bereits, daß IL-2 erforderlich ist, um eine IL-9-Proteinexpression nachweisen zu können (Houssiau et al., 1992). Auch für IL-4 und IL-10 ist ein solcher Effekt beschrieben (Houssiau et al., 1995). Ob aber IL-9 selbst einen Einfluß auf die IL-9-Genexpression hat, und inwieweit ein solcher Effekt gegebenenfalls unabhängig von IL-2 ist, wurde noch nicht untersucht. Zur Frage einer IL-9-abhängigen IL-9-Regulation wurden PBMC verschiedener Kontrollpersonen mit PHA und einer konstanten Mengen an rh IL-9 inkubiert. Nach einer Inkubation von 2 bis 24 Stunden wurde die Anzahl der mRNA-Moleküle ermittelt. Abbildung 24 zeigt die prozentuale IL-9-mRNA-Expression, wobei zu jedem untersuchten Zeitpunkt die mit PHA alleine induzierte IL-9-Expression mit 100% angegeben ist. Es ergaben sich für die Zugabe von rh IL-9 nach einer Inkubation von 2 bis 4 Stunden IL-9-mRNA-Molekülzahlen, die nur bei 40 bis 50% der Werte lagen, die bei einer Inkubation mit PHA alleine ermittelt werden konnten. Dieser Effekt wurde mit zunehmender Inkubationszeit schwächer. Nach 8 Stunden konnte durch rh IL-9 nur noch eine Hemmung von 20% nachgewiesen werden, und nach 24 Stunden ist die IL-9 bedingte Verminderung der IL-9-Genexpression völlig aufgehoben. Die Daten legen nahe, daß die initiale inhibitorische IL-9-Regulation im Verlauf der PHA-Stimulation von anderen regulierenden Komponenten aufgehoben wird.

Im Gegensatz zur IL-9-Expression war die IL-2-Genexpression zu keinem Zeitpunkt der PHA-Stimulation von der Zugabe des rh IL-9 beeinflusst (Daten nicht dargestellt). Die Quantifizierung des IL-2-Expression diente gleichzeitig als Kontrolle dieser Ergebnisse.

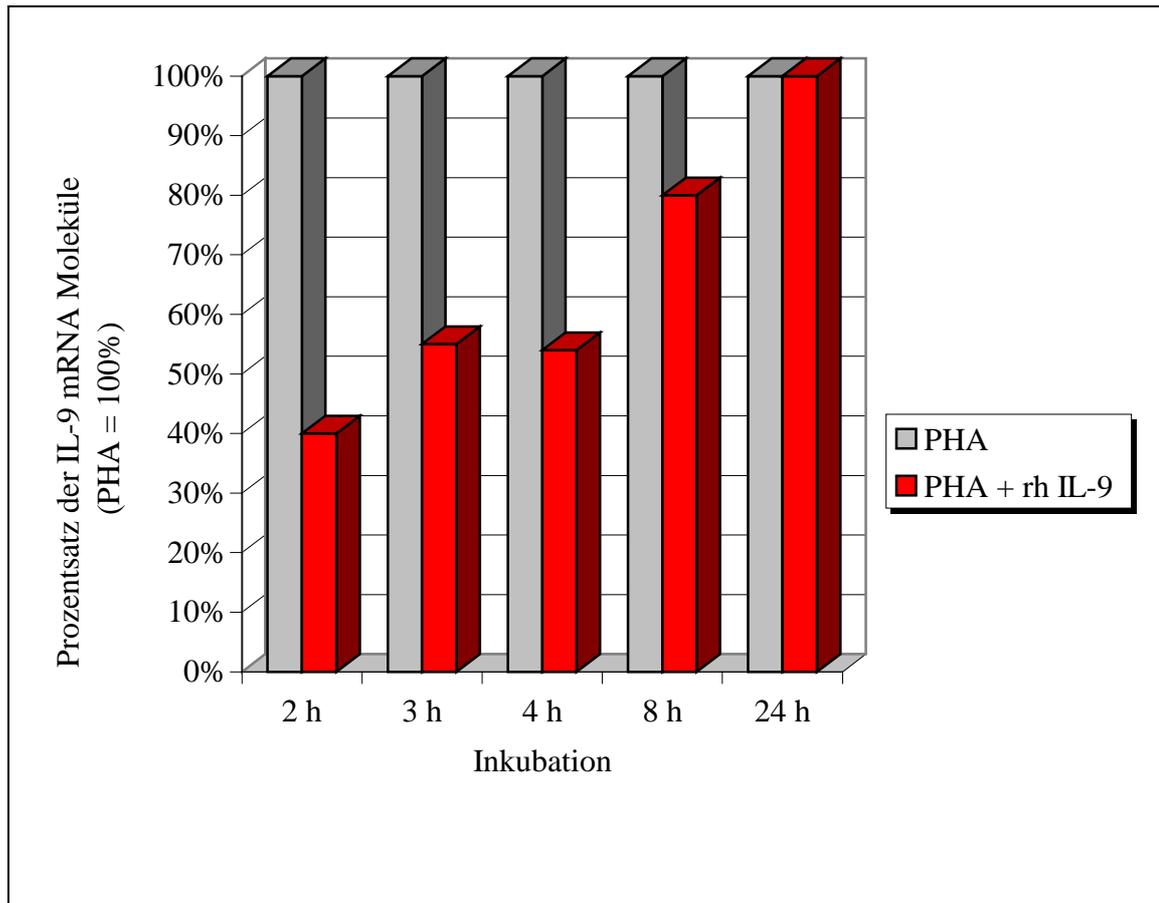


Abbildung 24: Regulation der IL-9-Genexpression durch rh IL-9: Die PBMC eines Probanden (Doppelbestimmung) wurden mit PHA alleine, oder mit PHA und rh IL-9 (10 ng/ml) 2 bis 24 Stunden inkubiert. Die Resultate sind in Prozent der mRNA-Moleküle angegeben, die durch die PHA-Stimulation alleine induziert wurden.

Weiterhin läßt sich nachweisen, daß ebenfalls die IL-2 induzierte IL-9-Genexpression durch die Zugabe von rh IL-9 inhibiert wird (Abbildung 25). Für die mit rh IL-2 induzierten PBMC konnten nach 4stündiger Inkubation $6,6 \times 10^6$ IL-9-mRNA-Moleküle ermittelt werden. Durch zusätzliches rh IL-9 konnte die IL-9-Genexpression um 40% auf 4×10^6 Moleküle gesenkt werden. Allerdings war es mit dieser Dosis an rh IL-9 nicht möglich, die IL-9-Genexpression auf den mit PHA allein induzierten Wert von $6,1 \times 10^4$ Moleküle zu senken.

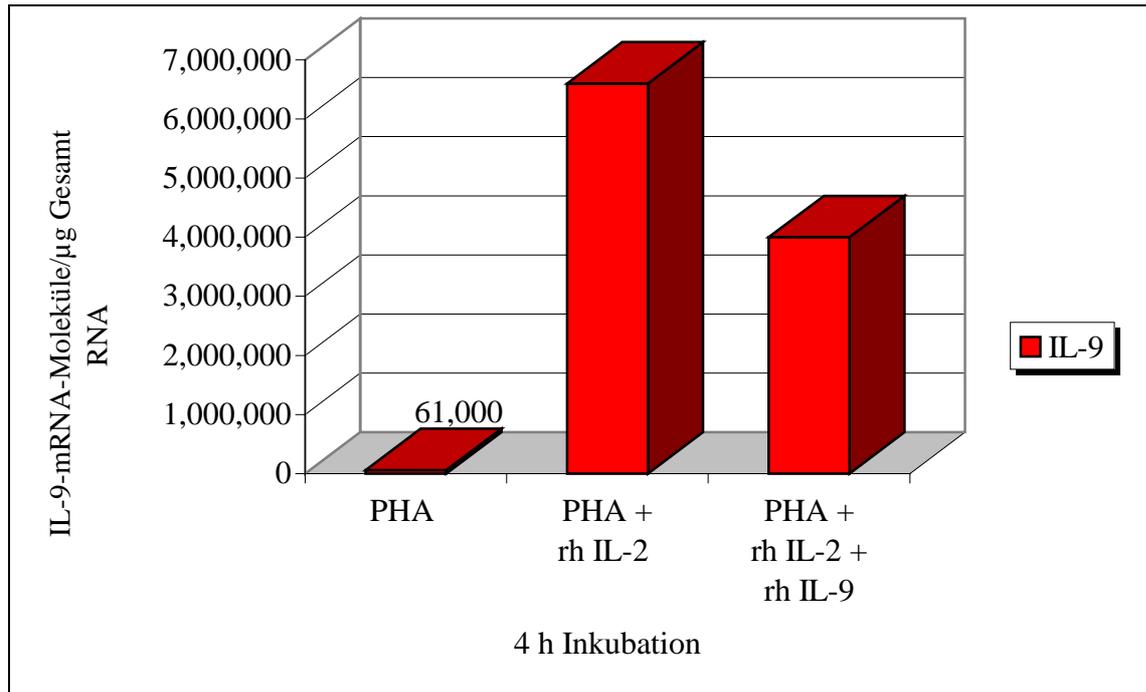


Abbildung 25: Regulation der IL-9-Genexpression durch rh IL-9: Die PBMC eines Probanden (Doppelbestimmung) wurden 4 Stunden mit PHA alleine, mit PHA plus rh IL-2 (50 ng/ml) und PHA plus rh IL-2 (50 ng/ml) und rh IL-9 (10 ng/ml) inkubiert. Die Resultate sind in Prozent der Genexpression angegeben, die durch die Inkubation mit PHA alleine induziert wurde.

Um die inhibitorische Wirkung des rh IL-9 in einer Dosis-Wirkungsbeziehung darzustellen, wurde das rh IL-9 in absteigender Konzentration den PHA stimulierten Zellkulturen in parallelen Ansätzen zugefügt. Die Ergebnisse (Abbildung 26) zeigen eine Dosisabhängigkeit der IL-9 Wirkung. Die Schwellendosis, bei der ein Effekt nachweisbar wird, dürfte im Bereich von 5 ng/ml rh IL-9 liegen. Weiterhin wird deutlich, daß eine hohe IL-9-Konzentration (10 ng/ml) keinen Effekt auf die Basisexpression von IL-9-mRNA Molekülen ohne Stimulation (z. B. durch PHA) hat.

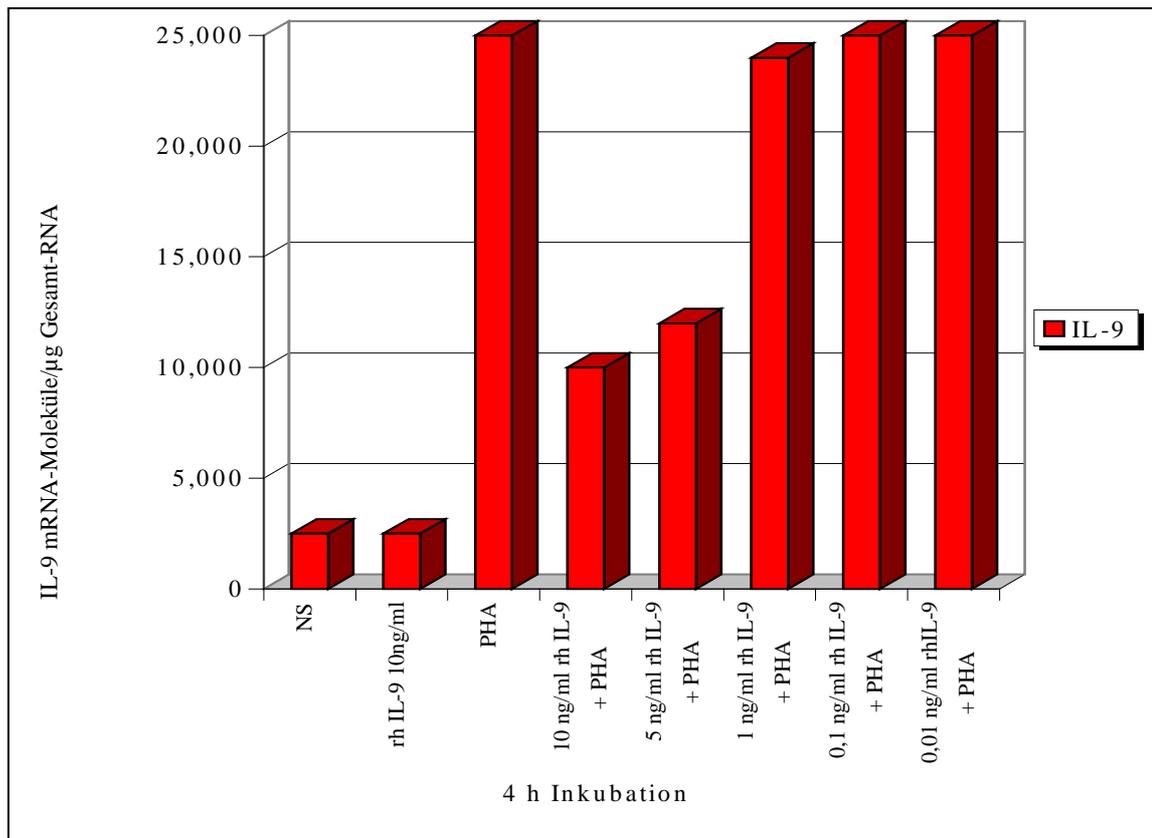


Abbildung 26: Regulation der IL-9-Genexpression durch rh IL-9: Die PBMC wurden 4 Stunden nicht stimuliert (NS), mit 10 ng/ml rh IL-9, mit PHA allein oder mit PHA und rh IL-9 (10, 5, 1, 0,1, 0,01 ng/ml) inkubiert. Die Resultate sind in IL-9-mRNA-Moleküle/μg Gesamt-RNA angegeben.

5.3.2 IL-9-ANTIKÖRPER STEIGERN DIE IL-9-GENEXPRESSION

In Abbildung 26 war keine Senkung der Basisexpression von IL-9-mRNA-Molekülen durch eine exogene Zugabe von rh IL-9 in Abwesenheit einer mitogenen Stimulation erkennbar. Dieses kann zum einen bedeuten, daß nur eine gesteigerte Expression von IL-9-mRNA Molekülen durch das IL-9-Protein inhibiert wird, oder daß im Zustand einer nicht stimulierten IL-9-Expression bereits eine maximale Inhibition durch mehr als 1ng/ml rh IL-9 erfolgt. Diese zweite Interpretation ist zunächst auch insofern rein hypothetisch, als nicht nachgewiesen ist, daß in unstimulierten PBMC IL-9-Protein überhaupt gebildet wird. In

Anbetracht von nur ca. 2000 IL-9-mRNA-Molekülen/ μg Gesamt-RNA entsprechend etwa 1×10^6 PBMC dürfte eine Basissekretion des IL-9 so gering sein, daß keine direkte Nachweismöglichkeit für das Protein gegeben ist.

Eine indirekte Beweisführung einer IL-9-Basissekretion könnte aber möglich sein, wenn durch Zugabe von IL-9-Antikörper zu nicht stimulierten PBMC ein Anstieg der Produktion der IL-9-mRNA Moleküle nachweisbar wird. Damit wäre gleichzeitig die zweite der oben diskutierten Erklärungsmöglichkeiten bestätigt.

Das nachfolgende Ergebnis (Abbildung 27) zeigt präzise eine PHA-unabhängige Steigerung der IL-9-Genexpression. Dazu wurden PBMC vier Stunden entweder ohne Zusätze, einem Kontrollantikörper, mit PHA, oder mit α IL-9-Antikörpern ($25 \mu\text{g/ml}$ lt. Vorgabe des Herstellers) inkubiert. Bei einer Stimulation mit PHA wurden 3×10^4 IL-9-mRNA-Moleküle/ μg Gesamt-RNA induziert, ohne PHA Stimulation blieb die Anzahl der IL-9-mRNA-Moleküle bei 2000 Molekülen. Bei einer Inkubation mit α IL-9-Antikörpern allein stieg die IL-9-mRNA dagegen auf 4×10^4 Moleküle an. Dies Ergebnis zeigt, daß α IL-9-Antikörper in den unstimulierten PBMC die IL-9-Genexpression verstärken. Die Antikörperinduktion übertrifft sogar das Ausmaß einer PHA-induzierten IL-9-Expression. Durch die Zugabe eines Kontrollantikörpers zu den PBMC konnte nach einer 4stündigen Inkubationszeit keine Induktion der IL-9-mRNA-Molekülzahl gezeigt werden.

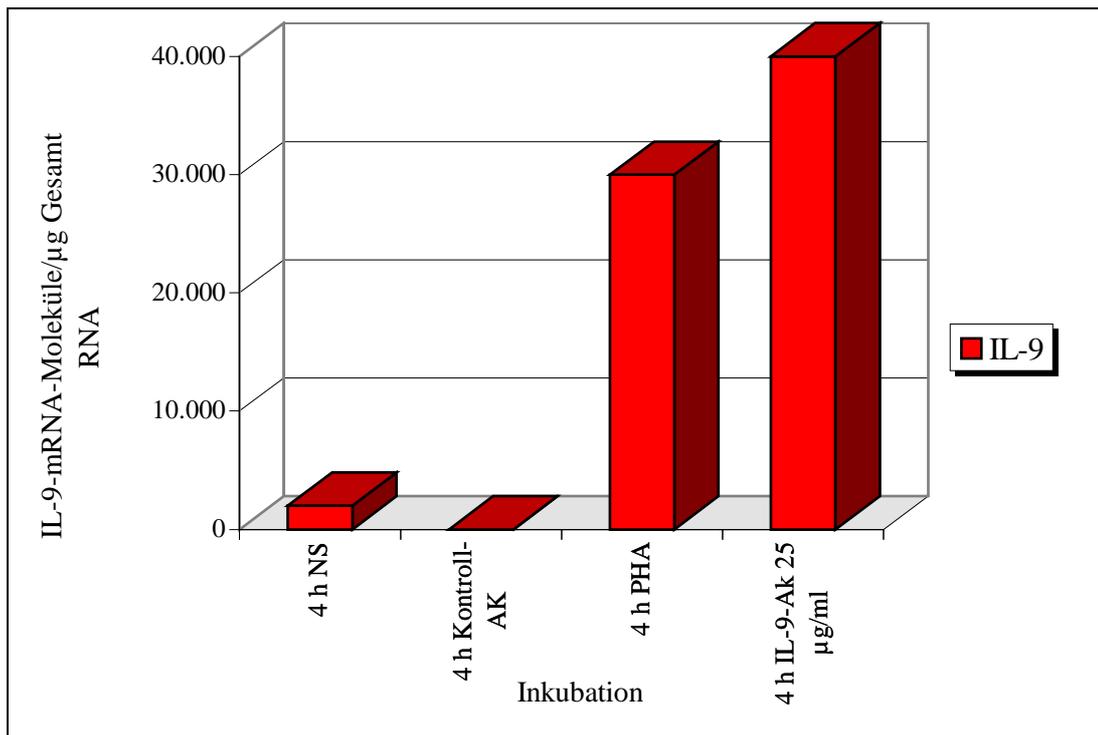


Abbildung 27: Induktion der IL-9-Genexpression durch IL-9-Antikörper: Die PBMC eines Probanden (Doppelbestimmung) wurden 4 Stunden nicht stimuliert (NS), mit einem Kontrollantikörper, mit PHA oder mit IL-9-Antikörper (25 µg/ml) inkubiert. Die Resultate sind in IL-9-mRNA-Molekülen/µg Gesamt-RNA angegeben.

5.3.3 HOCHREGULATION DER IL-9-GENEXPRESSION DURCH IL-9-ANTIKÖRPER

Als nächstes interessierte die Frage, wie sich die negative Feedback-Regulation durch IL-9 im Verlaufe einer mitogenen Stimulation mit PHA verhielt. Um einen Anstieg der IL-9-Proteinsekretion möglich zu machen, muß im Verlaufe der Aktivierung der PBMC die Hemmbarkeit der IL-9-Genexpression durch das Genprodukt aufgehoben oder zumindest reduziert werden. In Abbildung 28 wurde dieser Zusammenhang untersucht. Zu verschiedenen Zeiten nach Stimulationsbeginn mit PHA und mit oder ohne Zugabe von α IL-9-Antikörper wurde die Stimulation der IL-9-mRNA-Expression gemessen. Dabei wurden die Werte mit PHA alleine zu allen Zeitpunkten = 100% gesetzt. Die IL-9-mRNA-Produktion stieg bei Zugabe des α IL-9-Antikörpers innerhalb von 2 Stunden auf 500% im Vergleich zur PHA Stimulation ohne Zugabe des Antikörpers an, nach 4 Stunden erreicht die Hochregulation des IL-9 durch den Antikörper ihr Maximum mit einem Anstieg auf 1000%. Nach bereits 8 Stunden ging die IL-9-Expression auf 250% des durch PHA induzierten

Wertes zurück, und nach 24 Stunden ließ sich lediglich eine Steigerung um 33% nachweisen. Da die Zugabe eines Kontrollantikörpers zu den PBMC, weder nach einer 4stündigen noch nach 8stündiger Inkubationszeit eine Induktion der IL-9-mRNA-Molekülnzahl gezeigt hat, wurde auf eine Kontrolle nach 24stündiger Inkubationszeit verzichtet.

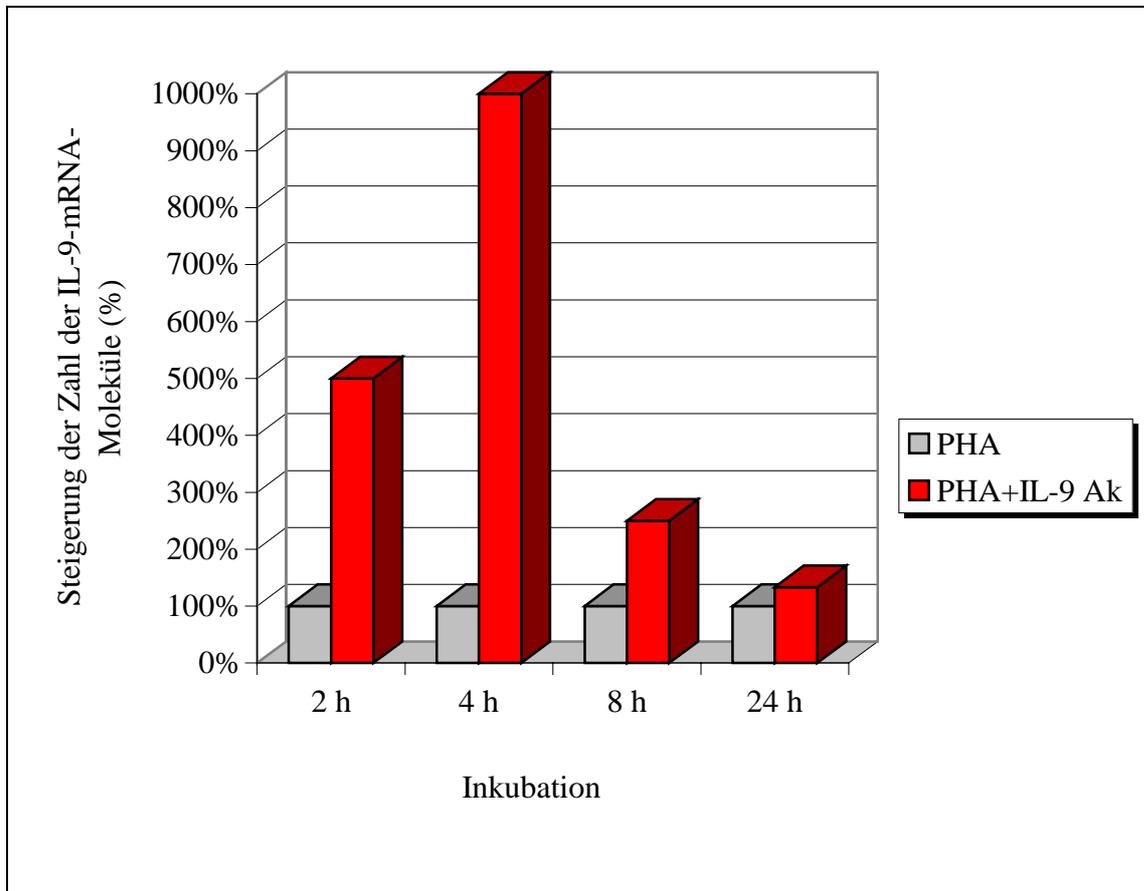


Abbildung 28: Beeinflussung der IL-9-Genexpression durch α IL-9-Antikörper: Die PBMC wurden mit PHA alleine oder mit PHA und IL-9-Ak (25 μ g/ml) 2, 4, 8 und 24 Stunden inkubiert. Die Resultate sind in Prozent der IL-9-Genexpression angegeben, die durch die Stimulation mit PHA alleine induziert wurde.

Die Hochregulation der IL-9-mRNA-Expression zeigte eindeutig eine Dosisabhängigkeit vom zugefügten IL-9-Antikörper (Abbildung 29). Dazu wurde der IL-9-Antikörper in absteigender Konzentration zusammen mit PHA 4 Stunden den Zellkulturen zugefügt. Eine maximale Hochregulation der IL-9-Genexpression ließ sich mit 25 μ g/ml IL-9-Antikörper erreichen. Die Hochregulation der IL-9-Genexpression durch IL-9-Antikörper erreicht den Faktor 10. Diese Induktion war auch durch Verdoppelung der Antikörperkonzentration nicht mehr zu steigern. Bis zu einer Konzentration von 2,5 μ g/ml IL-9-Antikörper ließ sich

noch eine Steigerung der Genexpression nachweisen. Erst eine Konzentration von 0,025 $\mu\text{g/ml}$ IL-9-Antikörper erwies sich für die Hochregulierung des IL-9 als wirkungslos.

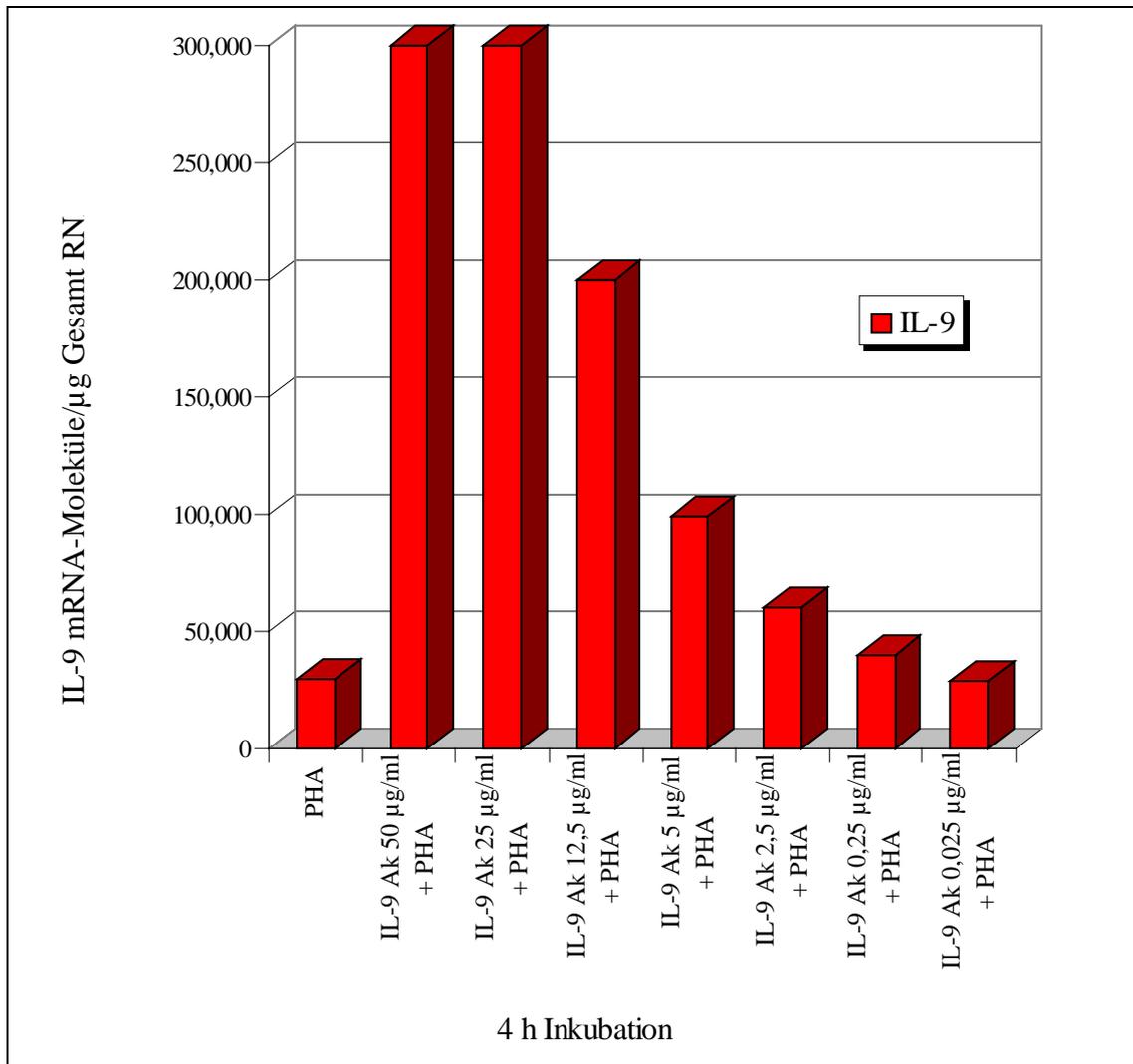


Abbildung 29: Regulation der IL-9-mRNA-Expression durch IL-9-Antikörper: Die PBMC wurden 4 Stunden mit PHA allein oder mit PHA und IL-9-Antikörper (50, 25, 12,5, 5, 2,5, 0,25 und 0,025 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Die Resultate sind in IL-9-mRNA-Molekülen/ μg Gesamt-RNA angegeben.

5.3.4 NEGATIVE FEEDBACK-REGULATION DER IL-9-mRNA-EXPRESSION

In Abbildung 30 wurden maßstabsgerecht Ergebnisse aus den verschiedenen Versuchen zur IL-9-Regulation zusammengestellt. Daraus wird deutlich, daß eine effiziente Induktion der IL-9-mRNA Akkumulation aus zwei Komponenten besteht: 1. Aus einer Aufhebung der negativen Feedback-Regulation durch das Endprodukt, und zweitens aus einer bei der T-Zellaktivierung beziehungsweise mitogenen Stimulation erfolgenden Aktivierung.

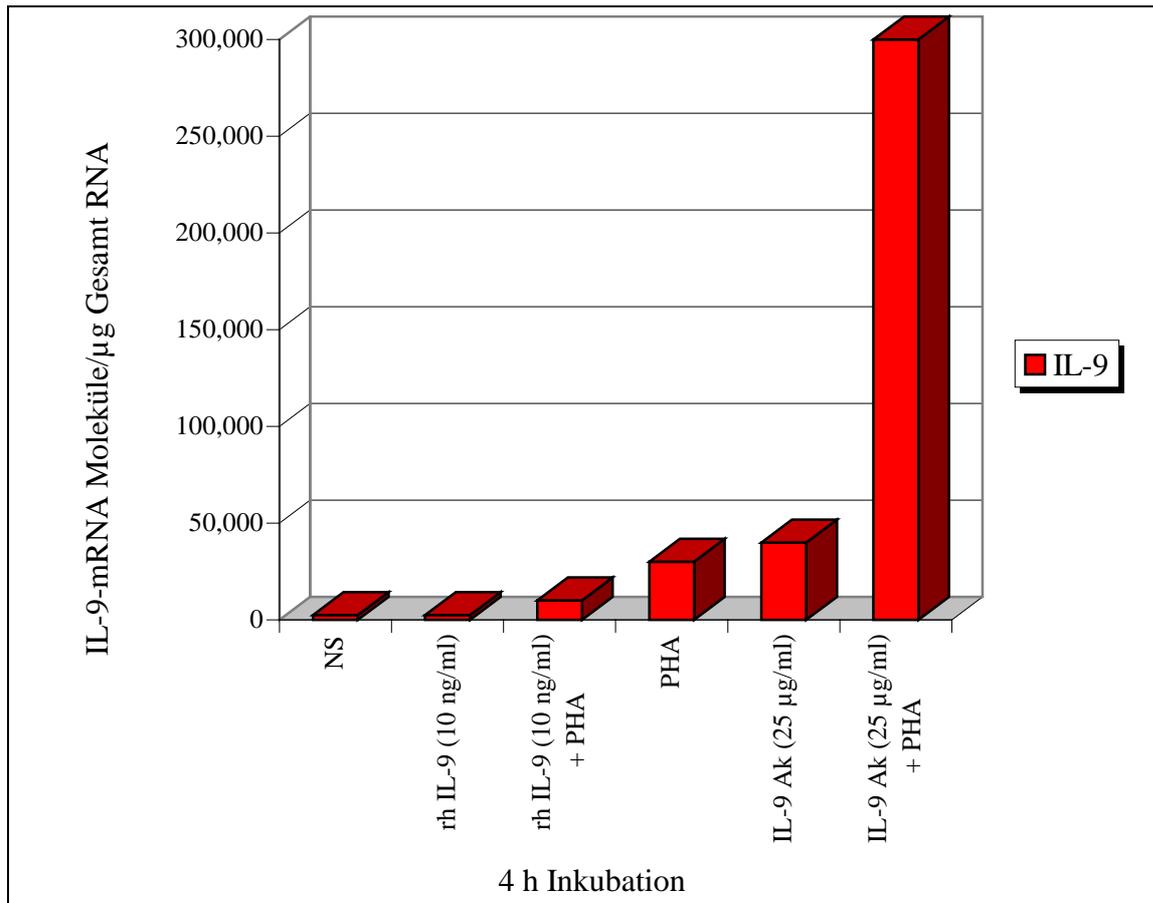


Abbildung 30: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Regulation der IL-9-Genexpression: Die PBMC wurden 4 Stunden nicht stimuliert (NS), mit rh IL-9 (10 ng/ml) mit und ohne PHA, mit PHA alleine und mit α IL-9-Antikörper (25 µg/ml) mit und ohne PHA inkubiert. Die Resultate sind in IL-9-mRNA-Molekülen/µg Gesamt-RNA angegeben.

5.3.5 EINFLUß VON rh IL-2 AUF DIE IL-9-GENEXPRESSION

Im nicht stimulierten Zustand befindet sich das Gleichgewicht der Feedback-Inhibition der IL-9-Synthese auf der Seite einer maximalen Inhibition. Um einen Anstieg der IL-9-Proteinsekretion im Verlaufe einer mitogenen Stimulation mit PHA möglich zu machen, muß die Hemmbarkeit der IL-9-Genexpression durch das Genprodukt aufgehoben, oder zumindest reduziert werden. Eine wichtige Bedeutung für die Aufhebung diese Feedback-Inhibition der IL-9-Synthese könnte dem IL-2-Protein zukommen.

In den weiteren Versuchen wurde deshalb geprüft, wann und in welchem Umfang nach einer PHA-Stimulation IL-2 in die Regulation der IL-9-mRNA-Expression eingreift. Wie in Abbildung 31 dargestellt, wurden bereits nach zwei Stunden durch eine zum PHA zusätz-

liche Stimulation mit 50 ng/ml rh IL-2 9×10^5 IL-9-mRNA-Moleküle induziert. Eine PHA Stimulation allein induzierte lediglich $6,1 \times 10^4$ Moleküle. Nach vier Stunden Stimulation mit PHA wurden $6,1 \times 10^4$ IL-9-Moleküle, mit 50 ng/ml rh IL-2 zusätzlich zur PHA Stimulation wurden dagegen $6,6 \times 10^6$ IL-9-mRNA-Moleküle induziert.

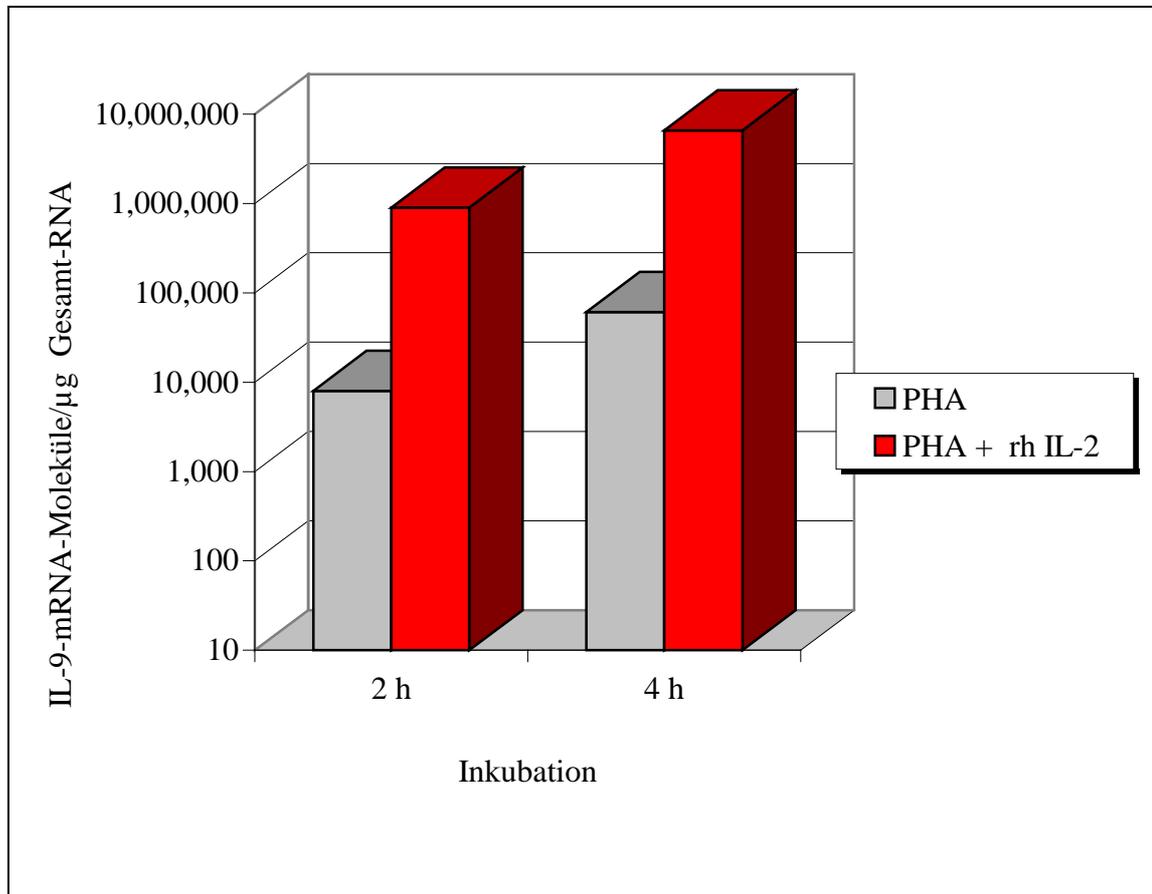


Abbildung 31: rh IL-2 induziert die IL-9-mRNA-Expression. Die PBMC wurden 2 und 4 Stunden mit PHA allein und mit 50 ng/ml rh IL-2 plus PHA inkubiert. Die Resultate sind in IL-9-mRNA-Moleküle/µg Gesamt-RNA angegeben.

5.3.6 IL-2-ANTIKÖRPER UND IL-2-REZEPTOR α -ANTIKÖRPER INHIBIEREN DIE IL-9-EXPRESSION AUF UNTERSCHIEDLICHE WEISE

Eine Steigerung der PHA-induzierten IL-9-Genexpression durch Zugabe von IL-2 zum Inkubationsmedium ist nach Abbildung 31 innerhalb von zwei Stunden effektiv. Die nächste Frage war nun, ob die PHA-induzierte Expression von IL-9-mRNA selber indirekt über eine primäre Induktion der IL-2 Produktion der PBMC ausgelöst wird. Dazu wurde die IL-2 Wirkung auf zwei verschiedenen Wegen unterbunden: Zum einen wurde ein polyklonaler

IL-2-Antikörper zum Inkubationsmedium zugegeben, und zum anderen ein monoklonaler Antikörper gegen die α -Kette des IL-2-Rezeptors. Nach einer Inkubation von 4 bis 24 Stunden wurde die Anzahl der IL-9-mRNA-Moleküle ermittelt. Um herauszufinden, ob die Rolle, die IL-2 für die Steigerung der IL-9-Genexpression spielt, dieselbe ist wie für andere Cytokingene, wurde analog der Einfluß von IL-2 auf die Steigerung der IL-4-Expression untersucht. Auch von IL-4 ist bekannt, daß es durch IL-2 induziert wird (Houssiau et al., 1995). Dieser Ansatz sollte gleichzeitig eine weitere Überprüfung der Wirksamkeit des IL-2 beziehungsweise IL-2R-Antikörpers darstellen.

Abbildung 32 zeigt die Prozentanteile der IL-9-Expression, wobei hier zu jedem untersuchten Zeitpunkt die mit PHA induzierte IL-9-Expression mit 100% angegeben ist.

Es zeigte sich für die Inkubation mit IL-2-Antikörpern, daß die IL-9-mRNA Akkumulation in den ersten 4 Stunden durch die Antikörper nicht beeinflußt war. Lediglich nach 8 und 24 Stunden konnte eine Inhibition der IL-9-Genexpression nachgewiesen werden. Es tritt also nach 24 Stunden trotz Blockierung der IL-2-Wirkung durch einen IL-2-Antikörper eine Hochregulation der IL-9-Produktion auf 1×10^7 IL-9-mRNA-Moleküle ein. In CTLL2-Zellen konnte mittels eines MTT-Tests die Wirksamkeit des verwendeten Antikörpers eindeutig nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Bei der Inkubation mit IL-2-Rezeptor α -Antikörpern ergab sich für die Induktion der IL-9-Genexpression ein anderes Bild. Es konnten für die Inkubation mit IL-2-Rezeptor α -Antikörpern bereits nach 4 Stunden IL-9-mRNA-Molekülzahlen ermittelt werden, die nur bei 42% der Werte lagen, die bei einer Inkubation mit PHA alleine induziert wurden. Deutlicher zeigte sich die Hemmung der IL-9-Expression bei einer Inkubationsdauer von 8 und 24 Stunden, hier erreichten die Werte der IL-9-mRNA Moleküle nur noch 3 beziehungsweise 0,03% der Molekülzahlen, die mit alleiniger PHA Stimulation induziert wurden. Die Stimulation mit PHA und einem Kontrollantikörper (16d2, anti Maus, identischer Isotyp (IgG2a) wie der CD25 Antikörper) hatte keinerlei Einfluß auf die IL-9-Expression, d.h. die IL-9-Expression wurde nicht herunterreguliert (Daten nicht gezeigt).

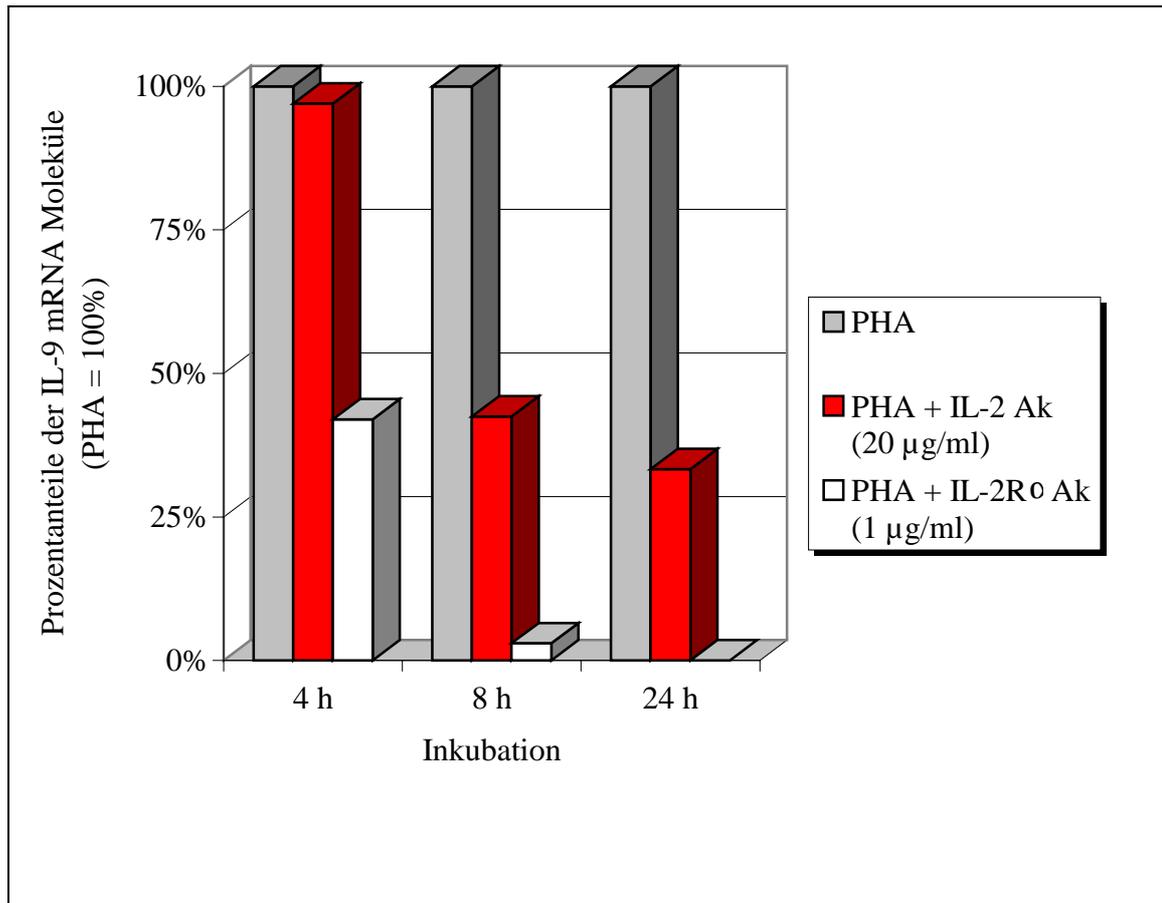


Abbildung 32: Inhibition der IL-9-Genexpression durch α IL-2-Antikörper und α IL-2-Rezeptor α -Antikörper: Die PBMC wurden mit PHA allein, mit PHA und α IL-2-Antikörper (20 μ g/ml) oder mit PHA und α IL-2-Rezeptor α -Antikörper (1 μ g/ml) für 2 bis 24 Stunden inkubiert. Die Resultate sind in Prozentanteilen der Genexpression angegeben, die durch die PHA-Stimulation alleine induziert wurde.

Die Wirksamkeit des IL-2-Antikörpers war im CTLL2-Bioassay bestätigt worden. Zusätzlich sollte aber geprüft werden, ob der Antikörper ebenfalls nicht in der Lage war, die IL-2-abhängige IL-4 Synthese nach PHA-Stimulation zu unterbinden.

Abbildung 33 zeigt die prozentuale IL-4-Expression mit und ohne Antikörper. Hier ist die 24stündige Inkubation mit IL-2-Antikörper beziehungsweise IL-2-Rezeptor α -Antikörper dargestellt. Die mit PHA induzierte Expression der IL-4-mRNA ist mit 100% angegeben.

Bei der IL-2 abhängigen Regulation des IL-4 zeigt sich im Vergleich zur Regulation des IL-9 ein deutlicher Unterschied. Die IL-4-Genexpression wurde im Gegensatz zu IL-9 durch den IL-2-Antikörper und durch den IL-2-Rezeptor α -Antikörper gleichermaßen inhi-

biert. Es wurden nach 24 Stunden für die IL-4-Genexpression nur noch 2,5 beziehungsweise 2% der Werte erreicht, die mit einer PHA Stimulation induziert wurden.

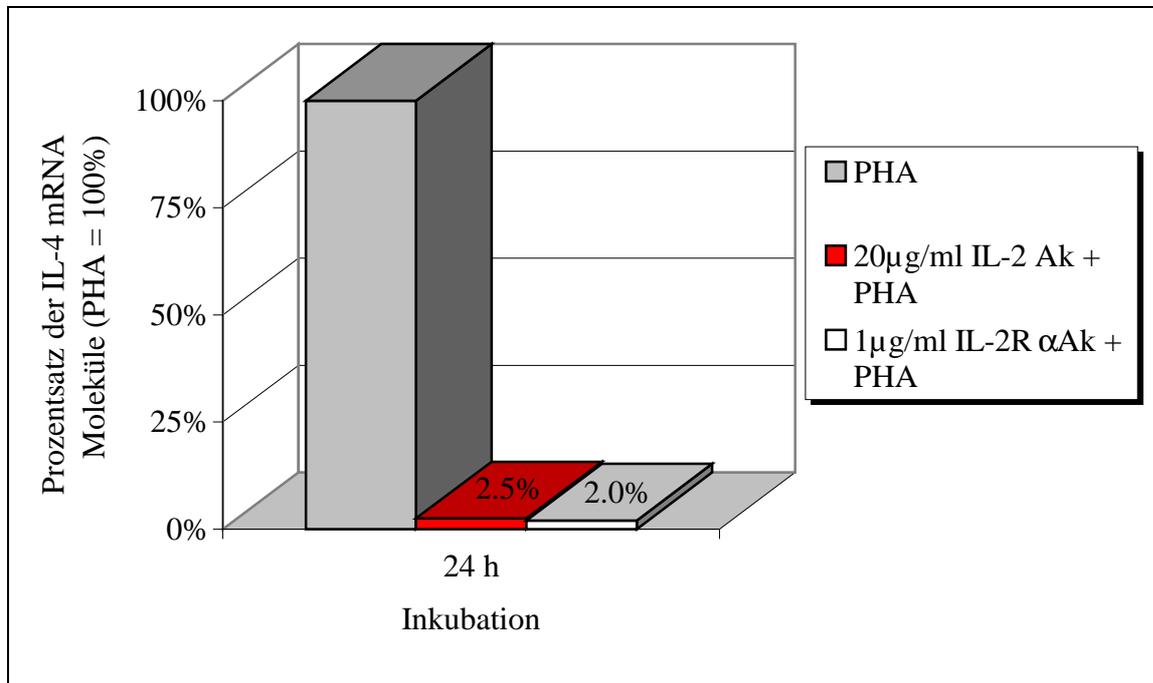


Abbildung 33: Regulation der IL-4-Genexpression durch IL-2-Antikörper und IL-2-Rezeptor α -Antikörper: Die PBMC wurden mit PHA allein, mit PHA und IL-2-Antikörper (20 μ g/ml) oder PHA und IL-2-Rezeptor α -Antikörper (1 μ g/ml) für 24 Stunden inkubiert. Die Resultate sind in Prozentanteilen der Genexpression angegeben, die durch die Stimulation induziert wurden.

5.4 REGULATION DER IL-9-PROTEINEXPRESSION

In den bisherigen Versuchen wurden Aussagen über die IL-9-Regulation im wesentlichen auf der RNA-Ebene gemacht. Das IL-9-Protein, das als negativer Feedback-Regulator wirkte, wurde nur indirekt durch seine Blockierbarkeit mit einem polyklonalen Antikörper nachgewiesen. Es war deshalb erforderlich, auch einen positiven Proteinnachweis zu führen und zu zeigen, daß eine Parallelität der IL-9-mRNA- und Proteininduktion besteht. Damit soll ausgeschlossen werden, daß ganz wesentliche Elemente der IL-9-Regulation auf der translationalen oder post-translationalen Ebene greifen.

Mit Hilfe eines ELISA konnte die IL-9-Proteinexpression im Überstand der mononukleären Zellen des peripheren Blutes normaler Probanden bestimmt werden (Abbildung 34). Das IL-9-Protein war bei PBMC eines gesunden Menschen in den ersten Stunden der Stimulation mit dieser Methode nicht nachweisbar. Nach 4 Stunden mitogener Stimulation

mit PHA *in vitro* konnten 0,3 ng/ml IL-9 detektiert werden. Nach 8 Stunden konnten 6,6 ng/ml, nach 24stündiger Inkubation 18 ng/ml IL-9 gemessen werden. Mit einem entsprechenden Kontrollantikörper konnte keine IL-9-Proteinexpression nachgewiesen werden.

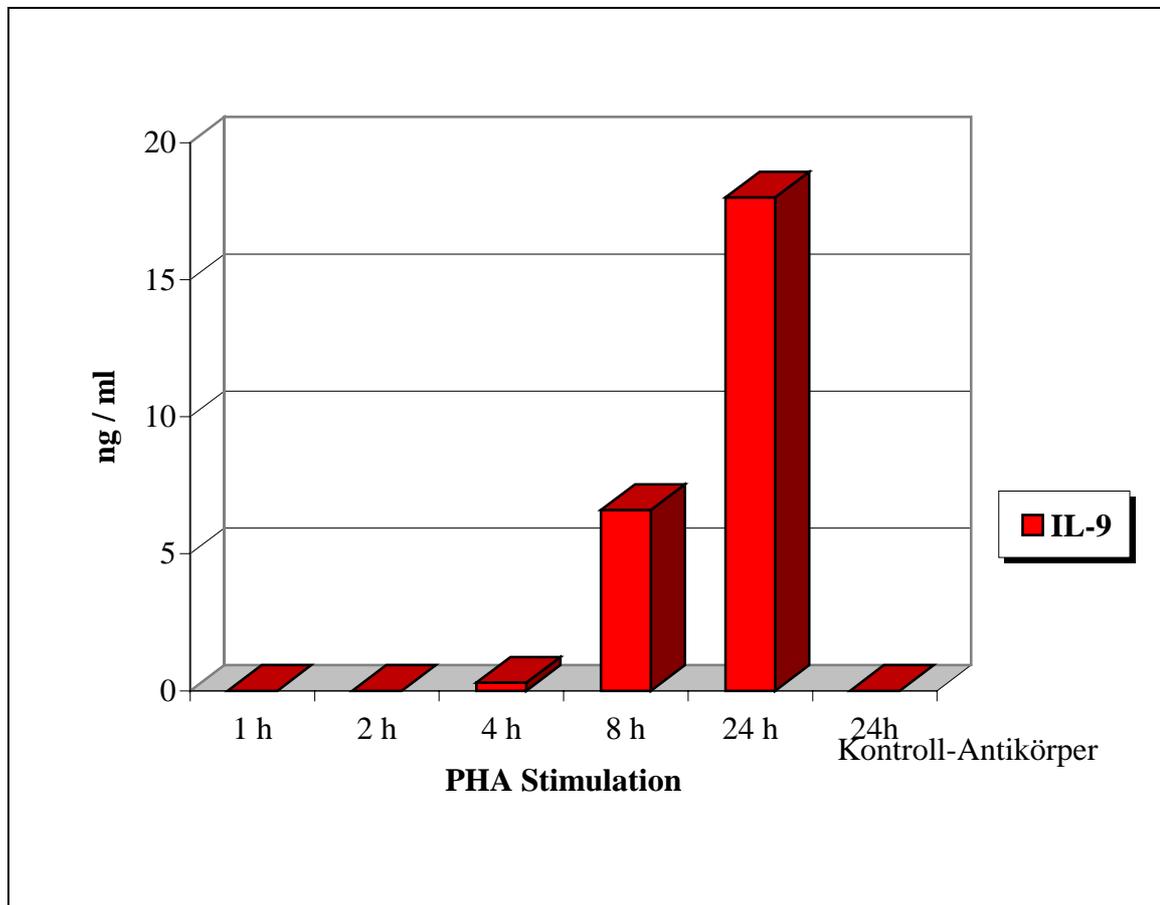


Abbildung 34: ELISA der IL-9-Proteinkonzentration in PBMC eines normalen Probanden bei verschiedenen Stimulationszeiten mit PHA. Resultate sind in ng/ml IL-9 angegeben.

6 DISKUSSION

6.1 INTERNER STANDARD

Ziel dieser Arbeit war, mit Hilfe der PCR nicht nur eine rein qualitative Beschreibung, sondern eine quantitative Aussage über die Cytokinexpression, insbesondere der IL-9-Expression in PBMC zu treffen. Zu diesem Zweck wurde in Anlehnung an die von Wang et al., 1989 beschriebene Technik eine quantitative RT-PCR etabliert. Diese Methode gestattet die Quantifizierung von extrem geringen mRNA-Molekülzahlen bis zu einer unteren Grenze von ca. 200 Molekülen eines Cytokintranskripts pro 1 µg Gesamt-RNA. Dieses mRNA Niveau liegt weit unterhalb der Nachweisgrenze jedes RNA-Blots.

Bei der Wahl eines adäquaten Standards mußten verschiedene Möglichkeiten in Erwägung gezogen werden. Es mußte berücksichtigt werden, daß die RT-PCR aus zwei getrennten enzymatischen Reaktionen besteht und die Kontrolle nur einer der enzymatischen Reaktionen, der PCR, unpräzise Quantifizierungsergebnisse zur Folge hat. Da bei einer Quantifizierung mit DNA-Standards Fluktuationen während der reversen Transkription der Kontrolle entgehen, wurden in der vorliegenden Arbeit zur Quantifizierung der PCR-Produkte interne RNA-Kontrollstandards verwendet, die sowohl die Cotranskription von RNA-Kontrollmolekülen mit der Cytokin-mRNA erlaubten, als auch eine Coamplifikation der dabei entstandenen cDNA-Kontrollmoleküle mit der Cytokin-cDNA.

Es wurden drei verschiedene interne RNA-Standards konstruiert, die dieselben Primersequenzen enthalten wie die zu untersuchenden mRNA. Durch Sequenzierungsanalysen dieser Kontrollfragmente konnte gezeigt werden, daß die durch die PCR synthetisierten Fragmente die entsprechende Basensequenz der PCR-Primer aufweisen. Somit war die Benutzung eines einzigen Primerpaares für die Amplifikation des Standards und der zu untersuchenden cDNA möglich: die beiden vorliegenden Templates kompetieren um die Primerbindung. Deshalb können keine Diskrepanzen in bezug auf die Effizienz der Primerbindung auftreten. Durch die Wahl der Länge des Spacers zwischen der Primersequenzen wurde sichergestellt, daß die beiden Templates PCR-Produkte geringfügig unterschiedlicher Größen ergeben und somit im Agarosegel eindeutig unterschieden werden konnten. Dieses System bürgt für die Einhaltung der Voraussetzungen für eine korrekte Quantifizierung, indem die beiden Templates bei geeigneten Konditionen mit derselben Effizienz und Kinetik coamplifiziert werden.

Die Tatsache, daß die RNA des Standards und die zelluläre RNA zwischen den Primer-sites unterschiedliche Nukleotidsequenzen aufweisen, könnte zu unterschiedlichen Sekun-därstrukturen führen, was eine unterschiedlich Effizienz bei der reversen Transkription zur Folge haben könnte. Diese Komplikation wurde bei einem Vorgehen berücksichtigt, bei dem Standard- und Test-cDNA dieselbe Länge und Sequenz haben mit dem Unterschied, daß sich in dem cDNA-Kontrollfragment eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle befindet (Wang et al., 1989). Allerdings können die coamplifizierten PCR-Produkte erst nach einer entsprechenden Restriktion im Agarosegel unterschieden und quantifiziert werden. Die Vorgehensweise erfordert eine weitere zusätzliche enzymatische Reaktion. Hierbei ist nicht sichergestellt, daß die mutierten Kontrollfragmente quantitativ restringiert werden, und aus diesem Grund wurde dieser Ansatz nicht aufgegriffen.

In der vorliegenden Arbeit (siehe 5.1.5) wurde die reverse Transkription der Poly(A)⁺ RNA des Standards und der zu untersuchenden RNA separat durchgeführt. Es konnte durch die parallele Quantifizierung beider Ansätze sichergestellt werden, daß diese Vorgehensweise keinen Einfluß auf das Quantifizierungsergebnis ausübt, d. h. variable Effekte während der reversen Transkription der verschiedenen RNA konnten nicht beobachtet werden.

Die Konzentration der eingesetzten DNA-Templates hat einen großen Einfluß auf die Amplifikationseffizienz. Hohe Konzentrationen haben primär Auswirkungen auf die Wirk-samkeit des verwendeten Enzyms, z. B. durch eine Substratsättigung, andererseits durch unvollständige Denaturierung der amplifizierten Doppelstränge, beziehungsweise Reannea-ling der PCR-Produkte. Um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten, müssen die Konzentra-tionen des internen Standards und der spezifischen RNA, sowie die Anzahl der Amplifika-tionszyklen so gewählt werden, daß die Reaktion noch in der exponentiellen Phase abge-schlossen ist. Sollte nur eines der beiden Templates bei der Coamplifikation im Verhältnis zu hoch konzentriert vorliegen, so wird die Amplifikation des zweiten Templates voll-ständig unterdrückt. Daher ist eine Reihe von Ansätzen mit unterschiedlichen Konzentra-tionen notwendig, um die entsprechend geeigneten Parameter für eine exakte quantitative RT-PCR herauszufinden.

6.2 KINETIK DER IL-9-mRNA-EXPRESSION

Die Transkription des IL-9-Gens in mononukleären Zellen des peripheren Blutes gesunder Probanden ist abhängig von Prozessen, die zu einer Aktivierung der Zellen führen. In unstimulierten PBMC werden nur wenige Moleküle der IL-9-mRNA nachgewiesen. Eine Stimulation der Zellen mit PHA induziert indes die mRNA-Expression. IL-9 gehört damit zu den Cytokinen, die nach herkömmlichen Vorstellungen in normalen PBMC nicht konstitutiv exprimiert werden, deren Synthese nach Aktivierung der Zellen dagegen sehr schnell induziert werden kann. Der Anstieg der IL-9-mRNA vollzieht sich kontinuierlich und erreicht nach 28stündiger *in vitro* Stimulation sein Maximum. Die IL-9-Induktion steht nicht im direkten Zusammenhang mit der Zellproliferation, da eine potente Stimulation mit PHA innerhalb von 24 Stunden noch nicht zu einer Steigerung der Zellzahl führt. Diese Trennung in proliferationsfördernde und cytokinininduzierende Wirkungen wird auch durch die Tatsache untermauert, daß TNF- α und die Kombination von IL-1 und IL-6 die Zellproliferation induzieren, nicht aber die IL-9-mRNA Induktion unterstützen (Houssiau et al., 1992). Weiterhin ist die IL-9-Induktion in der leukämischen T-Zell-Linie Mo IL-2-abhängig, die Zellproliferation hingegen nicht (Houssiau et al., 1992).

In unstimulierten PBMC liegt die Anzahl der mRNA-Moleküle für die Cytokine IL-2, und IL-4 deutlich höher als der Wert für IL-9 (Faktor 170 beziehungsweise 80). In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, daß das Ausmaß der IL-9-mRNA-Expression nicht von der Art des Stimulus abhängig ist. Für eine spezifische T-Zell-Stimulation mit CD2/CD28-Antikörpern und für eine mitogene Stimulation der PBMC mit PHA konnten keine Unterschiede bei der IL-9-Expression ermittelt werden.

Frühere Dot-Blot RNA-Untersuchungen haben gezeigt, daß IL-9 von aktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten exprimiert wird (Renauld et al., 1990). In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, daß gleichermaßen die geringfügige Anzahl der IL-9-mRNA-Moleküle in unstimulierten PBMC ausnahmslos von CD4⁺ T-Zellen produziert werden. Für die IL-9-Rezeptor mRNA konnte im Gegensatz zur IL-9-mRNA eine erheblich höhere Expression in unstimulierten PBMC nachgewiesen werden. Analog zu den Ergebnissen für die IL-9-Expression konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß auch die mRNA des IL-9-Rezeptors im unstimulierten Zustand von CD4⁺ T-Zellen produziert wird. Diese Befunde deuten auf einen autokrinen Regulationsmechanismus hin, indem die CD4⁺ T-Zelle das lösliche IL-9-

sezerniert, welches seinerseits auf die produzierende Zelle zurückwirkt und deren Effektorfunktionen beeinflusst. Ergänzend zu einer autokrinen Regulationsmechanismus ist für IL-9 auch eine parakrine Effektorfunktion möglich, indem das sezernierte IL-9 auf eine andere, benachbart liegende Zelle, z. B. eine Mastzelle wirkt und sowohl deren Wachstum als auch deren funktionelle Aktivitäten beeinflusst.

Die hier vorliegenden Daten zeigen, daß beim gesunden Menschen eine Anzahl von CD4⁺-T-Zellen im peripheren Blut mit einer basalen IL-9-mRNA-Expression vorliegt, die so gering ist, daß sie mit einer anderen Methoden als der PCR gar nicht erfaßbar ist.

6.3 CYTOKINEXPRESSION UNTER PATHOLOGISCHEN BEDINGUNGEN

Bei allergischen Erkrankungen konnten in einer Reihe von Untersuchungen im peripheren Blut sowie in den betroffenen Organen die Prävalenz eines T_{H2}-Cytokinprofils nachgewiesen werden (Wierenga et al., 1990, van der Heijden et al., 1991, Esnault et al., 1996).

Die vorliegende Untersuchung beschäftigt sich ausschließlich mit den Zellen des peripheren Blutes. Die Ergebnisse deuten durch die erhöhte Expression von IL-9 und IL-4 in den PBMC der Patienten mit einem atopischen Ekzem auf die Präsenz von T-Lymphozyten des T_{H2}- oder T_{H0}-Typs.

Die in der vorliegenden Untersuchung gefundene erhöhte spontane IL-4-Genexpression bei atopischen Patienten im Vergleich zu nichtatopischen Kontrollprobanden bestätigt die Ergebnisse früherer Arbeiten (Esnault et al., 1996, Tang et al., 1994). Bemerkenswert sind die hier vorliegenden Ergebnisse für die IL-9-Expression. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die spontane IL-9-mRNA-Expression in nicht stimulierten PBMC atopischer Patienten im Vergleich mit Normalprobanden einen erheblich größeren Unterschied aufweist als die spontane IL-4-Expression. Dieser Befund konnte auch nach PHA-Stimulation der PBMC dokumentiert werden, wobei die Stimulierbarkeit der IL-9-Genexpression atopischer Patienten die der IL-4-Expression eindeutig übertrifft.

Einige Gruppen assoziieren atopische Erkrankungen mit Polymorphismen im Bereich der q31-33 Region auf Chromosom 5 (Marsch et al., 1994, Meyers et al., 1994). Diese Region codiert unter anderem für die Cytokine IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, die ausnahmslos

an einer allergischen Reaktion beteiligt sind. Auch das Gen für IL-9 befindet sich in diesem Gencluster und ist aufgrund seiner Wirkung auf Mastzellen (Möller et al., 1989; Hültner et al., 1989, 1990, Eklund et al., 1993) und bedingt durch seinen verstärkenden Effekt auf die IL-4 induzierte IgE-Produktion (Dugas et al., 1993) ebenfalls ein Cytokin, das für die Regulation allergischer Reaktionen Bedeutung hat.

Das Niveau der IFN- γ mRNA-Expression in den PBMC atopischer Patienten liegt weder in unstimulierten PBMC noch nach PHA-Stimulation höher als bei den Kontrollprobanden. Diese Daten korrelieren mit den Ergebnissen anderer Studien, die eine normale IFN- γ Produktion bei atopischen Patienten beschreiben (Robinson et al., 1992, Paganelli et al., 1991). Im Gegensatz dazu wurde in anderen Studien eine Verringerung der IFN- γ mRNA-Expression beschrieben (Pene et al., 1994, Tang et al., 1994).

Die in der vorliegenden Untersuchung höhere IL-2-Produktion bei atopischen Patienten widerspricht dem eindeutigen Vorliegen einer T_{H2}-Cytokinexpression bei den hier erfaßten Patienten, so daß eher vom Bestehen eines T_{H0}/T_{H2}-Cytokinprofils ausgegangen werden muß.

Für die gesteigerte mRNA-Expression von Cytokinen, insbesondere derjenigen der T_{H2}-Cytokine, gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Es kann sich um eine Vermehrung der Zahl von T_{H2}-Zellen im peripheren Blut handeln, wobei jede einzelne ihre transkriptionelle Aktivität oder die Stabilität der Cytokin mRNA gar nicht verändert. Andererseits könnte es sich um eine gleichbleibende Zahl von T_{H2}-Zellen handeln, die aber eine erhöhte transkriptionelle Aktivität von Cytokinen und/oder eine verlängerte Stabilität der mRNA aufweisen. Schließlich könnte es sich um eine Mischung der beiden genannten Möglichkeiten handeln. Für das Cytokin IL-6 liegen hierzu Untersuchungen vor, die zeigen, daß einerseits die Zahl IL-6 produzierender Zellen ansteigt (Andersson und Matsuda, 1989), und daß andererseits, durch in situ Hybridisierung gezeigt, auch die Transkriptmenge pro Einzelzelle deutlich zunimmt (Navarro et al., 1989).

6.4 CYTOKINEXPRESSION NACH SPEZIFISCHER IMMUNTHERAPIE

In Zusammenarbeit mit der Abteilung für Pulmonologie der Universität Amsterdam wurde in einer Studie an 11 Patienten, die an Asthma bronchiale aufgrund einer Allergie gegen Hausstaubmilben litten, eine Cytokin-mRNA-Quantifizierung durchgeführt.

Verschiedene Analysen der Cytokinproduktion allergenspezifischer T-Lymphozyten haben ergeben, daß im Gegensatz zu bakteriellen Antigenen, die vorwiegend einen T_{H1}/T_{H0} Phänotyp hervorrufen, allergenspezifische T-Lymphozyten atopischer Patienten eine T_{H2}/T_{H0} -Expression aufweisen (Wierenga et al., 1990, Parronchi et al., 1991, Yssel et al., 1992). Bei Allergiepatienten konnten in den Zielorganen T_{H2} -Zellen nachgewiesen werden. Untersuchungen von Zellen, die aus einer Bronchialbiopsie und einer bronchoalveolären Lavage bei Patienten mit atopischem Asthma gewonnen wurden, zeigten einen eindeutigen T_{H2} -Phänotyp (Robinson et al., 1992, Hamid et al., 1991). In der hier vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, daß nicht nur in den betroffenen Organen, sondern auch in den PBMC atopischer Patienten nach allergenspezifischer Stimulation die Prädisposition für T_{H2} -Cytokine nachweisbar ist.

Eine Immuntherapie bietet die Möglichkeit einer kontrollierten Exposition mit dem Antigen, hier Hausstaubmilbenantigen, um nachhaltig die Schwere des allergischen Krankheitsbildes zu reduzieren. Während einer Immuntherapie finden verschiedene immunologische Modifizierungen statt. Wichtige Effekte bestehen in der Verringerung des allergenspezifischen IgE- und IgG-Niveaus (Fadal et al., 1980, Willoughby et al., 1992). Die Reduzierung der IgE-Antikörper durch die Immuntherapie könnte durch die Verminderung Antikörper-produzierender B-Zellen (Rocklin et al., 1980) oder durch die Induzierung eines spezifischen Faktors, der die IgE-Synthese supprimiert (De Las Marinas et al., 1993), hervorgerufen werden.

Eine spezifische Immuntherapie kann zudem das Cytokinprofil allergenspezifischer T-Lymphozyten verändern. Bei Patienten, die sich einer Graspollen-Immuntherapie unterzogen hatten, beeinflusste diese Therapie zwar nicht die Expression von T_{H2} -Cytokinen als Antwort auf eine erneute Allergenexposition. Die Expression der mRNA von T_{H1} -Cytokinen war jedoch bei der Hälfte der untersuchten Patienten, bei denen eine Verbesserung des Krankheitsbildes eingetreten war, erheblich gesteigert (Varney et al., 1993). In einer wei-

teren Studie reduzierte eine erfolgreiche Immuntherapie die IL-4-Produktion, wogegen die IFN- γ -Expression unbeeinflusst blieb (Secrist et al., 1993). Obwohl beide Studien abweichende Ergebnisse erbrachten, unterstützen sie die Vorstellung, daß die Cytokinprofile allergenspezifischer T_{H2}-Zellen veränderbar sind und damit durch eine *in vivo* Therapie manipuliert werden können. Eine allergenspezifische Modulation *in vivo* konnte in der Maus durch chemisch veränderte Allergene bereits gezeigt werden (Gieni et al., 1993). Mit welchen Mechanismen die Immuntherapie eine Veränderung des T-Zell-Cytokinprofils induziert, ist unklar. Es konnte gezeigt werden, daß die unterschiedliche Form der Darbietung und die Höhe der Dosis des bei der Therapie verabreichten Allergens an der Cytokinmodulation beteiligt sind (Secrist et al., 1995).

Mehrere frühere Studien haben gezeigt, daß eine spezifische Immuntherapie gegen die Allergene der Hausstaubmilbe die bronchiale Sensitivität deutlich reduziert (Bousquet et al., 1995, Garcia-Ortega et al., 1993, Van-Bever et al., 1992). Im Rahmen der hier vorliegenden Studie ergaben sich deutliche Verbesserungen der klinisch relevanten Bronchialparameter sowohl im Verlauf der asthmatischen Sofort- als auch der Spätreaktion für 9 der 11 untersuchten Patienten, die sich der Immuntherapie unterzogen haben (Daten befinden sich im Anhang). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, daß die Expression der T_{H2}-Cytokine IL-4, IL-5 und IL-9 in PBMC nach der Immuntherapie bei 7 bis 9 Patienten deutlich reduziert war. Die Expression des IFN- γ -Genexpression stieg nach der Therapie in den meisten Fällen an, oder blieb unverändert.

Es ergeben sich für dieses Ergebnis mehrere verschiedene Interpretationsmöglichkeiten: Die Therapie könnte eine Generierung von allergenspezifischen CD8⁺ Suppressorzellen (McMenamin et al., 1993) bewirkt haben. Ferner könnte die Produktion der CD4⁺ T-Zellen herabgesetzt sein, oder die Therapie hat eine Anergie von allergenspezifischen CD4⁺-Zellen induziert (O`Hehir et al., 1991). Diese Erklärungsmöglichkeiten passen allerdings in der vorliegenden Studie nicht mit den Cytokinexpressionsmuster überein, da ein Anstieg der IFN- γ -Genexpression nach der Therapie nachgewiesen werden konnte. Die hier vorliegende Veränderung der Cytokinexpression nach einer Immuntherapie lassen sich besser mit einer Verschiebung der CD4⁺-T-Zell-Cytokinexpression vom T_{H2}-Profil zum T_{H1} beziehungsweise zum T_{H0} Profil erklären. Dieses Resultat korreliert mit den Befunden anderer Studien, bei denen eine erfolgreiche Immuntherapie mit einem Anstieg der IFN- γ Pro-

duktion und einer Verringerung der IL-4 und IL-5-Expression einhergeht (Hamid et al., 1995, Jutel et al., 1995). Als Mediator für diese Modifikation wird von den Autoren das während der Therapie von CD68⁺ Makrophagen produzierte IL-12 angesehen. In großer Menge vorliegendes IL-12 korreliert positiv mit dem Vorhandensein der mRNA für IFN- γ und negativ mit der IL-4-mRNA-Expression.

6.5 REGULATION DER IL-9-Genexpression

Es gibt für die Zelle verschiedene Wege, die Produktion von Proteinen zu regulieren, indem sie kontrolliert, wann und wie oft ein Gen transkribiert wird (Transkriptions-Kontrolle). Die Transkription wird durch Gen-Regulatorproteine (Transkriptionsfaktoren) ein- und ausgeschaltet, selbst dann, wenn ihre Bindungsstellen in großer Distanz vom Promotor lokalisiert sind. Eukaryontische Polymerasen benötigen zur Initiation der Transkription die Ansammlung von Allgemeinen Transkriptionsfaktoren am Promotor. Diese Faktoren treten in einer bestimmten Reihenfolge zusammen, wobei der erste Schritt die Bindung von TFIID an die TATA-Box ist (Buratowski, 1994). Der geordnete Sammlungsprozeß der Allgemeinen Transkriptionsfaktoren bietet mehrere Stufen, an denen die Initiation der Transkription reguliert werden kann, und die Gen-Regulatorproteine funktionieren, indem sie als Transkriptions-Aktivatoren diesen Vorgang ermöglichen (positive Kontrolle) oder als Transkriptions-Repressoren verhindern (negative Kontrolle). Gen-Aktivatorproteine arbeiten, indem sie im einfachsten Fall die Geschwindigkeit der Transkriptions-Initiation beschleunigen oder die Ansammlung der Allgemeinen Transkriptionsfaktoren forcieren. Einige negative Gen-Regulatoren verdrängen den Allgemeinen Transkriptionsfaktor TFIID vom Promotor, während andere die Interaktionen zwischen TFIID und den weiteren Allgemeinen Transkriptionsfaktoren blockieren oder mit einem Gen-Aktivatorprotein um die DNA-Bindung konkurrieren (Auble et al., 1993).

Alle weiteren Schritte, die an der Genexpression beteiligt sind, können ebenfalls reguliert werden, indem die Zelle kontrolliert beziehungsweise beeinflusst, wie das primäre RNA-Transkript gespleißt wird (RNA-Processing-Kontrolle) oder auswählt, welche fertiggestellten mRNA vom Zellkern ins Cytoplasma transportiert werden (RNA-Transport-Kontrolle). Weiterhin kann die Zelle auswählen, welche mRNA im Cytoplasma durch Ribosomen translatiert wird (Translations-Kontrolle), sie kann selektiv bestimmte mRNA-

Moleküle im Cytoplasma destabilisieren (mRNA-Abbau-Kontrolle) oder selektiv spezifische Proteinmoleküle nach ihrer Synthese aktivieren oder inaktivieren (Protein-Aktivitäts-Kontrolle) (Alberts et al., 1995).

Die Gene der T_{H2}-assoziierten Cytokine, die in der q23-31 Region des Chromosom 5 lokalisiert sind, haben verschiedene regulatorische Elemente gemein. Die Promotoren dieser Gene enthalten mehrere positive und negative regulative Regionen, und die Kontrolle der Initiation der Transkription stellt für diese Cytokine den bedeutendsten Faktor der Expressionsregulation dar (Kishimoto et al., 1994, Jain et al., 1995, Ricci, 1994).

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse zeigen, daß die Kinetik der IL-9-Proteinexpression mit einer gewissen zeitlichen Latenz der Kinetik der RNA-Expression folgt. Durch diesen Befund lassen sich wesentliche Elemente der IL-9-Regulation auf der translationellen oder post-translationellen Ebene ausschließen.

Die Regulation der IL-2-Genexpression wird hauptsächlich durch vier positiv wirkende Transkriptionsfaktorfamilien wie die NFAT-Proteine (nuclear factor of activated T cells), die Octamer-Proteine (oct proteins), die Jun/Fos-Proteine, die an die AP-1-site (activating protein-1) binden, und die NF- κ B-Proteine gewährleistet (Jain et al., 1995). Es konnte zudem ein negatives Gen-Regulatorprotein (NIL-2) identifiziert werden, das die IL-2-Genexpression inhibiert (Williams et al., 1992).

Die Regulation der IL-4-Transkription ist ebenfalls sehr gut untersucht. Das bedeutendste regulatorische Element stellt die Familie der NF-Proteine (nuclear factor proteins) dar (Todd et al., 1993, Szabo et al., 1993). NF-Proteine (NF-P) haben Gemeinsamkeiten mit den NFAT-Proteinen, der Transkriptionsfaktorfamilie für die IL-2-Genexpression (McCaffrey et al., 1993). Weiterhin konnten ein positives regulatorisches Element (PRE-I) identifiziert werden. Die Faktoren POS-1 und POS-2 binden selektiv diese DNA-Sequenz. Die verstärkende Funktion der IL-4-Genexpression aufgrund der Bindung von POS-1 und POS-2 an die PRE-1 Region wird durch zwei negative Faktoren entscheidend beeinflusst. Die negativ regulatorischen Transkriptionsfaktoren (Neg-1 und Neg-2) blockieren durch die Bindung an eine spezifische DNA-Region (NRE, negative regulatory element) die IL-4-Genexpression (Li-Weber et al., 1992).

Theoretisch kann die Regulation der IL-4-Genexpression auf dem Niveau der Signaltransduktion und/oder auf der Stufe der Transkriptionsfaktoren und ihrer korrespondierenden Promotorregionen stattfinden. Zum Beispiel könnte eine schwache Aktivität der repressiven NRE-Region und seiner Transkriptionsfaktoren Neg-1 und Neg-2 verantwortlich für eine unkontrollierte Hyperaktivität der positiven Elemente und einer damit verbundenen gesteigerten IL-4-Genexpression sein (Li-Weber et al., 1993).

Auf Grund der Kenntnisse über eine potentielle autokrine Regulation (Merz et al., 1991) wurde in der hier vorliegenden Arbeit der Effekt des IL-9-Proteins auf die IL-9-mRNA-Expression in PBMC untersucht. Daß IL-9 zumindest teilweise selbst in Zelllinien als autokriner Wachstumsfaktor regulativ wirksam ist, zeigt die Möglichkeit einer Proliferationsinhibition durch IL-9-Antikörper bei der Zell-Linie KMH2 (Gruss et al., 1992). Aus diesem Grunde war als IL-9-Effekt eher eine Steigerung der IL-9-mRNA-Expression als eine Inhibition der Genexpression zu erwarten.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte demgegenüber erstmals die Verminderung einer Genexpression durch rh IL-9 nachgewiesen werden. Da die IL-2-Genexpression zu keinem Zeitpunkt durch das IL-9 beeinflusst worden war, handelt es sich möglicherweise bei dieser Wirkung des IL-9 um einen spezifisch die IL-9-Genregulation betreffenden Mechanismus.

Die Zugabe von IL-9-Antikörpern zu nicht stimulierten PBMC induziert die IL-9-mRNA-Expression in einem Ausmaß, das die Genexpression aufgrund einer mitogenen Stimulation übersteigt. Eine *in vitro* IL-9-mRNA-Expression ohne spezifische, beziehungsweise mitogene T-Zell-Stimulation konnte bisher nicht gezeigt werden. Da es infolge der IL-9-Antikörper auch ohne eine mitogene Stimulation zu einer Akkumulation der IL-9-mRNA kommt, handelt es sich um einen spezifischen über den IL-9-Rezeptor vermittelten Effekt. Während einer mitogenen Stimulation mit PHA bewirken die α IL-9-Antikörper ein zusätzliches Ansteigen der IL-9-mRNA-Moleküle. Somit bieten α IL-9-Antikörper neben IL-2, IL-4 und IL-10 eine weitere, bislang unbeschriebene Möglichkeit, die IL-9-Produktion zu steigern. Die hier vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß in nicht stimulierten PBMC das IL-9-Protein gebildet wird, und daß die lokale Konzentration dieses IL-9 ausreicht, um eine maximale Inhibition der IL-9-mRNA-Expression aufrechtzuerhalten. Im nicht stimulierten Zustand befindet sich das Gleichgewicht der Inhibition der IL-9-Synthese demnach auf der Seite einer maximalen Inhibition.

Für die IL-9-Genexpression ist das Zusammenwirken verschiedener Transkriptionsfaktoren verantwortlich. Als essentiell für die basale und induzierbare IL-9-Genexpression konnte eine DNA-Region identifiziert werden, die eine NF- κ B Bindungssequenz enthält. An diese Region binden NF- κ B, c-Jun und ein ca. 35 kD großes Protein. Mutationen dieser Promotorregion verhindern die Transkription sowie die DNA-Bindung der Transkriptionsfaktoren. Außerdem sind unter anderem eine AP-1 site und eine Octamer Bindungssequenz in die IL-9-Genregulation involviert (Zhu et al., 1996). Negative regulatorische Transkriptionsfaktoren, wie sie z. B. für die IL-2 und IL-4-Gentranskription nachgewiesen werden konnten, sind bisher für die IL-9-Genregulation nicht bekannt.

Über negative Transkriptionsmechanismen ist wenig bekannt. Induzierbare negativ regulatorische Faktoren wirken direkt auf aktivierende Transkriptionsfaktoren des entsprechenden Gens. Regulative Proteine, die Transkriptionsfaktoren inaktivieren können, müssen den Phosphatasen zugeordnet werden (Hill et al., 1995). Ein Beispiel für ein direkt wirkendes induzierbares inhibitorisches Protein ist das I κ B, das NF- κ B inaktiviert. Erst die Phosphorylierung des I κ B ermöglicht die Translokation des NF- κ B in den Kern und die DNA-Bindung (Hill et al., 1995). Wenn die Phosphorylierung des I κ B nicht ermöglicht wird, kann auch das IL-9-Gen nicht transkribiert werden. Andererseits könnte die Phosphorylierung des I κ B und die damit verbundene Aktivierung des NF- κ B die Transkription eines putativen negativen IL-9-Regulatorproteins bewirken.

Da nach den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen Hinweise vorliegen, daß das IL-9-Protein die Initiation seiner eigenen Gentranskription verhindert, handelt es sich bei der IL-9-Genregulation um eine negative Feedback Transkriptionskontrolle. Eine derartige Regulation der Gentranskription ist nach derzeitigem Wissensstand für kein anderes Cytokin bekannt.

Die Feedback-Kontrolle läuft über den IL-9-Rezeptor unter Einschaltung einer Signalkaskade. Katalytische Rezeptoren sind selbst Proteinkinasen oder sind mit Proteinkinasen assoziiert, die in der Zielzelle spezifische Gruppen von Proteinen phosphorylieren. Zwei Arten von Proteinkinasen sind an der Phosphorylierungskaskade beteiligt: Serin/Threonin-Kinasen, die Phosphatgruppen auf die Aminosäuren Serin oder Threonin übertragen, und Tyrosinkinasen, die Proteine an Tyrosinresten phosphorylieren. Der IL-9-Rezeptor gehört zur Gruppe der Tyrosinkinasen-assoziierten Rezeptoren (Yin et al., 1995) und enthält keine

Tyrosinkinase Domäne. Die assoziierten Kinasen des IL-9-Rezeptors gehören zur Janus-Familie, zu der JAK1, JAK2, -3, und TyK2 zählen. Der Rezeptor arbeitet wie Rezeptor-Tyrosinkinasen, nur daß die Kinasedomäne von einem unterschiedlichen Gen codiert wird und über nicht-kovalente Wechselwirkung mit der Rezeptor-Polypeptidkette verbunden ist. Die Beteiligung der JAK3 bei der IL-9-Signaltransduktion konnte belegt werden (Higuchi et al., 1996). Es konnte weiterhin eine konstitutive Assoziation des IL-9-Rezeptors mit JAK1 nachgewiesen werden (Demoulin et al., 1996). Eine identische Verbindung konnte für die β -Kette des IL-2-Rezeptors (Russel et al., 1994) gezeigt werden, im Gegensatz dazu bindet der IL-4-Rezeptor JAK1 lediglich in Anschluß an eine Ligandenbindung (Yin et al., 1995). Diese Tatsache bietet die Möglichkeit eines differierenden Pathways der IL-9-Signaltransduktion.

Die Assoziation einer JA-Kinase mit einem Rezeptor führt zur Phosphorylierung und aktiviert damit die katalytische Aktivität der Kinase. Anschließend erfolgt die Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors, wodurch die Bindungsstellen für die STAT-Transkriptionsfaktoren (signal transducers and activators of transcription) vorliegen. Die aktivierten JAK phosphorylieren und aktivieren im Fall der IL-9-Signaltransduktion die DNA-Bindungsproteine STAT1 (Yin et al., 1994), STAT3 (Yin et al., 1995) und STAT5 (Kirken et al., 1995).

Einen essentiellen Faktor für die IL-9-Signaltransduktion bildet ein Tyrosinrest an Position 116 des cytoplasmatischen Teils der α -Kette des IL-9-Rezeptors. Dieser Tyrosinrest wird nach einer IL-9-Bindung an den Rezeptor phosphoryliert. Im Gegensatz zu anderen Cytokinrezeptoren hat der IL-9R durch die Phosphorylierung nur eines Tyrosinrestes auch lediglich eine Bindungsstelle für die Proteine STAT1, STAT3, und STAT5. Die Aktivierung dieser Proteine korreliert nicht nur mit Transkriptionsinitiierung und einer antiapoptischen Aktivität, sondern auch mit einer IL-9 vermittelten Proliferationsregulation. Eine Beteiligung der STAT-Bindungsstellen an einer Proliferationskontrolle konnte weder für die β -Kette des IL-2R noch für den IL-4R nachgewiesen werden. Die IL-9-induzierte Proliferationsinhibition von mit hIL-9R-transfizierten murinen Lymphomzellen (Demoulin et al., 1996) macht deutlich, daß IL-9 de facto in der Lage ist, ein negativ wirkendes Signal zu vermitteln. Allerdings ist die Möglichkeit nicht auszuschließen, daß andere die IL-9-Transkription betreffende Pathways mit den STAT-Proteinen kooperieren können und sich dadurch eine durch STAT-Proteine vermittelte Transkriptionsinhibition ergibt.

Eine weitere Möglichkeit der Signalvermittlung von Cytokinrezeptoren bildet die Komplexbildung der STAT-Proteine mit einem Transkriptionsfaktor einer anderen Familie. Ein Beispiel stellt die IFN-Signaltransduktion mit der Bildung des Heterotrimers aus STAT1, STAT2 und p48, einem Protein aus der IRF-1 Transkriptionsfaktorfamilie (IFN regulatory factor) (Hill et al., 1995) dar. Auch die Promotorregion des IL-9-Gens weist eine Sequenz für diesen Transkriptionsfaktor auf (Renauld et al., 1990), allerdings wird STAT2 nicht von IL-9 aktiviert.

Eine effiziente Induktion der IL-9-mRNA Akkumulation besteht aus zwei Komponenten: Erstens aus einer Aufhebung der negativen Feedback-Regulation durch das Endprodukt, und zweitens aus einer bei der T-Zellaktivierung beziehungsweise mitogenen Stimulation erfolgenden Aktivierung. Eine wichtige Bedeutung für die Aufhebung der Feedback-Inhibition der IL-9-Synthese kommt dem IL-2-Protein zu.

Cytokine wirken letztlich nicht direkt, sondern indirekt, indem sie die Produktion der spezifischen DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren stimulieren oder inhibieren, die ihrerseits die Expression verschiedener Gene kontrollieren können. Transkriptionsfaktoren bilden somit die letzte Komponente in der langen Kette der Vorgänge, die mit der Bindung des Cytokins an seinen spezifischen Rezeptor auf der Zelloberfläche beginnt.

Die IL-2-vermittelte Signalkaskade beeinflusst direkt oder indirekt die IL-9-Genexpression. Es konnte gezeigt werden, daß IL-2 die Aktivierung von NF- κ B induziert (Arima et al., 1992). Wie bereits diskutiert wurde, ist NF- κ B für die Regulation der IL-9-Genexpression einer der bedeutendsten Transkriptionsfaktoren (Zhu et al., 1996).

Die Interpretation der in dieser Arbeit vorliegenden Daten macht deutlich, daß das Erreichen eines Schwellenwertes von IL-2-Protein im Verlaufe einer Stimulation der PBMC die Voraussetzung schafft, das Gleichgewicht der Feedback-Inhibition der IL-9-Synthese aufzuheben, um den Anstieg der IL-9-Expression zu ermöglichen.

Es war in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht möglich, die durch PHA-induzierte IL-9-mRNA Akkumulation durch einen IL-2-Antikörper innerhalb der ersten vier Stunden zu beeinflussen. Lediglich nach acht Stunden trat eine Inhibition der IL-9-Genexpression von 42%, im Vergleich mit der Expression aufgrund der mitogenen Stimulation ein. Dieser Befund könnte nahelegen, daß eine gewisse Anzahl von IL-2-Molekülen durch den Anti-

körper nicht blockiert wurde, und daß die durch diese Moleküle ausgelöste IL-2-Signaltransduktion ein für die Induzierung der IL-9-Genexpression ausreichendes Signal vermittelt. Im Verlauf der durch den IL-2-Antikörper verminderten Aktivität der IL-2-Signalkaskade könnte das Gleichgewicht der Regulation der IL-9-mRNA Akkumulation zu Gunsten der Feedback-Inhibition verändert werden, da der Schwellenwert der IL-2-Proteinkonzentration, der für eine effiziente Inhibitionsaufhebung nötig wäre, nicht erreicht wird.

IL-2 bindet einen hochaffinen spezifischen Rezeptorkomplex, der aus drei Untereinheiten, der α -, β - und γ -Kette besteht, die zusammen nur auf aktivierten T-Lymphozyten exprimiert werden. Die α -Kette ist zwar nicht in der Lage, ein IL-2-Signal zu vermitteln, sie ist indes entscheidend für die Formierung des heterotrimeren Rezeptorkomplexes (Hatakeyama et al., 1985, Greene et al., 1985). Daher verhindert die Blockierung der α -Kette gänzlich die IL-2-vermittelte Signaltransduktion und infolgedessen die IL-9-Transkription. Diese Tatsache wird durch die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse bestätigt, indem nach 24stündiger Inaktivierung des IL-2-Rezeptors nur noch 0,03% der IL-9-mRNA-Moleküle induziert wurden, die durch die mitogene Stimulation induzierbar sind.

Ein zweiter IL-2-Rezeptorkomplex bindet IL-2 mit geringerer Affinität und besteht nur aus der einer β - und einer γ -Kette. Dieser heterodimere Rezeptor wird allerdings nur bei einer hohen IL-2-Konzentration von $CD8^+$ und $CD56^+$ NK-Zellen und nicht von $CD4^+$ T-Zellen exprimiert (Sugamura et al., 1995). Da, wie auch die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen, nur $CD4^+$ T-Zellen IL-9 exprimieren, ist der Signalweg über den β/γ IL-2-Rezeptor für die IL-9-Genexpression irrelevant. So kann angenommen werden, daß ausschließlich die IL-2-Signaltransduktion über den $\alpha/\beta/\gamma$ -Rezeptorkomplex für die IL-9-Genexpression essentiell ist.

Die IL-4-Gentranskription wird über verschiedene Promotorelemente reguliert, die nach Bindung von entsprechend aktivierten oder neu synthetisierten Transkriptionsfaktoren zusammenwirken. Eine Verbindung zwischen Veränderungen der Interaktionen der Transkriptionsfaktorfamilien NF-AT und AP-1 mit den korrespondierenden Promotorregionen und einer deregulierten IL-4-Gentranskription konnte bereits gezeigt werden (Chan et al., 1996). Bei der IL-2 abhängigen Regulation der IL-4-Transkription (Houssiau et al., 1995) zeigt sich im Vergleich zur Regulation der IL-9-mRNA Synthese ein deutlicher Unterschied. Die IL-4-Genexpression wurde im Gegensatz zur IL-9-Transkription durch den α

IL-2-Antikörper und durch den α IL-2-Rezeptor α -Antikörper gleich stark inhibiert. Jedenfalls ist im Falle der IL-4-Genregulation auch eine eventuell nicht vollständige Inaktivierung des IL-2-Proteins ausreichend, um die Transkription des IL-4-Gens zu verhindern. Der Schwellenwert der IL-2-Proteinkonzentration, die notwendig ist, um eine IL-2-abhängige IL-4-Genexpression zu induzieren, liegt also wesentlich höher als bei der IL-9-Synthese. Zum Beispiel könnte aufgrund eines nicht ausreichenden spezifischen IL-2-Signals eine schwächere Aktivität der verstärkenden Transkriptionsfaktoren verantwortlich für eine Hyperaktivität der repressiven Faktoren und einer damit verbundenen inhibierten IL-4-Genexpression sein. Eine derartige Wirkung wäre bei einer eingeschränkten Aktivität des IL-2-Proteins und bei einer Inaktivierung des Rezeptors gleichermaßen effektiv.

Darüber hinaus haben verschiedene Untersuchungen gezeigt, daß Stärke und/oder Dauer einer Aktivierung Einfluß auf die Signaltransduktion und damit auf die Induktion verschiedener Gene haben können (Dikic et al., 1994, Marshall, 1995). So ist es also durchaus denkbar, daß Unterschiede in der IL-2-Signalintensität zu qualitativen Unterschieden in bezug auf die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren und infolgedessen zu differentieller Geninduktion führen können.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Zum besseren Verständnis der Physiologie von IL-9 wurden in dieser Arbeit Untersuchungen zur IL-9-Genregulation durchgeführt. Die Regulation von IL-9 wurde unter anderem durch den Vergleich mit der Expression anderer Cytokine gleicher zellulärer Herkunft nach mitogener Stimulation untersucht. Viele Funktionen verschiedener Zelltypen lassen sich besonders gut erkennen, wenn man ihre Rolle unter pathologischen Bedingungen prüft. Mit diesem Ansatz wurde auch die Bedeutung von IL-9 untersucht. Als Modell wurde die Hausstauballergie mit asthmatischer Komponente vor und nach desensibilisierender Immuntherapie gewählt.

Alle Untersuchungen wurden wegen der höheren Empfindlichkeit vornehmlich auf RNA-Ebene durchgeführt. Dabei sollte mit Hilfe der PCR nicht nur eine rein qualitative Beschreibung, sondern eine quantitative Aussage über die Cytokinexpression in PBMC getroffen werden. Hierzu wurde eine Methode zur Quantifizierung von mRNA Molekülen mittels kompetitiver RT-PCR etabliert.

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, daß die Expression der T_{H2} -Cytokine IL-4, IL-5 und IL-9 in PBMC nach der Immuntherapie bei 7 bis 9 Patienten deutlich reduziert wurde. Die Expression der IFN- γ mRNA stieg nach der Therapie in den meisten Fällen an oder blieb unverändert. Die gefundenen Veränderung der Cytokinexpression nach einer Immuntherapie lassen sich mit einer Verschiebung der $CD4^+$ -T-Zell-Cytokinexpression vom T_{H2} -Profil zum T_{H1} - beziehungsweise zum T_{H0} -Profil erklären.

Die Ergebnisse zeigen weiterhin, daß die Kinetik der IL-9-Proteinexpression mit einer gewissen zeitlichen Latenz der Kinetik der RNA-Expression folgt. Durch diesen Befund läßt sich ausschließen, daß wesentliche Elemente der IL-9-Regulation auf der translationellen oder post-translationellen Ebene stattfinden.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte erstmals die Verminderung der IL-9-Genexpression durch die Zugabe von rh IL-9 nachgewiesen werden. Da die simultan untersuchte IL-2-Genexpression zu keinem Zeitpunkt durch das IL-9 beeinflusst wurde, handelt es sich um einen spezifisch die IL-9-Genregulation betreffenden Mechanismus. Die Zugabe von IL-9-Antikörpern zu nicht stimulierten PBMC induziert die IL-9-mRNA-Expression in einem Ausmaß, das die Genexpression aufgrund einer mitogenen Stimulation übersteigt. Da es infolge der IL-9-Antikörper auch ohne eine mitogene Stimulation zu einer Verstärkung der

Akkumulation der IL-9-mRNA kommt, handelt es sich um einem spezifischen über den IL-9-Rezeptor vermittelten Effekt. Während einer mitogenen Stimulation mit PHA bewirken die IL-9-Antikörper ein zusätzliches Ansteigen der IL-9-mRNA-Moleküle. Somit bieten IL-9-Antikörper neben IL-2, IL-4 und IL-10 eine weitere, bislang nicht beschriebene Möglichkeit, die IL-9-Expression zu steigern.

Die hier vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß in nicht stimulierten PBMC das IL-9-Protein gebildet wird, und daß die lokale Konzentration dieses IL-9 ausreicht, um eine maximale Inhibition der IL-9-mRNA-Expression aufrechtzuerhalten. Im nicht stimulierten Zustand befindet sich das Gleichgewicht der Inhibition der IL-9-Synthese demnach auf der Seite einer maximalen Inhibition. Da das IL-9-Protein die Initiation seiner eigenen Gentranskription weitgehend verhindert, besteht bei der IL-9-Genregulation eine negative Feedback Transkriptionskontrolle. Eine derartige Regulation der Gentranskription ist nach derzeitigem Wissensstand für kein anderes Cytokin bekannt.

Um eine effiziente Induktion der IL-9-mRNA Akkumulation im Verlaufe einer Stimulation möglich zu machen, muß die negativen Feedback-Regulation aufgehoben, oder zumindest reduziert werden. Eine wichtige Bedeutung für die Aufhebung dieser Feedback-Inhibition der IL-9-Synthese kommt dem IL-2-Protein zu. Die Interpretation der in dieser Arbeit vorliegenden Daten macht deutlich, daß das Erreichen eines Schwellenwertes von IL-2-Protein im Verlaufe einer Stimulation der PBMC die Voraussetzung schafft, die Feedback-Inhibition der IL-9-Synthese aufzuheben, um den Anstieg der IL-9-Expression zu ermöglichen.

8 ANHANG

8.1 LITERATURVERZEICHNIS

- Abu-Ghazaleh, R., Fujisawa, T., Mestecky, J., Kyle, R. A., Gleich, G. J., IgA-induced eosinophil degranulation, *J. Immunol.*, 142: 2393-2400, 1989.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D., *Molekularbiologie der Zelle*, VCH Verlagsgesellschaft mbH 1995.
- Andersson, U., Matsuda, T., Human interleukin 6 and tumor necrosis factor a production studied at a single-cell level, *Eur. J. Immunol.*, 19: 1157-1160, 1989.
- Arai, N., Nomura, D., Villaret, D., De Waal Malefijt, R., Seiki, M., Yoshida, M., Minoshima, S., Fukuyama, R., Maekawa, M., Kudoh, J., Shimizu, N., Yokota, K., Abe, E., Yokota, T., Takebe, Y., Arai K., Complete nucleotide sequence of the chromosomal gene for human IL-4 and its expression, *J. Immunol.* 142: 274-276, 1989.
- Arima, N., Kuziel, W. A., Gardina, T. A., Greene, W. C., IL-2-induced signal-transduction involves the activation of nuclear NF- κ B expression, *J. Immunol.* 149: 83-86, 1992.
- Auble, D. T., Hahn, S., An ATP-dependent inhibitor of TBP binding to DNA, *Genes Dev.* 7: 844-856, 1993.
- Barnes, P. F., Abrams, J. S., Lu, S., Sieling, P. A., Rea, T. H., Modlin R. L., Patterns of cytokine production by Mycobacterium-reactive human T-cell clones, *Infec. Immun.* 61: 197-203, 1993.
- Bazan, J. F., Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6934-6838, 1990.
- Bousquet, J., Des Roches, A., Paradis, L., Dhivert, H., Michel, F., Specific immunotherapy in house dust mite allergy, *Clin. Reviews in Allergy and Immunol.* 13: 151-159, 1995.
- Bousquet, J., Michel, F. B., Specific immunotherapy in asthma. Is it effective?, *J. Allergy Clin. Immunol.* 94: 1-11, 1994.
- Boussiotis, V. A., Barber, D. L., Nakarai, T., Freeman, G. J., Gribben, J. G., Bernstein, G. M., D'Andrea, A. D., Ritz, J., Nadler, L. M., Prevention of T cell anergy by signaling through the γ chain of the IL-2 receptor, *Science* 266: 1039, 1994.
- British Thoracic Society, Guidelines für management of asthma in adults, I-chronic persistent asthma, *British Med. J.* 301: 651, 1990.
- British Thoracic Society, Guidelines für magagement of asthma in adults, II-acute-severe asthma, *British Med. J.* 301: 797, 1990.
- Buratowski, S., The basics of basal transcription by RNA polymerase II, *Cell* 77: 1-3, 1994.
- Butterworth, A. E., Remold, H. G., Houba, V., David, J. R., Ranks, D., David, P. H., Strurrock, R. F., Antibody-dependent eosinophil mediated damage to ⁵¹Cr-labelled schistosomula of *Schistosoma mansoni*: mediation by IgG, and inhibition by antigen-antibody complexes, *J. Immunol.* 118: 2230-2236, 1977.
- Capron, M., Spiegelber, H. L., Prin, L., Bennich, H., Butterworth, A. E., Pierce, R. J., Ouaissi, M. A., Capron, A., Role of IgE receptors in effector function of human eosinophils, *J. Immunol.* 132: 462-468, 1984.
- Chan, S. C., Brown, M. A., Willcox, T. M., Li, S. H., Stevens, S. R., Tara, D., Hanifin, J. M., Abnormal IL-4 gene expression by atopic dermatitis T lymphocytes is reflected in altered nuclear protein interactions with IL-4 transcriptional regulatory element, *J. Invest. Dermat.* 106: 1131-1136, 1996.
- Clerici, M., Shearer, G. M., A TH1-TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection, *Immunol. Today* 14: 107-111, 1993.
- Clerici, M., Shearer, G. M., The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights, *Immunol. Today* 15, No.12: 575-581, 1994.

- Coffman, R.L., Chatelain, R., Leal LMCC., Varkila, K., Leishmania major infection in mice: a model system for study of CD4+ T-cell subset differentiation, *Res. Immunol.* 142: 36-39, 1991.
- Cousins, D. J., Staynov, D. Z., Lee, T. H., Regulation of interleukin 5 und granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression, *Am. J. Respi. Crit. Care. Med.* 150: 50-53, 1994.
- D'Andrea, A. M., Rengaraju, M., Valiante N. M., Chehimi, J., Kubin, M., Aste, M., Chan S.H., Kobayashi, M., Young, D., Nickbarg, E., Wolf, S. F., Trinchieri, G., Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells, *J. Exp. Med.* 176: 1387-1389, 1992.
- De Las Marinas, M. D., Sanz, M., Latasa, M., IgE synthesis suppressor factor: modifications in the course of longterm immunotherapy, *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 3: 80-85, 1993.
- Del Prete, G., De Carli, M., Almerigogna, F., Daniel, C. K., D'Ellios, M., Zanguoghi, G., Vinante, F., Pizzolo, S., Romagnani, S., Preferential expression of CD30 by human CD4+ T cells producing Th2-type cytokines, *FASEB J.* 9: 81, 1995.
- Del Prete, G., Maggi, E., Parronchi, P., Chretien, I., Tiri, A., Macchia, D., Ricci, M., Banche-reau, J., de Vries, J., Romagnani, S., IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants, *J. Immunol.* 140: 4193-4198, 1988.
- Demoulin, J. B., Uyttenhove, C., van Roost, E., DeLestre, B., Donchers, D., van Snick, J., Ranauld, J. C., A single tyrosine of the IL-9 receptor is required for STAT activation, anti-apoptotic activity, and growth regulation by IL-9, *Mol. Cell Biol.* 16: 4710-4616, 1996.
- Dikic, I., Schlessinger, J., Lax, I., PC12 cells overexpressing the insulin receptor undergo insulin dependent neuronal differentiation, *Current Biol.* 4: 702-708, 1994.
- Donahue, R. E., Yang, Y. C., Clark, S. C., Human P40 T cell growth factor (IL-9) supports erythroid colony formation, *Blood* 75: 2271-2275, 1990.
- Druetz, C., Coulie, P., Uyttenhove, C., van Snick, J., Functional and biochemical characterization of mouse P40/IL-9 receptors, *J. Immunol.* 145: 2494-2499, 1990.
- Dugas, B., Renauld, J. C., Pène, J., Bonnefoy, J. Y., Peti-Frère, C., Braquet, P., Bousquet, P., Bousquet, J., van Snick, J., Mencia-Huerta, J. M., Interleukin 9 potentiates the interleukin 4 induced immunoglobulin (IgG, IgM and IgE) production by normal human B lymphocytes, *Eur. J. Immunol.* 23: 1687-1692, 1993.
- Eklund, K., Ghildyal, N., Austen, K. F., Stevens, R. L., Induction by IL-9 and suppression by IL-3 and IL-4 of the levels of chromosome 14-derived transcripts that encode late-expressed mouse mast cell proteases, *J. Immunol.* 151: 4266-4273, 1993.
- Else, K. J., Finkelman, F. D., Maliszewski, C. R., Grecis, R. K., Cytokine-mediated regulation of chronic intestinal helminth infection, *J. Exp. Med.* 179: 347-351, 1994.
- Esnauld, S., Benbernou, N., Lavaud, F., Shin, H. C., Potron, G., Differential spontaneous expression of mRNA for IL-4, IL-10, IL-13, IL-2 and interferon γ in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from atopic patients, *Clin. Exp. Immunol.* 103:111-118, 1996.
- Fadal, R. G., Nalebuff, D. J., A study of optimum dose immunotherapy in pharmacological treatment failures, *Arch. Otolaryngol.* 106: 38-43, 1980.
- Ferre F., Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth, *PCR Methods and Applications* 2: 1-9, 1992.
- Fujita, T., Structure of the human Interleukin 2 gene, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 80:7437-41, 1983
- Gajewski, T. F., Joyce, J., Fitch, F. W., Anti-proliferative effect of IFN- γ in immune regulation. III. Differential selection of TH1 and TH2 murine helper T lymphocyte clones using recombinant IL-2 and recombinant IFN- γ , *J. Immunol.* 143: 15-22, 1989.
- Garcia-Ortega, P., Merelo, A., Marrugat, J., Richart, C., *Chest* 103: 183-187, 1993.

- Gauchat, J-F., Gascan, H., de Waal Malefyt, R., de Vries, J. E., Regulation of germ-line ϵ transcription and induction of ϵ switching in cloned EBV-transformed and malignant human B cell lines by cytokines and CD4+ T cells, *J. Immunol.* 148: 2291-2299, 1992.
- Gieni, R. S., Yang, X., HayGlass, K., Allergen-specific modulation of cytokine synthesis pattern and IgE responses in vivo with chemical modified allergen, *J. Immunol.* 150: 302-310, 1993.
- Giri, J. G., Ahdieh, M., Eisenman, J., Shanebeck, K., Grabstein, K., Kumaki, S., Namen, A., Park, L., Cosman, D., Anderson, D., Utilization of the β and γ chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15, *EMBO J.* 13: 2822, 1994.
- Giri, J., Anderson, D. M., Kumaki, S., Park, L. S., Grabstein, K. H., Cosman, D., IL-15, a novel T cell growth factor that shares activities and receptor components with IL-2, *J. Leukoc. Biol.* 57(5): 763-766, 1995.
- Greene, W. C., Robb, R. J., Svetlik, P. B., Rusk, G. M., Depper, J. M., Leonard, W. J., Stable expression of cDNA encoding the human interleukin 2 receptor in eukaryotic cells, *J. Exp. Med.* 162: 363-368, 1985.
- Gruss, H. J., Brach, M. A., Drexler, H. G., Bross, K. J., Herrman, F., Interleukin 9 is expressed by primary and cultured Hodgkin and Reed-Sternberg cells, *Cancer Res.* 52: 1026-1031, 1992.
- Haanen, J. B., de Waal Malefijt, R., Res, P. C., de Vries, R. R., Spits, H., Selection of a human T helper type 1-like T cell subset by Mycobacteria, *J. Exp. Med.* 174: 583-592, 1991.
- Hamann, D., Hilken, C., Grogan, J., Lens, S., Kapsenberg, M., Yazdanbakhsh, M., van Lier, R., CD30 expression does not discriminate between human Th1- and Th2-type T cells, *J. Immunol.* 156: 1387-1391, 1996.
- Hamid, Q., Azzawi, M., Ying, S., Moqbel, R., Wardlaw, A. J., Corrigan, C. J., Durham, S. R., Kay, A. B., Expression of mRNA for interleukin 5 in mucosal bronchial biopsies from asthma, *J. Clin. Invest.* 87: 1541-1546, 1991.
- Hamid, Q., Schotman, E., Jacobson, M. R., Walker, S. M., Durham, S. R., Increases in interleukin 12 mRNA cells accompany inhibition of allergen induced late skin response following successful grass pollen immunotherapy, *J. Clin. Immunol.* 1995.
- Hatakeyama, M., Kono, T., Kobayashi, N., Kawahara, A., Levin, S. D., Perlmutter, R. M., Taniguchi, T., Interaction of the IL-2 receptor with the src-family kinase p56^{lck}: identification of novel intermolecular association, *Science* 252: 1523-1528, 1991.
- Hatakeyama, M., Minamoto, S., Uschiyama, T., Hardy, R., Yamada, G., Reconstitution of functional receptor for human Interleukin 2 in mouse cells, *Nature* 318:467-470, 1985.
- Hatakeyama, M., Tsudo, M., Minamoto, S., Kono, T., Doi, T., Miyata, T., Miyasaka, M., Taniguchi, T., Interleukin 2 receptor β chain gene: generation of three receptor forms by cloned human α and β chain cDNAs, *Science* 244: 551-556, 1989.
- Henney, C. S., Kuribayashi, K., Kern, D. E., Gillis, S., Interleukin 2 augments natural killer cell activity, *Nature* 291: 335-338, 1981.
- Herrmann, F., Cannistra, S. A., Levine, H., Griffin, J. D., Expression of interleukin 2 receptors and binding of interleukin 2 by γ interferon-induced human leukemic and normal monocytic cells, *J. Exp. Med.* 162: 1111-1116, 1985.
- Higuchi, M., Asao, H., Tanaka, N., Oda, K., Takeshita, T., Nakamura, M., van Snick, J., Sugamura, K., Dispensability of Jak1 tyrosinkinase of IL-2-induced cell growth signaling in human T cell line, *Eur. J. Immunol.* 26: 1322-1327, 1996.
- Hill, C. S., Treisman, R., Transcriptional regulation by extracellular signals: Mechanismen and specificity, *Cell* 80: 199-211, 1995.

- Horak, I. D., Gress, R. E., Lucas, P. J., Horak, E. M., Waldmann, T. A., Bolen, J. B., T-lymphocyte interleukin 2-dependent tyrosine protein kinase signal transduction involves the activation of p56^{lck}, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1996-2000, 1991.
- Houssiau, F., J.-C. Renauld, W. Fibbe and J. van Snick, IL-2 dependence of IL-9 expression in human T-lymphocytes, *J. Immunol.* 148: 3147-3151, 1992.
- Houssiau, F., L. Schandene, M. Stevens, C. Cambiaso, M. Goldmann, J. van Snick, J.-C. Renauld, A cascade of cytokines is responsible for IL-9 expression in human T cells: involvement of IL-2, IL-4, and IL-10, *J. Immunol.* 154: 2624-30, 1995.
- Houssiau, F., Renauld, J.-C, M. Stevens, F. Lehmann, B. Lethe, P. G. Coulie, and J. van Snick, Human T cell lines and clones respond to IL-9, *J. Immunol.* 150: 2634-2640, 1993.
- Howard, M., Farrar, J., Hilfiker, M., Johnson, B., Takatsu, K., Hamaoka, T., Paul, W. E., Identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from interleukin 2, *J. Exp. Med.* 155: 914-919, 1982.
- Hsieh, C-S., Heimberger, AB., Gold, JS., O'Garra, A., Murphy KS., Differential regulation of T helper phenotype development by IL-4 and IL-10 in an $\alpha\beta$ -transgenic system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6065-6069, 1992.
- Hültner, L., Druez, C., Möller, J., Uyttenhove, C., Schmidt, E., Rüde, E., Dörmer, P., van Snick, J., Mast cell growth-enhancing activity (MEA) is structurally related and functionally identical to novel mouse T cell growth factor P40/TCGFIII (Interleukin 9), *Eur. J. Immunol.* 20:1413-1416, 1990
- Ibelgaufts, H., Cytokines, VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1995.
- Isakson, P., Pure, E., Vitetta, E. S., Krammer, P. H., T cell-derived B cell differentiation factor(s): effect on the isotype switch of murine B cells, *J. Exp. Med.* 155:734, 1982.
- Jain, J., Loh, C., Rao, A., Transcriptional regulation of the IL-2 gene, *Curr. Opin. Immunol.* 7: 333-342, 1995.
- Janeway, C. A., Traves, P., Immunologie, Spektrum Verlag, 1995.
- Jutel, M., Pichler, W. J., Skrbic, D., Urwyler, A., Dahinden, C., Muller, U. R., Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN- γ secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures, *J. Immunol.* 154: 4187-4194, 1995.
- Kelleher K., K. Bean, S. C. Clark, W. Y. Leung, T. L. Yang-Feng, J. W. Chen, P. F. Lin, W. Lou, and Y.C. Yang, Human Interleukin 9: genomic sequence, chromosomal location, and sequence essential for its expression in human T cell leukemia virus (HTLV)-T-transformed human cells, *Blood* 77: 1436-1441, 1991.
- Kimura, Y., Takeshita, T., Kondo, M., Ishii, M., Nakamura, M., van Snick, J., Sugamura, K., Sharing of the IL-2 receptor γ chain with the functional IL-9 receptor complex, *Int. Immunol.* 7: 115-120, 1995.
- Kirken, R., Rui, H., Malabarba, G., Howard, Z., Kawamura, M., O'Shea, J., Farrar, W., Activation of JAK3, but not JAK1 is critical for IL-2-induced proliferation and STAT5 recruitment by a COOH-terminal region of the IL-2 receptor β -chain, *Cytokine* 7: 689-700, 1995.
- Kishimoto, T., Taga, T., Akira, S., Cytokine signal transduction, *Cell* 76: 253-262, 1994.
- Kita, H., Weiler, D. A., Abu-Ghazaleh, R., Sanderson, C. J., Gleich, G. J., Release of granule proteins from eosinophils cultured with IL-5, *J. Immunol.* 149: 629-635, 1992.
- Kondo, M., Takeshita, T., Higuchi, M., Nakamura, M., Sudo, T., Nishikawa, S., Sugamura, K., Functional participation of the IL-2 receptor γ chain in IL-7 receptor complex, *Science* 263: 1453-1454, 1994.
- Kondo, M., Takeshita, T., Ishii, N., Nakamura, M., Watanabe, S., Arai, K., Sugamura, K., Sharing of the Interleukin 2 receptor γ chain between receptors for IL-2 and IL-4, *Science* 262: 1874-1877, 1993.

- Kopf, M., Le Gros, G., Bachmann, M., Lamers, MC., Bluthmann, H., Kohler, G., Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses, *Nature* 362: 245-248, 1993.
- Lenardo, M. J., Interleukin 2 programs mouse $\alpha\beta$ T lymphocytes for apoptosis, *Nature* 353: 858-861, 1991.
- Li-Weber M., Eder, A., Krafft-Czepa, H., Krammer, P.H., T cell specific negative regulation of transcription of human cytokine IL-4, *Immunol.* 148: 1913-1918, 1992.
- Li-Weber M., Krafft, H., Krammer, P.H., A novel enhancer element in the human IL-4 promotor is suppressed by a position-independent silencer, *J. Immunol.* 151: 1371-1382, 1993.
- Locksley, R. M., Heinzel, F. P., Holaday, B. J., Mutha, S. S., Reiner, S. L., Sadick, M. D., Induction of TH1 and TH2 CD4⁺ subsets during murine *Leishmania major* infection, *Res. Immunol.* 142: 28-31, 1991.
- Louahed, J., Kermouni, A., van Snick, J., Renaud J-C., IL-9 induces expression of granzymes and high-affinity IgE receptor in murine T helper clones, *J. Immunol.* 154: 5061-5070, 1995.
- Loughnan, M. S., Nossel, G. J., Interleukin 4 and 5 control expression of IL-2 receptor on murine B cells through independent induction of its two chains, *Nature* 340: 76, 1989.
- Maggi, E., Giudizi, M. G., Biagiotti, R., Annunziato, F., Manetti, R., Piccinni, M-P., Parronchi, P., Sampognaro, S., Giannarini, L., Zuccati, G., Romagnani, S., Th2-like CD8⁺ T cells showing B cell helper function and reduced cytolytic activity in Human Immunodeficiency Virus Type 1 infection, *J. Exp. Med.* 180: 489-495, 1994.
- Maggi, E., Reciprocal regulatory role of IFN- γ and IL-4 on the *in vitro* development of human Th1 and Th2 clones, *J. Immunol.* 148: 2142-2147, 1992.
- Malkovsky, M., Loveland, B., North, M., Asherson, G. L., Gao, L., Ward, P., Fiers, W., Recombinant interleukin 2 directly augments the cytotoxicity of human monocytes, *Nature* 325: 262, 1987.
- Manetti, R., Parronchi, P., Giudizi, M-G., Piccinni, M-P., Maggi, E., Trinchieri, G., Romagnani, S., Natural killer cell stimulatory factor (Interleukin 12) induces T helper type (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells, *J. Exp. Med.* 177: 1199-1204, 1993.
- Maniatis, T., Samrock, J., Fritsch, E. F., *Molecular Cloning, A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1991.
- Marsh, D. G., Neely, J. D., Breazeale, R., Ghosh, B., Freidhoff, L. R., Ehrlich-Kautzy, E., Schou, C., Krishnaswamy, G., Beaty, T. H., Linkage analysis of IL-4 and other chromosome 5q31-1 markers and total serum IgE concentration, *Science* 264: 1152-1156, 1994.
- Marshall, C. J., Specificity of receptor tyrosine signalling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation, *Cell* 80, 1995.
- Matsui, H., Molecular cloning and expression of the human Interleukin 2 gene, *Lymphokines* 12: 1-12, 1985.
- McCaffrey, P. G., Luo, C., Kerppola T. K., Isolation of the cyclosporin-sensitive T cell transcription factor AFATp, *Science* 262: 750-754, 1993.
- McMEnamin, C., Holt, P. C., The natural immune response to inhaled soluble protein allergen involves MHC class-I restricted CD8⁺ T cell-mediated, but MHC-class-II-restricted CD4⁺-T-cell-dependent immune deviation resulting in selective suppression of IgE production, *J. Exp. Med.* 178: 889-897, 1993.
- Merz, H., Houssiau, F.A., Orscheshek, K., Renaud, J.-C., Fliedner, A., Herin, M., Noel, H., Kadin, M., Mueller-Hermeling, H. K., van Snick, J., Feller, A.C., Interleukin 9 expression in human malignant lymphomas: unique association with Hodgkin's disease and large anaplastic lymphoma, *Blood* 78: 1311, 1991.

- Meyers, D., Postma, D. S., Panhuysen, C., Amelung P. J., Levitt, R. C., Bleeker, E. R., Evidence for a locus regulating serum IgE levels mapping to chromosome 5, *Genomics* 23: 464-470, 1994.
- Modi, W.S., Pollock, D.D., Mock, B.A., Banner, C., Renauld, J.-C., van Snick, J., Regional localisation of the human glutaminase (GLS) and Interleukin 9 (IL-9) genes by in situ hybridization, *Cytogenet. Cell Genet.* 57: 114-116, 1991.
- Möller, J., Hültner, L., Schmidt, E., Dörmer, P., Partial purification of a mast cell growth-enhancing activity and its separation from IL-3 and IL-4, *J. Immunol.* 142: 3447-3451, 1989.
- Morgan, D. A., Ruscetti, F. W., Gallo, R., Selective in vivo growth of T lymphocytes from normal bone marrows, *Science* 193: 1007-1008, 1976.
- Mori, A., Suko, M., Tsuruoka, N., Kaminuma, O., Ohmura, T., Nishizaki, Y., Okudaira, H., Allergen-specific human T cell clones produce interleukin 5 upon stimulation with the Th1 cytokine interleukin 2, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107: 220-222, 1995.
- Mosmann, T. R., Sad, S., The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more, *Immunol. Today* 140: 3, 1996.
- Mosmann, TR., Coffman, RL., Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead of different functional properties, *Annu. Rev. Immunol.* 7: 145-173, 1989.
- Müller, W., Kühn, R., Rajewsky, K., Major histocompatibility complex class II hyperexpression on B cells in interleukin 4-transgenic mice does not lead to B cell proliferation and hypergammaglobulinemia, *Eur. J. Immunol.* 21: 921, 1991.
- Nakamura, Y., Russell, S. M., Mess, S. A., Friedmann, M., Erdos, M., Francois, C., Jacques, Y., Adelstein, S., Leonard, W. J., Heterodimerization of the IL-2 receptor β - and γ -chain cytoplasmatic domains is required for signalling, *Nature* 369: 330-333, 1994.
- Navarro, S., Debili, N., Bernaudin, J-F., Vainchenker, w., Doly, J., Regulation of the expression of IL-6 in human monocytes, *J. Immunol.*, 142: 4339-4345, 1989.
- Neerven, J., Ebner, C., Yssel, H., Kapsenberg, M., Lamb, J., T-cell responses to allergens: epitope-specificity and clinical relevance, *Immunol. Today*, 17: 526-532, 1996.
- Noguchi, M., Nakamura, Y., Russell, S. M., Ziegler, S. F., Tsang, M., Cao, X., Leonard, W. J., Interleukin 2 receptor γ chain: a functional component of the Interleukin 7 receptor, *Science* 262: 1877-1880, 1993.
- O'Hehier, R. E., Yssel, H., Verma, S., de Vries, J. E., Spits, H., Lamb, J. R., Clonal analysis of differential lymphokine production in peptide and superantigen induced T cell anergy, *Int. Immunol.* 1: 819, 1991.
- Ohnishi, T., Kita, H., Weiler, D., Sur. S., Sedgwick, J. B., Calhoun, W. J., Busse, W. W., Abrans, J. S., Gleich, G. J., IL-5 is the predominant eosinophil-active cytokine in the antigen-induced pulmonary late phase reaction, *Am. Rev. Respir. Dis.* 147: 901-907, 1993.
- Paganelli, R., Scala, E., Capobianchi, M. R., Selective deficiency of IFN- γ production in the hyper-IgE syndrome. Relationship to in vitro IgE synthesis, *Clin. Exp. Immunol.* 84: 28-33, 1991.
- Parronchi, P., Maccia, D., Piccinni, M-P., Biswas, P., Simonelli, C., Maggi, E., Ricci, M., Ansari, A. A., Romagnani, S., Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4538-4542, 1991.
- Paul, W. E., Interleukin 4: a prototypic immunoregulatory lymphokine, *Blood* 77: 1859, 1991.
- Pene, J., Rivier, A., Lagier, B., Differences in IL-4 release by PBMC are related with heterogeneity of atopy, *Immunol.* 81: 58-64, 1994.

- Pene, J., Rousset, F., Briere, F., Chretien, I., Bonnefoy, J-Y., Spits, H., Yokota, T., Arai, N., Arai, E., Banchereau, J., de Vries, J., IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferon α and γ and prostaglandin E₂, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6880-6884, 1988.
- Piatak, M., Ka-Cheung, L., Williams, B., Lifson, J. D., Quantitative competitive Polymerase Chain Reaction for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species, BioTechniques 14: 70-80, 1993.
- Punnonen, J., Aversa, G., Cokcs, B. G., McKenzie, A. N. J., Menon, S., Zurawski, G., de Waal Malefyt, R., de Vries, J., Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 3730-3734, 1993.
- Renauld, J.-C., A. Goethals, F. Houssiau, E. van Roost and J. van Snick, Cloning and expression of a cDNA for the human homolog of mouse T cell and mast cell growth factor P40, Cytokine 2: 9-12, 1990.
- Renauld, J.-C., A. Goethals, F. Houssiau, H. Merz, E. van Roost and J. van Snick, Human P40/IL-9 - Expression in activated CD4⁺ T cells, genomic organisation, and comparison with the mouse gene, J. Immunol. 144: 4235-4241, 1990.
- Renauld, J.-C., F. Houssiau, J. Louahed, A. Vink, J. van Snick and C. Uyttenhove, Interleukin 9, Advances Immunol. 54, 1993.
- Renauld, J.-C., Druetz, C., Kermouni, A., Houssiau, F., Uyttenhove, C., van Roost, E., van Snick, J., Expression cloning of the murine and human interleukin 9 receptor cDNAs, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5690-5694, 1992.
- Renauld, J.-C., Kermouni A., Vink, A., Louahed, J., van Snick, J., Interleukin 9 and its receptor, involvement in mast cell differentiation and T cell oncogenesis, J. Leuk. Biol. 57: 353-360, 1995.
- Ricci, M., IL-4: A key cytokine in atopy, Clin. Exp. Allergy 24: 801-812, 1994.
- Robinson, D. S., Hamid, Q., Ying, S., Tscipoulos, A., Barkans, J., Bentley, A. M., Corrigan, C. J., Durham, S. R., Kay, A. B., Predominant Th2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma, N Engl. J. Med. 326: 295-304, 1992.
- Rocklin, R. E., Sheffler, A. L., Greineder, D. K., Generation of antigen-specific suppressor cells during allergy desensitization, N Engl. J. Med. 302: 1213-1219, 1980.
- Romagnani, S., Induction of Th1 and Th2 response: a key role for the 'natural' immune response? Immunol. Today 13: 379-380, 1992.
- Romagnani, S., Lymphokine production by human T-cells in disease states, Ann. Rev. Immunol. 12: 227-57, 1994.
- Russell, S. M., Keegan, A. D., Harada, N., Nakamura, Y., Noguchi, M., Leland, P., Freidmann M. C., Miyajima, A., Puri, R. K., Poul W. E., Leonard, W. J., Interleukin 2 receptor γ chain: a functional component of the Interleukin 4 receptor, Science 262: 1800-1883, 1993.
- Sanger, T., S. Nicklen, A.R. Coulson, DNA sequencing with chain terminating inhibitors, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467, 1977.
- Schmidt, E., van Brandwijk, R., van Snick, J., Siebold, B., Rude, E., TCGFIII/P40 is produced by naive murine CD4⁺ T cells but is not a general T cell growth factor, Eur. J. Immunol. 19: 2167-2170, 1989.
- Secrist, H., Chelen, C. J., Wen, Y., Marshall, J. D., Umetsu, D. T., Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4⁺ T cells from allergic individuals, J. Exp. Med. 178: 2123-2130, 1993.
- Secrist, H., DeKruyff, R. H., Umetsu, D. T., Interleukin 4 production by CD4⁺ T cells from allergic individuals is modulated by antigen concentration and antigen presenting cell type, J. Exp. Med. 181: 1081-1089, 1995.

- Shows, T. Interleukin 2 (IL-2) is assigned to human chromosome 4, *Som. Cell. Mol. Genet.* 10: 315-318, 1984.
- Simpson, R. J., Moritz, R. L., Gorman, J. J., van Snick, J., Complete amino acid sequence of a new murine T-cell growth factor P40, *Eur. J. Biochem.* 183, 715-722, 1989.
- Smith, K. A., Interleukin 2: inception, impact, and implications, *Science* 240: 1169-1176, 1988.
- Spriggs, M., Armitage, R. J., Strockbine, L., Clifford, N., Macduff, B., Sato, T., Maliszewski, C. R., Fanslow, W. C., Recombinant human CD40 ligand stimulates B cell proliferation and immunoglobulin E secretion, *J. Exp. Med.* 176: 1543-1550, 1992.
- Suda, T., Murray, R., Fischer, M., Tokota, T., Zlotnik, A., Tumor necrosis factor- α and P40 induce day 15 murine fetal thymocyte proliferation in combination with IL-2, *J. Immunol.* 144: 1783-1787, 1990.
- Sugamura, K., Asao, H., Kondo, M., Tanaka, N., Ishii, N., Nakamura, M., Takeshita, T., The common γ chain for multiple cytokine receptors, *Advances Immunol.* 59: 225-277, 1995.
- Sugamura, K., Nakai, S., Fujii, M., Hinuma, Y., Interleukin 2 inhibits in vitro growth of human T cell lines carrying retrovirus, *J. Exp. Med.* 161: 1243, 1985.
- Suzuki, R., Handa, K., Igoh, K., Kumagai, K., Natural killer (NK) cells as a responder to interleukin 2 (IL 2). I. Proliferative response and establishment of cloned cells, *J. Immunol.* 130: 981, 1983.
- Swain, S. L., Regulation of the development of distinct subsets of CD4+ T cells, *Res. Immunol.* 142: 14-22, 1991.
- Szabo, S. J., Gold, J. S., Murphy, T. L., Murphy, K. M., Identification of cis-acting regulatory elements controlling interleukin 4 gene expression in T cells: roles for NF-Y and NF-Atc, *Mol. Cell Biol.* 8: 4793-4805, 1993.
- Takeshita, T., Asao, H., Ohtani, K., Ishii, N., Kumaki, S., Tanaka, N., Munakata, H., Nakamura, M., Sugamura, K., Cloning of the γ chain of the human IL-2 receptor, *Science* 257: 379-382, 1992.
- Tang, M. L. K., Kemp, A. S., Spontaneous expression of IL-4 mRNA in lymphocytes from children with atopic dermatitis, *Clin. Exp. Immunol.* 97: 491-498, 1994.
- Tang, M., Varigos, G., Kemp, A. S., Reduced IFN- γ mRNA expression in atopic dermatitis: evidence for a post-transcriptional defect, *Clin. Exp. Immunol.* 97: 483-490, 1994.
- Taniguchi, T., Miyazaki, T., Minami, J., Kawahara, A., Fujii, H., Nakagawa, Y., Hatakeyama, M., Liu, ZJ., IL-2 signaling involves recruitment and activation of multiple protein tyrosine kinases by the IL-2 receptor, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 766: 235-244, 1995.
- Tepper, R. I., Levinson, D. A., Stanger, B., Campos-Torres, J., Abbas, A. K., Leder, P., IL-4 induces allergic-like inflammatory disease and alters T cells development in transgenic mice, *Cell* 62: 457, 1990.
- Teran, L. M., Montefort, S., Douglass, J., Holgate, S. T., Neutrophil and eosinophil chemotaxis in asthma, *Q. J. Med.* 86: 761-769, 1993.
- Thomas, W. R., Mite allergens group I-VII. A catalogue of enzymes, *Clin. Exp. Allergy* 23: 350-353, 1994.
- Thompson, C. B., Distinct roles for the costimulatory ligands B7.1 and B7.2 in T helper cell differentiation, *Cell* 81: 979-982, 1995.
- Todd, M. D., Grusby, M. J., Lederer, J. A., Lacy, E., Lichtman, A. H., Glimmer, L. H., Transcription of the interleukin 4 gene is regulated by multiple promoter elements, *J. Exp. Med.* 177: 1663-1674, 1993.
- Trinchieri, G., Kobayashi, M. M., Clark, S. C., Sehra, J., London, L., Perussia, B., Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin 2, *J. Exp. Med.* 160: 1147-1154, 1984.

- Urban, J. F., Meliszewski, C. R., Madden, K. B., Katona, I. M., Finkelman, F. D., IL-4 treatment can cure established gastrointestinal nematode infections in immunocompetent and immunodeficient mice, *J. Immunol.* 154: 4675-4684, 1995.
- Uyttenhove, C., Simpson, R. J., van Snick, J., Functional and structural characterization of P40, a mouse glycoprotein with T-cell growth factor activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 6934-6938, 1988.
- van-Bever, H. P., Stevens, W. J., *Eur. Resp. J.* 5: 318-322, 1992.
- van der Heijden, F. L., E. A. Wierenga, J. D. Bos, and M. L. Kapsenberg, High frequency of IL-4 producing CD4⁺ allergen-specific T lymphocytes in atopic dermatitis lesional skin, *J. Invest. Dermatol.* 97: 389, 1991.
- van Leeuwen B. H., Matinson, M. E., Webb G. C., Young, I. G., Molecular organisation of the cytokine gene cluster, involving the human IL-3, IL-4, IL-5 and GM-CSF genes, on human chromosome 5, *Blood* 73: 1142-1148, 1989.
- Varney, V. A., Hamid, Q., Gaga, M., Ying, S., Jacobson, M., Frew, A. J., Kay, A. B., Durham, S. R., Influence of grass pollen immunotherapy on cellular infiltration and cytokine mRNA expression during allergen-induced late-phase cutaneous responses, *J. Clin. Invest.* 92: 644-651, 1993.
- Vercelli, D., Geha, R.S., Regulation of IgE synthesis in humans: a table of two signals, *J. Allergy Clin. Immunol.* 8: 285-295, 1991.
- Waldmann, T. A., Goldman, C. K., Robb, R. J., Depper, J. M., Leonard, W. J., Sharrow, S. O., Bongiovanni, K. F., Sorsmeyer, S. J., Greene, W. C., Expression of Interleukin 2 receptors on activated human B cells, *J. Exp. Med.* 160: 1450-1456, 1984.
- Wang, A. M., Doyle, M. V., Mark, D. F., Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction, *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 86: 9717-9721, 1989.
- Wang, M., Mark, D. F., Quantitative PCR, PCR protocols: a guide to methods and applications, Academic Press, INC., San Diego, California, 70-76.
- WHO-IUIS Nomenclature Subcommittee on Interleukin Designation. Nomenclature for secreted regulatory proteins of the immune system (Interleukins), *Immunol. Today* 13: 118, 1992.
- Wierenga, E. A., M. Snoek, C. de Groot, I. Chretien, J. D. Bos, H. M. Jansen, and M. L. Kapsenberg, Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD4⁺ allergen-specific T lymphocytes in atopic patients, *J. Immunol.* 144: 4651-4656, 1990.
- Wierenga, E. A., M. Snoek, H. M. Jansen, J. D. Bos, R. A. W. van Lier and M. L. Kapsenberg, Human atopen-specific types 1 and 2 T helper cell clones, *J. Immunol.* 147: 2942-2949, 1991.
- Williams, T. M., Moolten, D., Burlein, J., Romano, J., Bhaeman, R., Godillot, A., Mellon, M., Rauscher F. J., Kant, J. A., Identification of a zinc finger protein that inhibits IL-2 gene expression, *Science* 254: 1791-1794, 1991.
- Willoughby, K. M., New concepts in immunotherapy, *Otolaryngol. Clin. North. Am.* 25: 71-100, 1992.
- Yang, Y., Ricciardi, S., Ciarletta, A., Calvetti, J., Kelleher, K. and Clark, S.C., Expression cloning of a cDNA encoding a novel human hematopoietic growth factor: human homologue of murine T-cell growth factor P40, *Blood* 74, 1880-1884, 1989.
- Yang, Yu-Chung, Human Interleukin 9: a new cytokine in hematopoiesis, *Leukemia and Lymphoma* 8: 441-447, 1992.
- Yashimoto, T., Paul, W.E., CD4⁺, NK1.1⁺ T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3, *J. Exp. Med.* 179: 1285-1295, 1994.

- Yin, T., Keller, S., Quelle, F., Witthuhn, B., Tsang, M., Lienhard, G., Ihle, J., Yang, Y.-C., IL-9 induces tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 via JAK tyrosine kinases, *J. Biol. Chem.* 270: 20497-20502, 1995.
- Yin, T., Tsang, M., Yang, Y.-C., JAK1 kinase forms complexes with IL-4 receptor and 4PS/insulin receptor substrate-1-like protein and is activated by IL-4 and IL-9 in T lymphocytes, *J. Biol. Chem.* 269: 26614-26617, 1994.
- Yin, T., Yang, L., Yang Y.-C., Tyrosine phosphorylation and activation of JAK family tyrosine kinases by interleukin 9 in MO7E cells, *Blood* 85: 3101-3106, 1995.
- Yokota, T., Otsuka, T., Mosmann, T., Banchereau, J., DeFrance, T., Blanchard, D., De Vries, J., Lee, F., Arai, K. I., Isolation and characterisation of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B cell stimulatory factor 1, that expresses B cell- and T-cell-stimulating activities, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 5894, 1986.
- Yssel, H., Johnson, K. E., Schneider, P. V., Wideman, J., Terr, A., Kastelein, R., de Vries, J. E., T cell activation-inducing epitopes of the house dust mite allergen Der pI, *J. Immunol.* 148: 738-745, 1992.
- Zhu, Y. X., Kang, L. Y., Luo, W., Li, C. C. H., Yang, L., Yang, Y. C., Multiple transcription factors are required for activation of human interleukin 9 gene in T cells, *J. Biol. Chem.* 271: 15815-15822, 1996.

8.2 ABKÜRZUNGEN

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	micro
A	Adenosin
Ak	Antikörper
AP	activating protein
APC	antigenpräsentierende Zellen
BMMC	bone marrow-derived mast cells
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
cm	Zentimeter
E. coli	Escherichia coli
CRE	cAMP response element
ddNTP	Didesoxy-Nukleosid-Triphosphate
ddUTP	Didesoxy-Uridin-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Der-p-I	Hausstaubmilbenantigen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	beliebiges Desoxyribonukleosid-Triphosphat = desoxy Nukleosid (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DTH	delayed type hypersensitivity
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanin
h	human
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JAK	Janus-Kinase
kB	Kilobasen
kD	Kilodalton
l	Liter
m	milli
M	molar
MACS	Magnetic Cell Sorting
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex

mMCP	murine Mastzellproteasen
M-MLV	Moloney Murine leukemia virus
MOPS	3-N-Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazol)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid
n	nano beziehungsweise Anzahl der Probanden
N	Normalität
NF	nuclear factor protein
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NS	nicht stimuliert
Oct	octamer proteins
OD	optische Dichte
OPD	o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid
p	pico
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-konzentration
PHA	Phytohämagglutinin
Poly(A) ⁺ RNA	polyadenylierte RNA
PTK	Protein-Tyrosinkinase
r	rekombinant
R	Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rNTP	Ribonukleosid-Triphosphate
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkription
RT-PCR	PCR mit vorausgehender Reverser Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
STAT	signal transducers and activators of transcription
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCR	T-Zell-Rezeptor
TE	Tris-EDTA-Puffer
T _H -Zellen	T-Helferzellen
T _m	Schmelztemperatur
T _S -Zellen	T-Suppressorzellen
U	Unit
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen per Volumen
Vol	Volumen
w/v w/w	Gewicht pro Volumen / Gewicht pro Gewicht

8.3 PATIENTENDATEN

Daten der Allergiepatienten:

Patient	Diagnose	Geschlecht	Alter
1	akutes atopisches Ekzem mit Erythrodermie	männlich	25 Jahre
2	akutes atopisches Ekzem	männlich	29 Jahre
3	akutes atopisches Ekzem	weiblich	38 Jahre

Klinische Daten der Immuntherapiepatienten:

Patient	Alter	Geschlecht	FEV1 = forciertes expiratorisches Volumen in % der Norm	Histamin (mg/ml)	Medikamentierung
1	21	weiblich	92	1,65	B, S, N
2	39	weiblich	87	3,0	C, S, N
3	24	weiblich	99	3,25	B, S
4	23	männlich	96	3,99	B, S, N
5	20	weiblich	103	7,74	B, N
7	19	männlich	84	0,82	B, S, N
8	26	weiblich	98	5,5	B, S, N
9	25	männlich	102	0,84	B, S, N
10	21	weiblich	105	3,12	B, S, N
11	23	männlich	89	3,76	B, C, S
12	33	weiblich	89	1,74	B, N

B = Beclometason oder Budesonid

C = Natriumcromoglykat

S. = Salbutalmol

N = nasale Steroide

Abfall der FEV1-Werte der Patienten nach Allergenkontakt

Patient	Sofortreaktion		Spätreaktion	
	vor Therapie	nach Therapie	vor Therapie	nach Therapie
1	18,76	3,63	14,56	3,08
2	11,90	2,47	21,51	1,49
3	24,11	0,99	10,58	-3,73
4	17,5	2,97	28,54	5,92
5	24,37	-2,16	3,22	1,68
7	24,74	34,53	6,67	20,96
8	17,36	17,46	10,5	14,44
9	30,39	5,04	25,44	5,24
10	26,97	2,64	20,5	4,41
11	29,39	6,47	31,12	14,01
12	27,60	11,76	31,14	-0,81

Die Werte zeigen den prozentualen Abfall des FEV1-Werte 1-60 Minuten nach Allergenkontakt (Sofortreaktion) und 3-10 Stunden nach Allergenkontakt (Spätreaktion).

8.4 DANKSAGUNGEN

Die vorliegende Dissertation wurde im Institut für experimentelle Hämatologie der GSF München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. P. Dörmer angefertigt. Ich danke Herrn Prof. Dr. Dörmer für die außergewöhnlich interessante Themenstellung, die hervorragende Betreuung und für seine kontinuierliche Diskussionsbereitschaft.

Frau Prof. Dr. E. Weiß danke ich für die Bereitschaft, die Arbeit vor der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München zu vertreten.

Frau E. Glas möchte ich nicht nur ganz herzlich für die technische Unterstützung, sondern insbesondere für ihren freundschaftlichen Zuspruch danken.

Bei Frau Dr. K. Flieger möchte ich mich ganz einfach für Ihre Freundschaft und die daher angenehme und harmonische Atmosphäre in unserem Zimmer bedanken.

Bei Herrn Dr. Hültner möchte ich mich für seine Diskussionsbereitschaft und Anregungen bedanken.

Frau Dr. Kremmer und Herrn Dr. Reisbach möchte ich besonders für ihr Engagement bei der Entwicklung des IL-9-ELISA danken.

Frau Brozeit danke ich für die freundliche Durchführung des MTT-Tests zur Überprüfung der IL-2-Antikörper.

Herrn Dr. G. Messer aus der Dermatologische Universitätsklinik München danke ich für die Bereitstellung der Blutproben atopischer Patienten.

Allen meinen Freunden, insbesondere Jeanette und Rudolf Brandl, danke ich ganz herzlich für die Unterstützung, die sie mir in einer kritischen Phase während dieser Arbeit entgegengebracht haben.

8.5 LEBENSLAUF

Persönliche Daten:

Geboren: 11. Januar 1962 in Hannover

Schulbildung:

1968 bis 1978 Grund- und Realschule in Sarstedt
1978 bis 1979 Höhere Handelsschule in Hildesheim
1982 bis 1985 Abendgymnasium für Berufstätige in Hannover
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Beruflicher Werdegang:

1979 bis 1986 Verwaltungsangestellte der Oberpostdirektion Hannover/Braunschweig
seit 1997 Medical Project Manager
Medizinisch-wissenschaftliche Abteilung der Biogen GmbH, München

Studium der Biologie:

1986 bis 1987 Biologische Fakultät der Universität Würzburg
1987 bis 1993 Biologische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Diplomprüfung in den Fächern Humangenetik, Genetik und Biochemie
1992 bis 1993 Diplomarbeit am Institut für Klinisch Experimentelle Forschung in der
Medizinischen Klinik Innenstadt, München
Diplomarbeitsthema: „Analyse des α/β -T-Zell-Rezeptor-Genrepertoires
peritonealer T-Zellen des Menschen“
1993 bis 1997 Promotion am Institut für Experimentelle Hämatologie des
Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit GmbH, München bei
Herrn Prof. Dr. P. Dörmer