

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Hans-Jürgen Möller

Untersuchungen zur Wirkung von Substanz P und Serotonin auf die Zytokinproduktion
peripherer Blutlymphozyten mittels ELISpot-Methode

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

vorgelegt von

Richard Musil

aus

München

Jahr

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Markus J. Schwarz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Matthias F. Bauer

Priv. Doz. Dr. Siegfried Kösel

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen
Prüfung: 09.12.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Psychoneuroimmunologie	7
1.2	Neurotransmitter	7
1.2.1	Allgemeines	7
1.2.2	Serotonin	8
1.2.3	Neuropeptide	9
1.2.4	Substanz P	10
1.3	Kolokalisation von Substanz P und Serotonin	11
1.3.1	Zentrale Bedeutung	11
1.3.2	Periphere Bedeutung	12
1.4	Grundlagen der Immunologie	12
1.4.1	Th1-System und Zytokine	13
1.4.2	Th2-System und Zytokine	14
1.4.3	Interaktionen	16
1.5	Nachweismethoden	17
1.5.1	Prinzip des ELISpot	17
1.5.2	Methodenoptimierungen	18
1.6	Fragestellung der vorliegenden Arbeit	19
1.6.1	Primäre Fragestellung	19
1.6.2	Sekundäre Fragestellungen	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Untersuchungsmaterial	20
2.1.1	Buffy Coats	20
2.1.2	Kontrollpersonen	20
2.1.3	Probanden	20
2.2	ELISpot-Untersuchungen	20
2.2.1	Plattenaufteilung und Randeﬀekte	20
2.2.2	Plattenbeschichtung	21
2.2.3	Antibiotikaverwendung	21
2.2.4	Mediumwechsel	22
2.2.5	Inkubationszeiten	22
2.2.6	Gesamtvolumen im Well	22
2.2.7	Zellkonzentration	22
2.2.8	Leerwert hintergrund	23
2.2.9	Blockierschritt	23
2.2.10	Grundstimulation	23
2.2.11	Probenvorinkubation - Homogenisierung der Zellsuspension	24
2.2.12	Inkubation des Detektionsantikörpers	24
2.2.13	Waschschritte	24
2.2.14	Färbung	25
2.2.15	Übersicht der Versuchsvariationen	25
2.3	Stimulation der Zellen mit Neurotransmittern	26
2.3.1	Abwiegen und Lagerung der Substanzen	26
2.3.2	Lösen von Substanz P und Serotonin	26
2.3.3	Verdünnungsreihen der Neurotransmitter	26
2.3.4	Spezifität der Stimulationen	26

2.4	Zellkulturarbeiten	27
2.4.1	Ficoll-Separation von PBMC	27
2.4.2	Einfrieren von Zellen	27
2.4.3	Auftauen von Zellen	28
2.4.4	Zählen von Zellen	28
2.4.5	Nachweis und Klassifikation von Verunreinigungen	28
2.4.6	Zusammensetzung des Zellpellets	28
2.5	Genotypisierungen	29
2.5.1	DNA-Isolierung	29
2.5.2	IFN- γ , CA-Repeat, rs3138557	30
2.5.3	IL-4, C589T, rs2243250	30
2.5.4	IL-13, A4257G, Gln (Q) zu Arg (R), rs20541	30
2.6	Zusammenfassung der Methodik	31
2.7	Datenauswertung mit dem ELISpot-Reader	31
2.8	Datenanalyse	31
2.8.1	Stichprobengrößen	31
2.8.2	Verwendete Testverfahren	33
3	Ergebnisse	35
3.1	Ergebnisse der Vorversuchsreihen	35
3.1.1	Einfluss der PHA-Konzentration	35
3.1.2	Einfluss der Serotonin-Konzentration	35
3.1.3	Einfluss der Substanz P-Konzentration	35
3.1.4	Spezifität der Stimulation	35
3.2	Deskriptive Statistik	36
3.2.1	Beschreibung der Gesamtstichprobe	36
3.3	Ermittlung von Einflussfaktoren	38
3.3.1	Ergebnisse der allgemeinen linearen Modelle	38
3.3.2	Einfluss weiterer Faktoren	44
3.3.3	Einfluss der Randwells	47
3.3.4	Einfluss des Blutentnahmezeitpunkts	48
3.4	Ergebnisse zur primären Fragestellung	51
3.4.1	Auswahl und Beschreibung der endgültigen Stichprobe	51
3.4.2	Auswahl der statistischen Verfahren	54
3.4.3	Ergebnisse für IFN-gamma	55
3.4.4	Ergebnisse für IL-4	58
3.4.5	Ergebnisse für IL-13	61
3.5	Einfluss verschiedener Faktoren auf die interindividuellen Unterschiede	64
3.5.1	Zusammenhang mit soziodemographischen Daten	66
3.5.2	Zusammenhang mit genetischen Faktoren	72
3.5.3	Interaktionen genetischer und soziodemographischer Einflussfaktoren	76
3.6	Th2/Th1-Verhältnis	79
4	Diskussion	82
4.1	Hauptfragestellung	82
4.1.1	Wirkung von Substanz P	82
4.1.2	Wirkung von Serotonin	83
4.1.3	Wirkung von Substanz P und Serotonin	84
4.1.4	Spezifität der beobachteten Wirkung	85

4.1.5	Verhältnis von Th1 und Th2 Zytokinen	86
4.2	Individuelle Unterschiede	87
4.2.1	Interindividuelle Unterschiede	87
4.2.2	Methodische Einflussfaktoren	87
4.2.3	Demographische Einflussfaktoren	88
4.2.4	Genetische Einflussfaktoren	90
4.3	Methodik	93
4.3.1	Zellkulturarbeiten mit PBMC	93
4.3.2	Methodenentwicklung	94
4.3.3	Konzentrationsbereiche	96
4.4	Limitationen	98
5	Zusammenfassung	99
6	Literaturverzeichnis	101
7	Anhang	127
7.1	Abkürzungen	127
7.2	Buffy coats:	128
7.3	Probenaufbewahrung	128
7.3.1	Lagern der Zellen	128
7.4	ELISpot	129
7.4.1	Verwendete Lösungen und Medien	129
7.4.2	Verwendete Puffer	130
7.4.3	Reagenzien	130
7.4.4	Chemikalien	131
7.5	ELISA	132
7.5.1	SP-ELISA (Assay Designs Inc.)	132
7.5.2	Serotonin EIA (dsl: Diagnostic Systems Laboratories Deutschland GmbH)	132
7.6	Genotypisierungen	133
7.6.1	Probenverarbeitung	133
7.6.2	Polymerase-Ketten-Reaktion	133
7.6.3	Sequenzierung	133
7.7	Verbrauchsmaterialien	134
7.8	Chemikalien	134
7.9	Geräte	135
7.9.1	Pipetten:	135
7.9.2	Gläser:	135
7.9.3	Zentrifugen:	136
7.9.4	Wasserbäder:	136
7.9.5	Brutschränke:	136
7.9.6	Mikroskope:	136
7.9.7	Waagen:	136
7.9.8	Weiteres:	136
7.10	Software	137
7.11	Bildanhang	138
7.11.1	Beispielwells	138
7.12	Tabellenanhang	139
7.12.1	Deskriptive Statistik Gesamtstichprobe	139
7.12.2	Deskriptive Statistik endgültige Stichprobe	143

8 Danksagung	145
9 Lebenslauf	146
10 Tabellenverzeichnis	149
11 Abbildungsverzeichnis	151

1 Einleitung

1.1 Psychoneuroimmunologie

Die Psychoneuroimmunologie ist ein relativ junges Forschungsgebiet, das die vielfachen Interaktionen des Nerven-, Hormon- und Immunsystems und deren reziproke Auswirkungen auf psychische und geistige Vorgänge untersucht. Viele Erfahrungen hat man hierbei auf dem Gebiet der Stressforschung und durch Untersuchungen der Wirkungen von Adrenocorticoiden und Adrenalin auf das Immunsystem gewonnen [72, 282, 43]. So konnte die Alteration verschiedener immunologischer Parameter durch bestimmte Stressoren *in vivo* nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass viele dieser Veränderungen dabei über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-(HPA-) Achse vermittelt werden. Daneben wurden auch zahlreiche nebennierenunabhängige Reaktionen beobachtet. So konnte eine Wirkung von Katecholaminen und Neuropeptiden auf lymphoides Gewebe, akzessorische Zellen und das Gefäßsystem sowie auf die Effektorzellen Monozyten und Lymphozyten ermittelt werden. Neben einer humoralen Vermittlung von Hormon- und Zytokinwirkungen, bestehen auch direkte Beziehungen zwischen dem Immun- und Nervensystem über die Neurotransmitter der Nervenzellen [254]. Der Austausch von Rezeptoren und Liganden zwischen Zellen des Nerven- und Immunsystems spricht für deren Vernetzung [72]. Es konnte in vielen Untersuchungen nachgewiesen werden, dass Neurotransmitter nicht nur ihre klassischen Zielstrukturen stimulieren, sondern auch vielfältige Funktionen von T-Lymphozyten wie Zytokinproduktion, Adhäsion an die extrazelluläre Matrix, chemotaktische Migration, Homing in spezifische Organellen, Bekämpfung infektiöser Erreger oder von Krebszellen beeinflussen können [182, 183]. Die jeweiligen Neurotransmitter entfalten dabei abhängig vom speziellen Kontext, aktivierende oder hemmende Wirkungen [145]. Die T-Zellen kommen peripher durch die reichhaltige nervale Innervation lymphoider Organe wie Milz, Thymus, Lymphknoten, Knochenmark oder dem Mucosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT) und zentral nach Überbrückung der Blut-Hirn-Schranke durch regelmäßiges Einwandern ins Gehirn mit Neurotransmittern in Kontakt [88, 345]. Über die nervale Innervation von Blutkapillaren können T-Zellen auch im Blut direkt durch Neurotransmitter beeinflusst werden. Daneben produzieren T-Zellen einige Neurotransmitter selbst und werden durch diese in einer parakrinen oder autokrinen Weise wieder beeinflusst [185]. Umgekehrt werden viele neuronale Mechanismen über Zytokine reguliert, die in normalem Hirngewebe nachgewiesen werden konnten (zur Übersicht [335]).

1.2 Neurotransmitter

1.2.1 Allgemeines

Neurotransmitter sind Botenstoffe, die sich das Nervensystem zur Übertragung von Erregungen von einer zur nächsten Zelle zunutze macht. Insbesondere zählen hierzu verschiedene Monoamine wie Dopamin, Noradrenalin oder Serotonin. Daneben sind Glutamat, Gammaaminobuttersäure (GABA), Acetylcholin und Opioide die häufigsten Neurotransmitter. Es gibt aktivierende (exzitatorische) und hemmende (inhibierende) Neurotransmitter. Je nach vorkommendem Neurotransmitter unterscheidet man die Nervenzellverbände und spricht z.B. von dopaminergen oder serotonergen Neuronen. Neurotransmitter werden aus intrazellulären Vesikeln in den synaptischen Spalt freigesetzt und entfalten ihre Wirkung in der Regel über spezifische Rezeptoren. Je nach Rezeptor kann die dabei resultierende Wirkung ganz unterschiedlicher Natur sein. Über enzymatische Aktivität werden die Neurotransmitter im synaptischen Spalt wieder deaktiviert oder über spezifische Pumpen wieder in die Nervenzellen aufgenommen. Chemisch sind Neurotransmitter entweder Aminosäuren (z.B. Glutamat, GABA), biogene Amine (Dopamin, Serotonin) oder peptidgerge Neurotransmitter, auch Neuropeptide genannte (z.B. Opioide, Substanz P, Prolaktin, Corticotropin Releasing Hormon).

1.2.2 Serotonin

1.2.2.1 Struktur und Rezeptoren Serotonin (= 5-Hydroxytryptamin, 5-HT) entsteht aus Hydroxylierung und Decarboxylierung der Aminosäure Tryptophan und wird über das Enzym Monoaminoxidase abgebaut.

Serotonin-(5-HT-) Rezeptoren befinden sich auf den Dendriten und Perikarya von Serotonin freisetzenden Neuronen, auf präsynaptischen Neuriten-Endigungen und postsynaptisch auf den innervierten Zielstrukturen. Serotonin wird außerdem aus Varikositäten freigesetzt und kann ohne direkte synaptische Verbindungen als Neuromodulator wirken. Bisher wurden sieben Subtypen serotonerger Rezeptoren (5-HT₁ bis 5-HT₇) definiert. Erstmals wurden unterschiedliche Rezeptortypen von Gaddum und Picarelli 1957 beschrieben [94]. Mittlerweile konnten die meisten Serotonin-Rezeptoren geklont und charakterisiert werden. Die 5-HT₁, 5-HT₂ und 5-HT₄₋₇ Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelt. Der 5-HT₃-Rezeptor ist ein liganden-gesteuerter Ionenkanal. Im zentralen Nervensystem (ZNS) konnten bislang 14 der 15 bekannten 5-HT-Rezeptoren nachgewiesen werden.

1.2.2.1.1 5-HT₁-Rezeptoren Die Existenz von fünf 5-HT₁-Rezeptoren (5-HT_{1A}, -1B, -1D, -1E und -1F) ist bisher bekannt. Alle haben die gemeinsame Eigenschaft, die Adenylatcyclase zu hemmen und so eine Senkung des Cyclischen Adenosinmonophosphat-(cAMP-) Spiegels zu bewirken. Lediglich der 5-HT_{1A}-Rezeptor öffnet einen rezeptorgekoppelten K⁺-Kanal und hemmt einen spannungsabhängigen Ca⁺⁺-Kanal. 5-HT_{1A}-Rezeptoren sind somatodendritische Autorezeptoren und weisen die höchste Dichte im Hippocampus, Septum und der Amygdala auf. Die Stimulation von 5-HT_{1A}-Rezeptoren führt zu einer vermehrten Synthese und Freisetzung neurotropher Faktoren und zu einer Verringerung der Entladungsfrequenz in den serotonergen Neuronen der Raphe-Kerne. Eine Stimulation postsynaptischer 5-HT_{1A}-Rezeptoren führt zu einer Hyperpolarisation von Neuronen und hat damit eine gegensätzliche Wirkung zur Stimulation von 5-HT_{2A}-Rezeptoren.

1.2.2.1.2 5-HT₂-Rezeptoren: Die 5-HT₂-(5-HT_{2A}, -2B und -2C) Rezeptoren sind über die Phospholipase C mit den zwei Second Messengern Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP3) verbunden. 5-HT_{2A}-Rezeptoren sind im ZNS weit verbreitet und finden sich vor allem in der Nähe serotonerger Nervenendigungen. Exprimiert werden sie im präfrontalen Cortex, im Claustrum und in den Basalganglien. 5-HT_{2A}-Rezeptoren lösen bei Stimulation eine Aktivierung GABAerger Neurone aus und hemmen die Ausschüttung von Acetylcholin im Hippocampus und Cortex. Peripher bewirkt dieser Rezeptor eine Vasokonstriktion. 5-HT_{2C}-Rezeptoren finden sich im Plexus chorioideus und in geringerer Dichte im Cortex, Hippocampus, Striatum und in der Substantia nigra.

1.2.2.2 Serotoninrezeptoren im Immunsystem Erstmals konnten Bonnet et al. Bindungsstellen für Serotonin auf Lymphozyten nachweisen [27]. Im Immunsystem ist vor allem der 5-HT_{1A}-Rezeptor von Bedeutung, der auf mitogen stimulierten humanen T-Lymphozyten exprimiert wird. Er findet sich auch auf Jurkat T-Zellen und führt bei Stimulation zu erhöhter Inositolphosphat und intrazellulärer Ca⁺⁺-Konzentration. In Lymphknoten, der Milz, dem Thymus und in PBMC konnte 5-HT_{1A}-Rezeptor mRNA nachgewiesen werden [203]. Dabei findet sich die 5-HT_{1A}-mRNA in aktivierten T-Zellen, nicht aber in ruhenden T-Zellen [16]. Üblicherweise ist der 5-HT_{1A}-Rezeptor über cAMP gekoppelt. Ein Anstieg des cAMP-Levels in T-Lymphozyten kann die Produktion von IFN- γ , IL-2 oder die Aktivität von CD8⁺-Zellen hemmen. Durch eine selektive Blockade des 5-HT_{1A}-Rezeptors mit spezifischen Antagonisten kann die T-Zell-Proliferation vermindert werden. Diese Hemmung wird durch den selektiven 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten 8-OH-DPAT (8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin) wieder aufgehoben [82]. Einige weitere Arbeiten zeigen einen supprimierenden Effekt von Serotonin auf die Proliferationsrate von mit Phythämagglutinin (PHA) aktivierten Lymphozyten und eine Minderung der IFN- γ -Produktion [13, 26, 157, 301]. Eine konzentrationsabhängige inhibitorische Wirkung auf die Proliferationsrate nach

Stimulation mit HgCl konnte ebenfalls gezeigt werden. Andererseits wurde an murinen Milzzellen auch beobachtet, dass es durch die *in vitro* Zugabe von Serotonin auf Mitogen-stimulierte Lymphozyten zu einer Zunahme von mRNA für IFN- γ und IL-2 kommt [15]. Auch die Proliferationsrate aktivierter B-Lymphozyten ist vermutlich zum Teil über den 5-HT_{1A}-Rezeptor gesteuert [147].

Daneben zeigten pharmakologische und molekulare Studien die Existenz von 5-HT_{2C}-Rezeptoren auf aktivierten T-Lymphozyten [15]. 5-HT_{2C}-Rezeptor-Antagonisten blockieren die durch IFN- γ induzierten Wirkungen auf murine Makrophagen und hemmen die TNF- α -Produktion von Monozyten [310]. Daneben wurden 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{3A} und 5-HT₇-Rezeptoren auf T-Zellen nachgewiesen [179, 359, 361].

1.2.2.3 Vorkommen und Bedeutung von Serotonin Bereits in den 50er Jahren wurde über eine Funktion von Serotonin als Neurotransmitter spekuliert [33]. Die Raphe-Kerne stellen die Hauptquelle serotonerger Neurotransmission im ZNS dar. Weitere serotonerge Neurone finden sich im Hypothalamus, Mesencephalon, Nucleus caudatus, am Boden des 4. Ventrikels und der Pons. Serotonin ist sowohl für die Regulation psychischer Vorgänge wie Stimmung, Antrieb oder kognitiver Funktionen, als auch vegetativer Aktivitäten wie der Auslösung von Übelkeit, der Schlafinduktion, Regulation der Körpertemperatur oder der Nahrungsaufnahme und Sexualität bedeutend. Viele psychiatrische Erkrankungen werden auf eine Dysregulation serotonerger Neurotransmission zurück geführt [105, 186, 225]. Peripher findet es sich v.a. in enterochromaffinen Zellen des Darmes und in Thrombozyten. In den Thrombozyten ist Serotonin bei der Thrombozytenaktivierung, deren Aggregation sowie der lokalen Gefäßverengung beteiligt. Es induziert die Freisetzung von Endothelium-derived relaxing Factor (EDRF) aus den Gefäßendothelien und löst den Bezold-Jarisch-Reflex aus.

In entzündlichen Arealen findet sich eine hohe Serotonin-Konzentration, die durch eine Degranulation von Mast-Zellen oder Freisetzung aus aggregierten Thrombozyten hervorgerufen werden kann [128, 99].

1.2.2.4 Funktionen im Immunsystem Im Immunsystem finden sich vielfältige Wirkungen von Serotonin. Wie oben dargestellt werden einige dieser Effekte über 5-HT_{1A}-Rezeptoren vermittelt. Mitogene scheinen dabei die Expression von 5-HT_{1A}-Rezeptoren auf mRNA- und Protein-Ebene zu verstärken [4]. Es reguliert die Mitogen-aktivierte T-Zell Proliferation, erhöht die Mitogen-aktivierte B-Zell-Proliferation [147] und erhöht die IL-2-aktivierte NK-Zellen Zytotoxizität über 5-HT_{1A}-Rezeptoren [124, 126, 127, 361, 125]. Über 5-HT_{2C}-Rezeptoren hemmt Serotonin die TNF- α -Synthese humaner Monozyten [12] und induziert die ERK1/2-Phosphorylierung naiver T-Zellen über 5-HT₇-Rezeptoren. Es mindert die Migration mononukleärer Zellen [25], führt *in vitro* zu einer Reduktion der IFN- γ -induzierten Ia-Antigenexpression auf Makrophagen und zu einer Erhöhung der IFN- γ -induzierten Phagozytose [309, 310].

Finocchiaro et al. postulierten eine autokrine Beeinflussung der T-Lymphozyten durch 5-HT, da dieses von T-Lymphozyten und Monozyten nach Stimulation mit Phythämagglutinin A (PHA) oder IFN- γ produziert wird und Serotonin wiederum einen hemmenden Effekt auf die IFN- γ -Produktion über 5-HT_{1A}-Rezeptoren hat. Insgesamt wird eine immunregulatorische Rückkopplung von Serotonin und IFN- γ vermutet [89].

In lokalen entzündlichen Arealen wird Serotonin im Mausmodell durch Mastzellen freigesetzt und stößt eine Hyper-Sensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ durch Aktivierung endothelialer Zellen an, was schließlich zum erhöhten Recruitment von T-Zellen führt [9, 98]. Antigene, IgE-sensibilisierende Antikörper oder auch Neuropeptide wie Substanz P, Somatostatin, Calcitonin-Gen-related Peptid (CGRP) oder Vasointestinales Peptid (VIP) können eine Freisetzung von Serotonin aus Mastzellen auslösen [57]. Im Mausmodell zeigte sich auch, dass Serotonin zusammen mit Noradrenalin aus noradrenergen Nervenendigungen der Milz freigesetzt wird, um das humorale Abwehrsystem zu steuern [93].

1.2.3 Neuropeptide

Neuropeptide sind Peptide mit geringer Aminosäuren-(AS-) Anzahl, die in vielfältiger Weise physiologische Vorgänge modulieren und beeinflussen können und somit eine Unterform von Neurotransmittern

darstellen. Sie können dabei auch Einfluss auf Strukturen nehmen, die relativ weit vom Ort der Sekretion entfernt liegen. Zu den Neuropeptiden zählen Substanz P (SP), Neuropeptid Y, VIP oder CGRP.

1.2.4 Substanz P

1.2.4.1 Struktur und Rezeptor Substanz P ist ein Neuropeptid der Tachykinin-Gruppe, zu der auch Neurokinin A und B gehören. Es wurde erstmalig 1931 in glatter Muskulatur des Gastrointestinaltrakts entdeckt [337] und hat die Aminosäureabfolge: Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-MetNH₂ [48, 327]. Tachykinine werden von zwei Genen kodiert: Preprotachykinin-A (PPT-A) und Preprotachykinin-B (PPT-B). SP wird vom PPT-A Gen translatiert, welches sieben Exons enthält, die über differenziertes Splicing der verschiedenen Exone in α -, β -, und γ -PPT-A mRNA je nach kodierender Region enden [320]. Die α -Form kodiert für den SP-Precursor, die β - und γ -Form sowohl für Substanz P als auch Substanz K (Neurokinin A).

Bis heute sind vier SP-Rezeptor-Typen bekannt: NK-1, NK-2, NK-3 und NK-4. Alle binden mehrere Tachykinine [319], aufgrund einer gemeinsamen C-terminalen AS-Sequenz, Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂, die essentiell für biologische Aktivitäten ist [97]. Der NK-1 Rezeptor ist G-Protein gekoppelt und führt nach Aktivierung zu erhöhten intrazellulären Kalziumspiegeln und zur Hydrolyse von Inositolphosphaten [210]. Das NK-1 Gen umfasst 45-60 kb aufgeteilt auf fünf Exons und ist auf Chromosom 2 lokalisiert [97]. Die Affinität des NK-1-Rezeptors für Neurokinin A (Substanz K) und Neurokinin B (Neuromedin K) ist 400 - 500fach geringer als für SP.

1.2.4.2 Vorkommen und Bedeutung von Substanz P und seiner Rezeptoren Zentral finden sich NK-1-Rezeptoren v.a. in limbischen Arealen wie der Amygdala, dem Septum, Hippocampus und Hypothalamus [213]. Im Ncl. dorsalis raphe finden sich NK-1-Rezeptoren im umgebenden Neuropil, vermutlich auf glutamatergen Interneuronen [191, 330]. Im Locus coeruleus sind sie auf noradrenergen Neuronen zu finden [52]. Auch der NK-2-Rezeptor ist im ZNS lokalisiert und zeigt die höchsten Dichten im medialen Septum und dem Striatum [265, 308]. Der NK-3-Rezeptor ist ebenfalls in vielen ZNS-Regionen exprimiert [325, 215, 51]. Auch in der Nähe dopaminerger Bahnsysteme des Mittelhirns und der Basalganglien, im Bereich der endokrinen Zellgruppen des Hypothalamus, im limbischen System und im Rückenmark ist eine tachykininerge Neurotransmission zu finden (zur Übersicht [43]). Neurokinin-Antagonisten werden seit längerer Zeit antidepressive und anxiolytische Eigenschaften zugewiesen [168, 166, 167, 284, 283] (zur Übersicht [77]). Weitere Einzelheiten zur Kollokalisierung mit Serotonin finden sich unter Punkt 1.3 auf der nächsten Seite. Insgesamt kommt SP eine große Bedeutung bei der Modulation monoaminerger Neurotransmission zu.

Peripher ist Substanz P vor allem in enterischen und primär sensorischen Neuronen lokalisiert. Als Zielrezeptoren dienen im Gastrointestinaltrakt NK-1-, NK-2- und NK-3-Rezeptoren auf enterischen Neuronen, glatter Muskulatur, Epithelien, Gefäßen und Immunzellen. Der NK-4-Rezeptor findet sich überwiegend in Muskelgewebe und bindet in erster Linie Neurokinin A [319]. Die mRNA peripher und zentral exprimierter NK-1-Rezeptoren scheint dabei identisch zu sein [171].

Die Wirkung von Substanz P erfolgt zell- und regionalspezifisch. Hierdurch werden Motilität, enterische Sekretion und Absorption gesteuert. Intestinal findet es sich in Varikositäten des Plexus myentericus mit Acetylcholin kollokalisiert [141, 140]. Daneben spielt Substanz P eine große Rolle in der peripheren Schmerzverarbeitung. Es findet sich in primären sensorischen Neuronen (C-Fasern) [139, 138] und wird von sensorischen Nerven der Haut als Antwort auf Verletzung, durch Axon-Reflexe oder antidrome Stimulation ausgeschüttet [243, 287, 74]. In den Ganglien der Hinterwurzeln ist SP mit Neurokinin A, CGRP und Glutamat kollokalisiert [64, 349]. Es moduliert die synaptische Transmission an nozizeptiven Neuronen [251]), löst so analgetische oder hyperalgetische Effekte aus und moduliert typisches Schmerzverhalten [65]. Daneben hat es Aufgaben bei der Kontrolle des Blutflusses und als Transmitter der spinalen viszeralen Afferenzen.

Substanz P und der NK-1-Rezeptor wurden als relevante ätiopathologische Faktoren bei verschiedenen Krankheitszuständen wie Asthma, entzündliche Darmerkrankungen, Erbrechen, Psoriasis, experimentelle Arthritis [181], Infektionen mit dem Respiratory Syncytial Virus [328], aber auch neuropsychiatrischen Störungen wie verschiedenen Schmerzsyndromen (Migräne, Fibromyalgie), Depression, Angststörungen, Schizophrenie und Alzheimer gefunden.

1.2.4.3 Funktionen im Immunsystem Innerhalb des Immunsystems zeigt Substanz P eine modulatorische Aktivität in verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Zuständen [254]. Immunkompetente Zellen werden physiologisch durch peptiderg innerviertes lymphoides Gewebe stimuliert [86]. NK-Rezeptoren konnten durch Nachweis von mRNA auf B- und T-Lymphozyten [29, 171, 172] sowie Monozyten und Makrophagen [133] identifiziert werden. Substanz P konnte in Granulozyten, Monozyten, Makrophagen [252, 28, 133, 172], Eosinophilen [7, 346] und Leydig-Zellen [53] sowie endothelialen Zellen [190], allerdings teilweise murinen Ursprungs nachgewiesen werden. In peripheren Blutlymphozyten des Menschen konnte Preprotachykinin-A-(Substanz P-) mRNA [171, 172] nachgewiesen werden.

Substanz P stimuliert die Proliferation von T-Zellen [155, 253, 307], führt zu einer erhöhten Ig-Produktion von klonierten B-Lymphomzellen [29, 23] und einer erhöhten Sekretion verschiedener Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- α aus Makrophagen und Monozyten [132, 174, 176, 197, 160]. Die Mastzelldegranulation wird durch Substanz P gefördert [270]. Daneben wird die Produktion von IFN- γ aus humanen PBL [103], PBMC nicht-atopischer Patienten und aus murinen Granuloma Zellen [155, 338] durch Substanz P angeregt. Ähnliche Wirkungen zeigen sich auch auf die IL-4-Produktion aus humanen PBL [103] und murinen Lymphozyten [155]. Die Phagozytosefähigkeit humaner Neutrophiler und muriner Makrophagen wird durch SP verstärkt [20]. Entzündungsreaktionen werden durch Stimulation der IL-8 Produktion in Makrophagen und Lymphozyten sowie durch Erhöhung der Superoxidproduktion durch SP beeinflusst [293]. SP findet sich in chronisch entzündlichem Gewebe [177] und wirkt vermutlich auf die inflammatorischen Effekte von Bradykinin und Prostaglandin E1 verstärkend [46], da SP die Synthese und Sekretion von Prostaglandinen in verschiedenen Zelltypen induziert [196, 119, 120]. SP erhöht die Ausschwemmung von Lymphozyten aus Lymphknoten in die Peripherie *in vivo* [224] und induziert Vasodilatation und Plasmaaustritt [178].

Daneben vermutet man auch autokrine Stimulationsmöglichkeiten von Lymphozyten über SP, da Lymphozyten [171] und Makrophagen [252] sowohl den NK-1-Rezeptor exprimieren als auch SP synthetisieren. Auch im zentralnervösen Abwehrsystem finden sich Interaktionen von Substanz P und immunkompetenten Zellen. So führt SP in Astrozyten und Mikroglia zu einer erhöhten Produktion von IL-1 und IL-6 [100, 205]. Ebenfalls erhöht SP die Prostaglandin E und Thromboxan B2 Freisetzung aus Astrozyten [120, 121]. Dabei konnte gezeigt werden, dass SP die p38 MAPK (Mitogen-aktivierte Protein Kinasen) dosis- und zeitabhängig aktiviert [87]. Im Hirnstamm von Ratten führt die Injektion von SP zu einer Hochregulation von MHC II Proteinen [211], die durch NK-1-Rezeptorantagonisten aufgehoben werden kann.

1.3 Kolokalisation von Substanz P und Serotonin

Wie bereits weiter oben erwähnt findet sich Substanz P in enger Nähe zu einigen Neurotransmittersystemen. Im Weiteren sollen die funktionellen Zusammenhänge von Substanz P und Serotonin im Einzelnen dargestellt werden.

1.3.1 Zentrale Bedeutung

Substanz P und Serotonin finden sich in mehreren Bereichen des ZNS kolokalisiert. So werden die Neurone des Ncl. salivatorius inferius durch beide Neurotransmitter stimuliert. Die Gabe beider resultiert konzentrationsabhängig in einer Depolarisation des Membranpotentials [314]. Serotonin scheint dabei seine Effekte über 5-HT_{2A}-Rezeptoren und Substanz P über NK-1- und -2-Rezeptoren zu vermitteln.

Auch im Bereich der Raphe-Kerne konnte ein gemeinsames Auftreten serotonerger und tachykininerger Neurotransmission gezeigt werden [68, 292, 19]. Substanz P-RNA konnte in 50% der serotonergen Neurone im dorsalen Ncl. raphe und in 25% der Neurone im medialen Ncl. raphe nachgewiesen werden [292]. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass eine länger anhaltende NK-1-Rezeptor-Blockade über eine Erhöhung der Spontanaktivität serotonerger Neurone im Ncl. dorsalis raphe zu einer Desensitisierung von somatodendritischen 5-HT_{1A}-Rezeptoren führt, wie das auch bei Applikation von Antidepressiva wie SSRIs zu beobachten ist [109, 115]. In den paraventriculären Kerngebieten des Hypothalamus stimuliert SP die Freisetzung von GABA und inhibiert die Ausschüttung von Serotonin [59, 60, 280]. SP verhindert auch die durch Serotonin stimulierte Freisetzung von Corticosteron nach intracerebroventrikulärer Injektion [285]. Substanz P-Antagonisten wurden in klinischen Studien als mögliche neue Antidepressiva und Anxiolytika eingesetzt. Froger et al. zeigten, dass bei NK-1-Rezeptor-knock-out Mäusen die Aktivität der 5-HT_{1A}-Rezeptoren im Ncl. dorsalis raphe gemindert ist [92]. Dabei scheint es zu einer down-Regulation von 5-HT_{1A}-Rezeptoren zu kommen und somit einer Veränderung der serotonergen Neurotransmission im ZNS. Wie diese Effekte vermittelt werden ist bisher noch nicht vollkommen aufgeklärt. möglicherweise spielt der Einfluss weiterer Transmittersysteme eine Rolle. So führt eine Blockade von NK-1-Rezeptoren im Locus coeruleus zu einer Aktivierung noradrenerger Neuronenverbände. Immunzytochemische Untersuchungen konnten zeigen, dass NK-1-Rezeptoren auf noradrenergen Neuronen des Locus coeruleus zu finden sind, hingegen nicht auf serotonergen Neuronen des Ncl. dorsalis raphe [52, 284]. Es konnte gezeigt werden, dass NK-1-Rezeptorantagonisten das noradrenerge System über eine Abschwächung der Funktion von α 2-Adrenozeptoren beeinflussen und hierdurch auch die serotonerge Neurotransmission beeinflusst wird [114]. Eine Beteiligung glutamaterger Interneurone wird ebenfalls vermutet [191, 330].

1.3.2 Periphere Bedeutung

Neben dem ZNS findet sich eine Kolo-kalisation von Serotonin und Substanz P auch im Gastrointestinaltrakt. Die Expression von SP scheint dabei in den verschiedenen Darmabschnitten einer Regulation zu unterliegen, die von diabetogenen Zuständen abhängig ist [306]. In den Nervenendigungen myenterischer Ganglien hemmen Adenosin und Serotonin die Freisetzung von SP. Serotonin zeigt dabei einen biphasischen Konzentrations-Effekt [32]. Funktionell wird vermutet, dass Substanz P und Serotonin eine antagonistische Interaktion auf die spinale Kontrolle des arteriellen Blutdrucks aufweisen [122]. Auch bei der spinalen Schmerzverarbeitung sind beide Neurotransmittersysteme von Bedeutung. Eine Stimulation spinaler 5-HT_{2A/2C}-Rezeptoren erhöht die SP-Immunogene-Aktivität in den spinalen Hinterhörnern bei der Ratte [161]. Beide interagieren auch bei der peripheren Auslösung von Brechreiz über vagale Afferenzen. So können sowohl NK-1- als auch 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten die Stimulation vagaler Afferenzen durch Substanz P oder Serotonin deutlich vermindern [218]. Mastzellen werden durch peptiderge Neurone innerviert und Neuropeptide können die Freisetzung von Serotonin aus Mastzellen anregen [57]. Broad et al. zeigten, dass Adenosin und Serotonin die Freisetzung von Substanz P aus Nervenendigungen myenterischer Ganglien hemmen [32].

Funktionelle Interaktionen der beiden Systeme konnten unter anderem von Pradhan, Walker und Shirayama gefunden werden [262, 340, 295].

1.4 Grundlagen der Immunologie

Das Abwehrsystem des Menschen wird in einen unspezifischen und einen spezifischen Teil untergliedert. Im unspezifischen stellen die Opsonierung von Bakterien, deren Phagozytose sowie die Aktivierung des Komplementsystems und die Abwehr über oligokompetente Antikörper wichtige Komponenten dar. Das spezifische Immunsystem arbeitet über die Bildung spezifischer Antikörper nach Kontakt mit Erregern und der Bildung von Gedächtniszellen, die durch Aktivierung die spezifischen Antikörper produzieren. Welche einzelnen Komponenten des Immunsystems aktiviert werden, wird durch ein komplexes Zusammenspiel der verschiedenen Abwehrzellen und anderer Körperzellen wie Bindegewebszellen reguliert. Eine

wichtige Rolle spielt hierbei das System der T-Helferzellen, welche durch die Produktion von Zytokinen die richtungsweisenden Weichen stellen. Die T-Helferzellen (Th-Zellen) werden wiederum in vier Gruppen unterteilt, Th1, Th2, Th3 (Treg) und Th17-Zellen [311, 344]. Aufgrund der produzierten Zytokine und deren auslösender Funktion bezeichnet man die Th1-Zellen auch als pro-inflammatorische T-Zellen und die Th2-Zellen als anti-inflammatorisch bzw. deren produzierte Zytokine als pro-inflammatorisch und anti-inflammatorisch [227]. Die Freisetzung dieser Zytokine erfolgt dabei klassischerweise durch andere Zytokine oder über Antigene, welche den T-Zellen über Antigen-präsentierende Zellen präsentiert werden. Seit einiger Zeit ist bekannt, dass eine Zytokinfreisetzung auch durch eine Aktivierung der T-Zellen über Neurotransmitter und Neuropeptide erfolgen kann [182].

1.4.1 Th1-System und Zytokine

Naive CD4⁺-T-Zellen können sich in verschiedene Effektorzelllinien differenzieren. IFN- γ ist dabei das wichtigste Zytokin zur Entwicklung in Th1-Zellen. Weitere wichtige Zytokine des Th1-Systems sind IL-2 und TNF- α .

1.4.1.1 IFN- γ

1.4.1.1.1 Struktur und Rezeptor IFN- γ wird auch Typ-II- oder Immun-Interferon genannt [84, 362] und wurde erstmals 1965 beschrieben [347]. Im Vergleich zu Interferon- α und - β weist es wesentlich mehr regulierende Eigenschaften von Zytokinen als antivirale Eigenschaften auf [24]. Es ist ein homodimeres Glykoprotein, aus 21-24 kD schweren Untereinheiten, je nach Glykosilierungsgrad. Jede Untereinheit besteht aus einem identischen 18 kD-Polypeptid, welches von einem Gen kodiert wird. Der IFN- γ -Rezeptor besteht aus verschiedenen Ketten. Nach Bindung an den Rezeptor erfolgt die Dimerisation der α - und β -Ketten, wodurch es zur Aktivierung der rezeptorassoziierten Janus Tyrosin Kinasen 1 (JAK1) und JAK2 kommt. In Folge wird der IFN- γ -Rezeptor phosphoryliert und der Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) induziert. Dieses führt zur Expression primärer IFN- γ -induzierbarer Gene wie Interferon Regulatory Factor 1 (IRF-1), welcher als Transkriptionsfaktor die Expression weiterer Gene induziert [187, 69, 259].

1.4.1.1.2 Funktion IFN- γ wird von naiven T-Zellen, CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen sowie B-, NK-, und Antigen-präsentierenden Zellen produziert [50, 90, 117, 209, 250, 288] und klassifiziert CD4⁺-Th1-Zellen. Die Entwicklung pluripotenter Th0-Zellen in eine der beiden Th-Zellklassen wird entscheidend durch die Zytokin-Umgebung geprägt [56]. IFN- γ fördert dabei die Differenzierung von B- und T-Lymphozyten [296] in Richtung Th1-Subtyp durch Erhöhung der Expression von IL-12 und des IL-12-Rezeptors [316, 199] und hemmt das Wachstum der Th2-Zellen [95] durch Hemmung der IL-4-Expression [80]. Daneben hemmt es die Entwicklung von Th17 Zellen [118] und stimuliert die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen [291]. IFN- γ dient als Aktivator der mononukleären Phagozyten und stellt so den wichtigsten MAF (Macrophage activating factor) dar [229, 39]. Es aktiviert neutrophile Granulozyten und führt zur Induktion eines Enzyms, das den "respiratory burst" auslöst, um so den Prozess der Abtötung phagozytierter Mikroorganismen einzuleiten. Des Weiteren erhöht es die Expression von Klasse I MHC-Molekülen, bei bestimmten Zellen auch von Klasse II MHC-Molekülen [6, 223, 273, 299]. Es fördert den Switch zur IgG2a- und IgG3-Subklasse und hemmt den Switch zu IgG1 und IgE [55]. IFN- γ führt zu einer Aktivierung der vaskulären Endothelzellen und fördert die Adhäsion der CD4⁺-Zellen. Auf Chemokine hat IFN- γ teils inhibierenden (Chemokine für neutrophile Granulozyten) [112, 156, 244, 245, 269, 271, 326], teils stimulierenden Einfluss (Chemokine für Monozyten) [113, 204, 214, 221, 269, 271, 326, 367]. *In vivo* zeigt IFN- γ interessanterweise bei einigen Autoimmunerkrankungen auch protektive Eigenschaften [75, 76, 351]. Dies hängt möglicherweise damit zusammen, dass einige experimentell induzierte Autoimmunerkrankungen durch Th17-Zellen gefördert werden und IFN- γ die Differenzierung dieser Zelllinie hemmt [58]. Auch bei der Tumor-Abwehr spielt es eine Rolle [304].

1.4.1.1.3 IFN- γ -Gen Das IFN- γ -Gen (IFNG) ist auf Chromosom 12q24.1 lokalisiert und umfasst vier Exons und drei Introns, die 5.4 kb überspannen. Es unterscheidet sich hierdurch von den beiden anderen Interferonen, die keine Introns aufweisen [323]. Die Aktivierung des IFNG zur Initiierung der Differenzierung naiver T-Zellen in Th1-Zellen erfolgt in Gegenwart von IL-12 über den Transkriptionsfaktor STAT4 [153, 202, 324].

Wie bei den meisten Zytokin-Genen finden sich keine häufig vorkommenden Varianten in den kodierenden Regionen. Allerdings gibt es einige andere Polymorphismen, die mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert wurden, hierunter der A874T-Single Nucleotide Polymorphismus (SNP) in Intron 1, ein CA-Mikrosatellit-Repeat in Intron 1 und der Promotor T179G SNP. Das CA-Repeat definiert sieben Allele, von denen vier Allele bei Kaukasiern vorkommen. Allel 2 beinhaltet 12 CA-Wiederholungen (am häufigsten), Allel 3 13, Allel 4 14 und Allel 5 15. Pravica et al. konnten zeigen, dass Homozygote Allel-2-Träger, signifikant mehr IFN- γ produzieren als die anderen Genotypen [263]. Am 5'-Ende der CA-Repeat-Region fanden Pravica et al. den A874T SNP, dessen T-Allel mit dem Allel 2 in vollständigem Linkage Disequilibrium liegt [264]. Das A-Allel scheint mit einer NF- κ B-Bindungsstelle zu interferieren und so direkt die IFN- γ -Produktion zu verändern. *In vivo* konnte das Allel 2 mit erhöhter Abstoßung von Nierentransplantaten assoziiert werden [14]. Bream et al. konnten zwischen dem T179G SNP und der IFN- γ -Antwort auf TNF- α -Stimulation eine Assoziation finden [31].

1.4.2 Th2-System und Zytokine

IL-4 ist das wichtigste Zytokin zur Differenzierung naiver CD4⁺-Zellen in Th2-Zellen. Weitere wichtige Zytokine des Th2-Systems sind IL-5, IL-10 und IL-13.

1.4.2.1 IL-4

1.4.2.1.1 Struktur und Rezeptor IL-4 ist ein 20 kD großes Protein, das aus vier α -Helices besteht [276] und wurde erstmals 1982 als B-Zellen-stimulierender Faktor beschrieben [143]. Es ist das charakteristischste Zytokin der Th2-Subklasse. Es wird aber auch von aktivierten Mastzellen, Basophilen und einigen CD8⁺-T-Zellen produziert. Die Existenz von zwei IL-4 Rezeptoren (Typ I und Typ II) ist bisher bekannt. Der Typ I-Rezeptor entsteht durch Verbindung der IL-4-Rezeptor- α -(IL-4R α -) Untereinheit mit der allgemeinen γ -Kette (γ c), die auch Bestandteil der Rezeptoren für IL-2, IL-7, IL-9 und IL-15 ist [180, 189, 164]. Die IL-4R α -Untereinheit ist ein 140 kD großes Protein, welches IL-4 mit sehr hoher Affinität bindet. Sie zeigt die charakteristischen Bestandteile eines Typ I-Zytokinrezeptors, die durch Cystein Residuen, einem W-S-X-W-S Motiv (Tryptophan-Serin-X-Tryptophan-Serin), Fibronectin-Typ II-Modulen in der extrazellulären Domäne und Prolin-reiche Sequenzen in der intrazellulären Domäne gekennzeichnet sind, letztere sind wichtig bei der Reaktion mit JAK [180]. Das W-S-X-W-S Motiv dient der Bindung von IL-4-Dimeren. Bei Bindung von IL-4 an seinen Rezeptor wird eine rezeptorassoziierte Tyrosinkinase sowie STAT6 aktiviert. STAT6 führt wiederum zur Induktion von GATA3 (GATA-binding protein 3), einem Zink-Finger Transkriptionsfaktor, der die weitere IL-4-Expression fördert. Die γ -Kette dient der weiteren Signaltransduktion. Der Typ II-Rezeptor enthält nicht die γ -Kette sondern die IL-13R α 1-Untereinheit und ist somit mit dem IL-13-Rezeptor identisch.

1.4.2.1.2 Funktion IL-4 dient als Wachstums- und Differenzierungsfaktor für Th2-Zellen und hilft so bei der Entwicklung von IL-4- und IL-5-produzierenden Zellen aus naiven T-Lymphozyten über Induktion des Transkriptionsfaktors GATA3. Über den STAT6-Signaltransduktionsweg kommt es auch zur Herabregulation der IFN- γ -Expression [321, 102]. Es bewirkt eine Proliferation von B-Zellen in Gegenwart von Anti-Ig-Antikörpern sowie eine B-Zell-Blastengenerierung. IL-4 induziert die vermehrte Expression von Klasse II-MHC-Molekülen. Bei der Regulation von allergischen Reaktionen stimuliert es den Switch zu IgE. Neben seiner Bedeutung bei der Entstehung von Allergien und der Abwehr von Helminthen, hemmt es die Makrophagen-Aktivität, verhindert die meisten Effekte von IFN- γ und die

Ausschüttung von IL-1, Stickoxiden und Prostaglandinen [36]. IL-4 stimuliert die Expression von Adhäsionsmolekülen, vor allem VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1) auf Endothelzellen. Hierdurch kommt es zu einer verstärkten Bindung von Lymphozyten, Monozyten und Eosinophilen. Auch stimuliert es Endothelzellen zur Produktion von MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1), welches seinerseits als starkes Chemokin für Eosinophile dient. Daneben induziert es die Expression der Chemokine Eotaxin-1, -2 und -3 [220, 368, 135].

1.4.2.1.3 IL-4-Gen Der Lokus der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 ist über verschiedene Spezies hinweg strukturell konserviert. Alle drei Gene liegen in enger Nachbarschaft in einer 125 kb großen Region auf Chromosom 5q31 [91, 195]. Das IL-4-Gen umfasst etwa 10 kb und beinhaltet vier Exons und drei Introns [10]. In der Promotorregion befinden sich viele regulatorische Elemente, die die weitere Expression von IL-4 bei akuter Aktivierung fördern. Die Expression des IL-4-Gens in naiven T-Zellen wird über den Transkriptionsfaktor GATA3 reguliert. Dieser wird von naiven T-Zellen in niedrigen Konzentrationen exprimiert und durch IL-4 über den STAT6-Signaltransduktionsweg hochreguliert. STAT6 führt zur weiteren Expression von Th2-Zytokinen [366, 364]. GATA3 fördert auch die Expression von c-Maf [131], einem selektiven Transkriptionsfaktor für IL-4, und verhindert den IL-12-Transduktionsweg, wodurch die weitere Produktion von IFN- γ gehemmt wird [247].

Innerhalb des IL-4-Gens befinden sich mehrere Polymorphismen, deren minore Allele mit erhöhter IL-4-Produktion [275, 230], erhöhten IgE-Serum Konzentrationen [149, 21, 315], Asthma [275, 238], IgA-Nephropathie [207], einigen Karzinomen [173, 162], multipler Sklerose [152, 331], rheumatoider Arthritis [40, 313], Schlaganfall [363] und Myokardinfarkt bei jungen Erwachsenen [249] assoziiert wurden.

Der C589T-Polymorphismus (rs2243250) in der Promotorregion scheint Funktionalität zu besitzen, da gezeigt werden konnte, dass dieser die IL-4-Transkription beeinflusst [275]. Dieser Polymorphismus ist Teil eines Haplotypenblocks bei Kaukasiern und steht mit 18 weiteren Polymorphismen in starkem Linkage Disequilibrium [233], unter diesen der C33T SNP (rs2070874) in der 5'UTR (Untranslated Region) des Exon 1.

1.4.2.2 IL-13

1.4.2.2.1 Struktur und Rezeptor IL-13 wurde 1989 erstmalig beschrieben [35]. Die cDNA wurde wenige Jahre später kloniert [212, 219, 226]. Es besteht aus 132 Aminosäuren, inklusive einer 20-Aminosäuren-langen Sequenz, die von der Muttersubstanz abgeschnitten wird. Das Protein beinhaltet vier α -Helices. Die c-terminale α -Helix geht in Wechselwirkung mit den IL-13R α 1 und IL-13R α 2-Untereinheiten, während zwei weitere α -Helices mit der IL-4R α -Untereinheit des IL-13-Rezeptors wechselwirken. Es teilt mit IL-4 25% Homologie [54, 66]. Als Typ I-Zytokin wirkt IL-13 über Typ I-Zytokin-Rezeptoren. Der IL-13-Rezeptor ist ein heterodimeres Molekül, das aus der IL-4R α -Kette des IL-4-Rezeptors und einem IL-13-bindenden Protein (IL-13R α 1) besteht. Daneben existiert noch die IL-13R α 2-Untereinheit [8, 42, 111, 130, 217, 365]. Die IL-13R α 1-Untereinheit ist ein 65-70 kd glykosyliertes Protein, das alleine IL-13 mit relativ geringer Affinität, in Verbindung mit der IL-4R α -Kette aber mit hoher Affinität bindet. Die IL-13R α 1-Untereinheit findet sich auf sehr vielen Zelltypen, nicht aber auf T-Zellen [5, 96, 104, 228]. Die IL-13R α 2-Untereinheit findet sich *in vivo* in löslicher Form und stellt einen "decoy"- (Köder) Rezeptor dar [365]. Eine Überexpression führt möglicherweise zu einer Minderung der IL-13-Signalaktivität. Die IL-13R α 2-Untereinheit findet sich in größeren intrazellulären Pools, z.B. in Monozyten, die nach Stimulation mit IFN- γ rasch an die Oberfläche transportiert werden. Die Hochregulierung der IL-13R α 2-Untereinheit durch IFN- γ resultiert ebenfalls in einer Minderung der IL-13-Signalantwort, sodass die IL-13R α 2-Untereinheit als "decoy"-Rezeptor die IL-13 Antwort regulieren kann und IFN- γ hierüber einen regulativen Einfluss auf IL13 ausübt (zur Übersicht siehe Hershey et al. [129]).

1.4.2.2.2 Funktion IL-13 wird überwiegend von CD4⁺-Th2-Zellen produziert, aber auch von aktivierten Basophilen, NK-Zellen, Eosinophilen und Mastzellen exprimiert. Seine Hauptrolle spielt IL-13 in der Pathogenese von Allergien und der Abwehr parasitärer Erkrankungen [352, 353]. Auf B-Zellen wirkt es ähnlich wie IL-4: Es stimuliert die Proliferation und den Switch zu IgG4 und IgE im Zusammenspiel mit einer CD40/CD40-Ko-Stimulation [242]. Es fördert die Expression von Oberflächenantigenen wie dem low-affinity IgE-Rezeptor CD23 (FcεRII) [54]. In Monozyten und Makrophagen verstärkt es die Expression von Integrinen und von Klasse II-MHC und CD23. Darüber hinaus hemmt es die Produktion von Prostaglandinen, Reactive Oxygen Species (ROS) und Stickstoffabkömmlingen sowie die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α und IL-12 [67, 71, 81, 305]. IL-13 fördert im Zusammenspiel mit IL-4 anaphylaktische Reaktionen in einer STAT6-abhängigen Reaktion. Hierdurch kommt es zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Entzündungsmediatoren wie dem Platelet-activating Factor, Histamin, Serotonin oder Cysteinyl-Leukotrienen [312]. Eine Hemmung von IL-4 und IL-13 kann in der Folge zu einer abgemilderten anaphylaktischen Reaktion führen, da die sensitisierenden Effekte dieser Mediatoren abgeschwächt werden. Auf Eosinophile wirkt IL-13 direkt und verstärkt deren Rekrutement, verlängert deren Lebensdauer und aktiviert diese [142, 198, 261]. In Endothelzellen induziert es die Produktion von VCAM-1. Es verstärkt die Proliferation und Kontraktion von glatten Muskelzellen. Auf T-Zellen scheint es keine Auswirkungen zu haben [369] und somit, im Gegensatz zu IL-4, nicht bei der Entwicklung von Th2-Zellen beteiligt zu sein, sondern erst während der Effektorphase gemeinsam mit IL-4 wirksam zu werden.

1.4.2.2.3 IL-13-Gen Das IL-13-Gen befindet sich auf Chromosom 5q31, nur 12 kb vom IL-4-Gen entfernt. Es beinhaltet vier Exons und drei Introns [302]. Bei Kaukasiern findet sich ein Block an SNPs, die in vollständigem Linkage Disequilibrium zueinander stehen von SNP C1923T in Intron 3 bis SNP C2749T in der 3'-UTR-Region. Innerhalb dieses Blocks liegt an Position 130 in Exon 4 der kodierende Polymorphismus R130Q (rs20541), der zu einem Arginin/Glutamin Austausch führt und mit Asthma, Heuschnupfen, erhöhten IgE-Spiegeln, atopischer Dermatitis, erhöhten Eosinophilenzahlen, Psoriasis, Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) und vermindertem Risiko für Non-Hodgkin-Lymphome assoziiert wurde [22, 47, 342, 146, 107, 123, 192]. Die Variante Q130 (Glutamin) (A-Allel) führt zur Phosphorylierung von STAT6 in Monozyten, vermindert der Affinität zur IL-13Rα2-Untereinheit und erhöhter IL-13-Expression in Patienten mit Asthma [336, 11]. Der R130Q-Polymorphismus liegt auch in hohem Linkage Disequilibrium zum C1112T SNP (rs1800925) in der Promotorregion, welcher ebenfalls mit Asthma, atopischer Dermatitis und Nahrungsmittelallergien in Zusammenhang gebracht wurde [136] und funktionellen Charakter aufweist [38]. Cameron et al. konnten an mitogenstimulierten PBMCs von 174 Frauen zeigen, dass homozygote 1112 T-Allel-Trägerinnen signifikant mehr IL-13 produzieren als die anderen beiden Genotypen. Ein weiterer Polymorphismus (rs1295685), der mit dem Arg130Gln-Polymorphismus in starkem Linkage Disequilibrium steht, wurde ebenfalls mit erhöhten IgE-Konzentrationen im Nabelschnurblut assoziiert [278].

1.4.3 Interaktionen

Zusammenfassend lässt sich darstellen, dass Th1- und Th2-Zytokine in mehreren Bereichen zu gegenteiligen Effekten führen. IL-4 fördert das Wachstum der Th2-Zellen und mindert die Expression von IFN-γ in Th2-Zellen [49]. IFN-γ hemmt das Wachstum der Th2-Zellen und mindert die IL-13-Antwort durch Hochregulierung der IL-13Rα2-Untereinheit. IL-4 fördert den Switch zur IgE-Klasse, IFN-γ hemmt ihn. IL-4 reguliert die Th2-abhängige Immunreaktion vom Soforttyp und IFN-γ reguliert die Th1-abhängige Immunreaktion vom verzögerten Typ.

IL-4 und IL-13 zeigen wiederum viele gemeinsame Eigenschaften, da sie die IL-4Rα-Untereinheit teilen und sich die Signaltransduktion beider der gleichen Mechanismen bedient. Der Typ II-IL-4-Rezeptor IL-4Rα/IL-13Rα1 wird von beiden Zytokinen gebunden. Die Gene für IL-4 und IL-13 finden sich sehr nah

beieinander auf der gleichen chromosomalen Region und beinhalten beide die gleichen Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren, sodass die Regulation der Expression beider Gene vermutlich sehr ähnlich gesteuert wird [302]. Beide spielen bei allergischen Reaktionen und der Abwehr von Parasiten eine große Rolle und zusammen bewirken sie im ZNS eine Hochregulation der Cyclooxygenase-2 (COX-2) [298, 356, 355, 294]. Unterschiede zwischen IL-4 und IL-13, vor allem in der Th2-Differenzierung, sind vermutlich dadurch begründet, dass sich die γ c-Untereinheit und nicht die IL-13R α 1-Untereinheit auf T-Zellen, NK-Zellen, Basophilen und Mastzellen findet. B-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen exprimieren hingegen beide Rezeptoruntereinheiten und werden damit auch von beiden Zytokinen beeinflusst [54].

Damit ist verständlich, dass die Untersuchung der drei Zytokine IL-4, IL-13 und IFN- γ wichtige Ergebnisse im Zusammenspiel von Th1- und Th2-Zytokinen erzielen kann.

1.5 Nachweismethoden

Um Aussagen über die Funktionalität immunkompetenter Zellen machen zu können, stehen verschiedene Nachweismethoden zur Verfügung. Diese können prinzipiell untergliedert werden in Methoden, die Aussagen über die Zellen, deren Zusammensetzung und Funktionalität machen und Nachweismethoden für die Zellprodukte. Mittels Durchflusszytometrie oder Nachweis der Proliferationsfähigkeit können verschiedene Zellarten charakterisiert, deren Größe, Teilungsfähigkeit oder Oberflächenstruktur bestimmt werden. ELISA (Enzyme-linked immuno-sorbend assay), ELISpot (Enzyme-linked immuno-spot) oder Luminex sind Verfahren, die Zellprodukte, also Zytokine quantifizieren und somit Aussagen über die Funktionalität auf Proteinebene zulassen. Daneben können mittels verschiedener Verfahren wie Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) auch Nachweise auf mRNA-Ebene erfolgen.

Die ELISpot-Methode ist insgesamt eine sehr genaue Methode, die bei hoher Sensitivität auch die Produktion von Zytokinen erfassen kann, die nur in vergleichbar geringen Mengen erfolgt. In einigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die ELISpot-Methode sensitiver im Vergleich zum ELISA ist [79, 322, 150]. Dabei ist es möglich, die Zytokinproduktion von nur wenigen Zellen sichtbar zu machen und somit praktisch auf dem Einzelzellniveau zu arbeiten [182]. Im Unterschied zum ELISA misst der ELISpot die Anzahl Zytokin-produzierender Zellen, während der ELISA die produzierte Zytokinmenge erfasst. Arbeiten, die die Zytokinproduktion von Zellen gemessen mit RT-PCR, ELISA und ELISpot verglichen haben, beschreiben in Bezug auf die Menge an produziertem Zytokin Unterschiede. So kann die RT-PCR eine Zytokinproduktion auf RNA-Ebene nachweisen, was aber noch nicht bedeuten muss, dass diese Zytokine auch sezerniert werden. Der ELISA kann wiederum nur Zytokine nachweisen, die auch produziert wurden. Die ELISpot-Methode kann nicht unterscheiden, ob ein Zytokin sezerniert wurde, oder dieses beispielsweise mit einem Rezeptor interagiert, nicht aber von dieser Zelle stammt [85]. Die Auswahl der geeigneten Methode ist daher eine wichtige Voraussetzung, um Aussagen zu erhalten, die zur Fragestellung passen. In der vorliegenden Arbeit wurde die ELISpot-Methode benutzt, um Aussagen über die tatsächliche Zytokinproduktion peripherer Blutmonozyten machen zu können, die mit verschiedenen Neurotransmittern stimuliert wurden. Da IL-13 mit ELISA kaum nachweisbar ist, wäre die Auswahl der ELISA-Nachweismethode unzureichend gewesen.

1.5.1 Prinzip des ELISpot

Die ELISpot-Methode wurde erstmals 1983 sowohl von Czerkinsky et al. als auch Sedgwick et al. beschrieben [63, 289] und stellt eine Weiterentwicklung der hämolytischen Plaque-Assays dar [148]. Sie ist dem ELISA sehr ähnlich und basiert ebenfalls auf dem Grundprinzip eines "Sandwich-Komplexes" aus zwei Antikörpern sowie dem zu bestimmenden Antigen. Der Beschichtungsantikörper oder 1. Antikörper (1. Ak) wird in einer Platte mit 96 Kavitäten (96-Well-Platte) auf eine Nitrozellulosemembran am Boden der Platten gebunden [222]. An diesen bindet das zu bestimmende Antigen und schließlich der Detektionsantikörper oder 2. Antikörper (2. Ak). An den 2. Ak kann ein Enzym gekoppelt werden, welches in

einer Farbreaktion einen Farbumschlag bewirkt. Dieser wird als punktuelle Verfärbung auf der Membran sichtbar und kann nach Trocknen der Platte mit einem Mikroskop quantifiziert werden, sowohl in der Anzahl als auch Größe der einzelnen Spots (aus dem Englischen: Punkte). Über die Anzahl der Spots können dabei indirekt Aussagen über die Anzahl Zytokin-produzierender Zellen und über die Größe bzw. Gesamtfäche aller Spots Aussagen über die Menge an ausgeschüttetem Zytokin gemacht werden (siehe Abb. 1.5.2.1).

Zur Optimierung der Methodik können verschiedene Variablen des ELISpot-Verfahrens verändert werden, um für die Versuchsreihe abgestimmte und optimale Bedingungen zu erreichen.

1.5.2 Methodenoptimierungen

Sedgwick und Holt haben bereits 1986 verschiedene methodische Schwierigkeiten der ELISpot-Technik dargestellt [290]. In der Literatur wurden die einzelnen Komponenten oftmals abgewandelt und verändert, um die Methode weiter zu entwickeln und auf die jeweiligen Gegebenheiten anzupassen. Dabei wurde ersichtlich, dass es insgesamt keine einheitliche Vorgehensweise gibt.

Bei der Konzentration des 1. Ak schwankte der verwendete Konzentrationsbereich zwischen $4 \mu\text{g/ml}$ [85], $10 \mu\text{g/ml}$ [79] und $15 \mu\text{g/ml}$ [61]. In einigen späteren Arbeiten wurden oft kommerziell erwerbbar ELISpot-Kits verwendet, bei denen die Platten schon mit dem 1. Ak beschichtet wurden. Angaben über die Konzentration finden sich daher gehäuft nicht [18]. Insgesamt weist die Nitrozellulosemembran, welche im Verlauf der ELISpot-Methodenentwicklung eingesetzt wurde, eine hohe Proteinbindungskapazität auf. Hierdurch konnte die Menge an Beschichtungsantikörper eingespart werden.

Der 1. Ak wurde überwiegend mit Phosphatgepufferter Salz-Lösung (PBS) abgewaschen [62, 61, 290], teilweise angereichert mit fetalem Kälberserum (FCS) [332] oder 0.05% Tween [79]. Die übrigen Waschschrte wurden zumeist mit PBS allein oder angereichert mit 0.05% Tween durchgeführt [62, 79, 290, 297, 332].

Das Gesamtvolumen in den Plattenvertiefungen schwankte zwischen $100 \mu\text{l}$ [79, 18, 62, 151, 61], $150 \mu\text{l}$ [297] und $200 \mu\text{l}$ [61, 332].

Die verwendeten Zellkonzentrationen lagen in der Literatur zwischen 10^3 bis 10^6 Zellen/Well [61, 62, 79, 151, 332, 85].

Die meisten Arbeiten verwendeten Zellen aus Buffy Coats [174] oder von wenigen Probanden. Einige Arbeiten wurden auch mit klonierten Zellreihen wie Jurkat-Zellen oder B-Lymphomzelllinien durchgeführt. Viele Arbeiten verwendeten auch Zellen murinen Ursprungs.

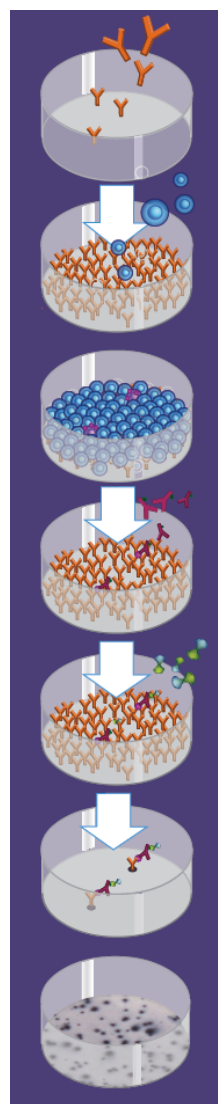
Die Inkubationszeiten der Zellen reichte von 3-5 h [62] über 24-48 h [338, 79] bis zu 3 Tagen [297]. Auch benötigten die einzelnen Zytokine teilweise unterschiedlich lange Inkubationszeiten [274, 350].

Alle Arbeitsgruppen verwendeten Antibiotika, die meisten Penicillin/Streptomycin [174, 78, 297, 63] andere Gentamicin [338, 18].

Zur Verminderung von Randeffecten wurden unterschiedliche Techniken, wie der Einsatz von Aluminiumfolie um die Platten, entwickelt, wodurch sich auch der Kontrast zwischen den Spots und der Well-Membran verbessern und vereinheitlichen sollte [151]. Ein Blockierschritt zur Sättigung der freien Proteinbindungsstellen der Nitrozellulosemembran fand in unterschiedlicher Weise Einsatz. Verwendet wurden PBS mit FCS [85, 290, 332] oder RPMI-1640 Medium mit FCS [62, 151, 182]. Die Zeitdauer betrug zwischen 20 min [62, 332] und bis zu 120 min [290, 182, 85] bei 37°C .

Zur Zellaktivierung wurde meist Phythämagglutinin (PHA) verwendet [61]. Die Konzentrationen lagen

Abbildung 1.5.2.1:
ELISpot -
Schematische
Darstellung



dabei zwischen 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [338], 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [18], 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [79, 297] und 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [61, 79].

Die Detektion über den 2. Ak erfolgte teilweise bei Raumtemperatur [61, 79, 85, 332, 297], teilweise bei niedrigeren Temperaturen über Nacht [18, 151, 290, 182]. Die Inkubation über Nacht soll dabei ein geringeres Auftreten von Randeffekten verursachen [290].

Die Farbreaktion zuletzt wurde teils schon nach sehr kurzer Zeit wieder gestoppt, zumeist mit Leitungswasser [61, 62, 79, 297, 332], teilweise auch mit destilliertem Wasser (aqua destillata/a.d.) [18, 85, 151, 182]. In anderen Arbeiten wurde die Farbreaktion erst nach etwa einer Stunde gestoppt [18, 297]. Daneben wurde es explizit empfohlen, die Farbreaktion zu überwachen, um eine zu starke Anfärbung beobachten zu können [62].

Die Auswertung schließlich erfolgte nach Trocknen der Platten, zumeist nach frühestens 24 h, teilweise aber auch schon nach 30 min [332]. Anfangs erfolgte eine manuelle Zählung der Spot-Forming-Cells (SFCs). Mit der Einführung automatisierter Software wurde die ELISpot-Methode deutlich objektiver [332].

Neben den verschiedenen methodischen Ansatzpunkten fanden einige Autoren auch bereits bei geringen Fallzahlen, dass ein stark unterschiedliches Niveau in der Zytokin-Produktion (IFN- γ , IL-4 und IL-13) für die jeweiligen Probanden bestand. Teilweise wurde deshalb gefordert, zur optimalen Quantifizierung die jeweilige Zellkonzentration für den jeweiligen Probanden vorab zu bestimmen [18]. Andere Autoren gingen auf die möglichen Hintergründe nicht näher ein.

1.6 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

1.6.1 Primäre Fragestellung

Basierend auf eigenen Vorversuchen ist die primäre Fragestellung dieser Arbeit, ob die gleichzeitige Stimulation von Lymphozyten mit dem Neurotransmitter Serotonin sowie dem Neuropeptid Substanz P einen kostimulatorischen Effekt auf die Produktion von Zytokinen hat im Vergleich zur jeweiligen alleinigen Gabe. Dies wurde bisher noch nicht untersucht.

1.6.2 Sekundäre Fragestellungen

Sekundäre Fragestellungen waren, mögliche Einflussfaktoren auf die interindividuelle Variabilität herauszuarbeiten. Wie in der Einleitung bereits ersichtlich wurde, ist die Datenlage diesbezüglich bisher sehr unzufriedenstellend. Zum einen findet sich eine große Bandbreite methodischer Abwandlungen der ELISpot-Methode, zum anderen werden bei den meisten Untersuchungen gepoolte Zellen von Buffy Coats oder bestimmte Zelllinien benützt, was eine Untersuchung interindividueller Unterschiede nicht ermöglicht. Die wenigen Arbeiten, die Zellen einzelner Probanden verwendeten, hatten zu geringe Fallzahlen um auf die Hintergründe der interindividuellen Schwankungen einzugehen. Da also bisher kaum verlässliche Daten an einem größeren Probandenkollektiv erhoben wurden, sollten in der vorliegenden Arbeit nach Optimierung der Methodik und Benennung der wichtigsten Störfaktoren, mögliche Einflussfaktoren auf die interindividuelle Varianz untersucht werden und dabei vor allem soziodemographische und genetische Faktoren [17, 329] einbezogen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

2.1.1 Buffy Coats

Für die Entwicklung der Methodik wurden die ersten Versuche mit Zellen aus Buffy Coats (CPD-Blut) durchgeführt. Hierdurch konnten mögliche interindividuelle Unterschiede während der Vorversuche weitgehend ausgeschlossen werden. Das Verfahren zur Zellisolation entspricht im Wesentlichen den unter 2.4.1 auf Seite 27 beschriebenen Vorgängen.

2.1.2 Kontrollpersonen

Im Hinblick auf mögliche Artefakte auf die Ergebnisse durch Verwendung von Zellen aus Buffy Coats wurde vor der Untersuchung des Probandenkollektivs, die weitere Optimierung der Methodik durch nicht-poolte Zellen von wenigen Kontrollpersonen vorgenommen.

2.1.3 Probanden

Die primäre Fragestellung wurde an einem Kollektiv von 73 Probanden untersucht. Den Probanden wurde an zwei Zeitpunkten im Abstand von vier Wochen Blut entnommen, um mögliche intraindividuelle Schwankungen erfassen und hierfür kontrollieren zu können. Die Blutentnahme erfolgte jeweils morgens zwischen 8 und 9 Uhr mit CPDA-Monovetten. Das entnommene Blut wurde anschließend sofort weiter verarbeitet.

Die Probanden wurden aus der Münchner Allgemeinbevölkerung rekrutiert. Um eine genetisch einheitliche Population zu erhalten, wurden nur solche Probanden ausgewählt, deren Eltern und Großeltern aus dem süddeutschen Raum und dessen Nachbarländern stammten. Ausschlusskriterien waren psychiatrische Erkrankungen der Probanden selbst oder deren Verwandten ersten Grades sowie ernsthafte somatische Erkrankungen der Probanden. Die körperliche Gesundheit wurde anamnestisch sowie durch die Bestimmung klinischer Laborparameter erfasst. Die Studie wurde durch die lokale Ethikkommission genehmigt. Alle Probanden wurden vor jeder Blutentnahme über Sinn und Zweck sowie Freiwilligkeit der Untersuchungen aufgeklärt und es wurde das schriftliche Einverständnis eingeholt. Die Bestimmungen zum Datenschutz wurden eingehalten.

2.2 ELISpot-Untersuchungen

2.2.1 Plattenaufteilung und Randeffekte

Für Versuche mit ELISpot-Platten sind Randeffekte bekannt. Diese können sich durch unterschiedliche Inkubationsbedingungen im Brutschrank am Rand und in der Mitte der Platten ergeben [151] oder durch die Inkubationsbedingungen des 2. Antikörpers [290]. Die Varianz von Mehrfachwerten kann hierdurch zum Teil erheblich beeinflusst werden. Die Platten wurden daher unterschiedlich aufgeteilt. Zur Bestimmung der benötigten Konzentrationen von Substanz P und Serotonin wurden in den Vorversuchen nur die inneren Wells der Platten beschichtet und die Randwells gänzlich ausgespart. Bei der endgültigen Versuchsreihe wurden die Ränder wieder mit beschichtet, aber mit Dreifachwerten gearbeitet und die Platten so aufgeteilt, dass jeweils nur ein Well aller Dreifachwerte am Rand lag (siehe Abb. 2.2.1.1 auf der nächsten Seite). In der Literatur wurden ebenfalls häufig Dreifachwerte verwendet, allerdings wurde meist nicht angegeben, wie diese über die Platten verteilt wurden [61]. Einzig die Wells zur Bestimmung des erst später eingeführten Parameters Serotonin in einer Konzentration von 10^{-4} mol/l lagen aus methodischen Gründen nur am Rand.

Abbildung 2.2.1.1: Plattenaufteilung "Standard IIa"

Proband:		Con 203					Con 204				
Zytokin:		IFN- γ					IFN- γ				
Zeit		15h					15h				
T1	A	4	5	Sp	5N	5N	Sp	5	5	5	4
	B	L									L
	C	P									P
	D	N	5 + Sp		5 + Sp		N				
T2	E	N	5 + Sp		5 + Sp		N				
	F	P	5	Sp	5N	5N	Sp	5	5	P	
	G	L								L	
	H	4								4	

"4": entspricht Stimulation mit Serotonin in einer Konzentration von 10^{-4} mol/l und PHA; "5": Stimulation mit Serotonin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l und PHA; "L": Leerwert; "P": Grundstimulation nur mit PHA; "N": Kontrolle mit NaCl und PHA; "Sp": Stimulation mit Substanz P (10^{-10} mol/l) und PHA; "5N": Stimulation mit Serotonin (10^{-5} mol/l) sowie NaCl und PHA; "5 + Sp": Stimulation mit Serotonin (10^{-5} mol/l) sowie mit Substanz P (10^{-10} mol/l) und PHA.

2.2.2 Plattenbeschichtung

Es wurden 96-Well-Platten der Firma Millipore verwendet und es wurde unter der Sterilarbeitsbank (Laminarflow) gearbeitet. Der Beschichtungsantikörper oder 1. Antikörper (1. Ak) wurde in einem Karbonatpuffer gelöst. Einzelheiten zur Pufferherstellung sind unter 7.4.2.1 auf Seite 130 beschrieben. Das zur Verdünnung notwendige Volumen Puffer (für eine Platte 9.925 ml; siehe 7.4.3.1 auf Seite 130) wurde mit Pipetten in 15-ml-Falcons vorgelegt und die benötigte Menge Antikörper hinzugegeben. Es wurden Konzentrationen von 15 $\mu\text{g/ml}$, wie vom Hersteller vorgeschlagen, sowie 10 $\mu\text{g/ml}$ und 7,5 $\mu\text{g/ml}$ getestet. Nachdem keine signifikanten Unterschiede in der Spotzahl festgestellt werden konnten, wurde die Konzentration für alle weiteren Versuche auf 7,5 $\mu\text{g/ml}$ festgesetzt. Die Antikörper-Lösung wurde auf dem Vortex kurz verschüttelt, für 10-15 min stehen gelassen, anschließend nochmals verschüttelt und schließlich wurden jeweils 100 μl in die Wells pipettiert. Die Platten wurden bei 4-8 °C bis zum nächsten Tag mit geschlossenem Deckel inkubiert. Der Hersteller gab diesbezüglich keine genaueren Zeitangaben an. Nach Czerkinsky et al. können beschichtete Platten bei 4 °C mehrere Wochen aufbewahrt werden [62].

2.2.3 Antibiotikaverwendung

Um mögliche Einflüsse durch die Zugabe von Antibiotika zu vermeiden, wurde zunächst versucht, ohne Antibiotika zu arbeiten. Um sterile Bedingungen zu erreichen, wurden die Arbeiten unter der Laminarflow durchgeführt. Alle benötigten Arbeitsmaterialien wurden vor Einbringen unter die Laminarflow mit 70%igem Alkohol abgesprüht. Es wurden möglichst wenige Gegenstände gleichzeitig unter der Laminarflow aufbewahrt, spezielle Laborkittel getragen, sterile OP-Handschuhe verwendet und die Laminarflow wurde regelmäßig mit Barrycidal-Lösung ausgewaschen. Alle Medien wurden vor Benutzung auf mögliche Kontaminationen mikroskopisch untersucht, benötigte Volumina wurden vorab in 50-ml-Falcons abgefüllt und in diesen vorgewärmt, die Trypan-Blau-Lösung wurde regelmäßig frisch angesetzt. Die Brutschrän-

ke und Wasserbäder wurden regelmäßig gereinigt. Die Platten wurden unter der Laminarflow mit der 8-Kanal-Pipette gewaschen und die zu verwerfende Substanz unterhalb der Laminarflow entleert, um den Luftstrom nicht passieren zu müssen. Da sich allerdings Kontaminationen nicht dauerhaft vermeiden ließen, musste die endgültige Versuchsreihe unter Hinzunahme von Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep oder P/S) durchgeführt werden (siehe hierzu auch 7.4.1.4 und 7.4.1.7 auf Seite 129). Mögliche, dennoch auftretende Kontaminationen wurden durch einen Farbumschlag des Mediums aufgrund einer pH-Wertänderung sichtbar und durch mikroskopische Kontrolle erfasst.

2.2.4 Mediumwechsel

Um den pH-Wert des Mediums stabil zu halten, wurde bei Versuchsreihen mit längeren Inkubationszeiten (48 h) ein Wechsel des Mediums nach der halben Inkubationszeit durchgeführt. Das Medium wurde unter der Laminarflow verworfen und die Platten mit frischem auf 37 °C vorgewärmtem Medium gefüllt. Hierdurch konnte ein gleichmäßigerer pH-Wert erhalten bleiben. Allerdings zeigte sich, dass sich in den verworfenen Überständen noch zwischen 20.000 bis 100.000 Zellen/Well befanden und somit nicht alle Zellen auf der Nitrozellulosemembran adhärirten. Da sich hierdurch artifizielle Schwankungen in der Spot-Zahl ergeben könnten und bei der letzten Versuchsreihe kurze Inkubationszeiten zwischen 14 und 25 h gewählt wurden, war ein Wechsel des Mediums nicht mehr notwendig.

2.2.5 Inkubationszeiten

Die Inkubationszeiten zur Stimulation der Zellen mit Mitogen und den untersuchten Substanzen wurden in Vorversuchen ermittelt. Es wurden Inkubationszeiten von 12, 17, 24 und 48 h getestet. Vom Hersteller wurde eine Inkubationszeit von 12 h empfohlen. Mabtech empfiehlt eine Inkubationszeit zwischen 10 und 40 h [3]. Andere Hersteller empfehlen Inkubationszeiten zwischen 24 und 48 h [101]. Die endgültige Versuchsreihe wurde mit einer Inkubationszeit von 15 h durchgeführt. Für die Bestimmung von IL-13 wurden zwei Inkubationszeiten von 15 und 25 h untersucht, da IL-13 schwieriger bei kürzeren Inkubationszeiten nachzuweisen ist. Die Inkubationsbedingungen im Brutschrank betragen 37 °C, 95% Feuchtigkeit bei einem CO₂-Gehalt von 5%.

2.2.6 Gesamtvolumen im Well

Um die Zellen während der Inkubationszeit auf den Platten mit ausreichend Nährstoffen zu versorgen, sind mindestens 100 µl Medium/Well notwendig. Bei ersten Versuchen mit 100 µl zeigte sich jedoch gehäuft am Ende der Inkubationszeit ein pH-Wert-Umschlag in den basischen Bereich. Um den pH-Wert konstant zu halten wurden Versuche mit 150 µl und 200 µl Gesamtvolumen durchgeführt, was zu deutlich einheitlicheren pH-Werten führte und die Güte der Ergebnisse insgesamt besserte. In der letzten Versuchsreihe wurde daher ein Volumen von 200 µl verwendet (siehe auch Abb. 7.11.1.3 und 7.11.1.4 auf Seite 138 im Bildanhang).

2.2.7 Zellkonzentration

Um eine reliable Spot-Messung mit dem ELISpot-Reader zu gewährleisten, musste eine Zellkonzentration ermittelt werden, die zu einer ausreichenden, aber nicht zu hohen Dichte von Spots führt. Bei Zellkonzentrationen über 250.000 Zellen/Well können die einzelnen Spots unter Umständen nicht mehr sicher quantifiziert werden, da es durch Ausbildung multipler Zelllagen zu einer Überlagerung der Spots kommen kann, und diese dann kaum mehr quantifizierbar sind [274]. In Vorversuchen wurden Zellkonzentrationen von $0,75 \times 10^6$, 1×10^6 und 2×10^6 Zellen/ml getestet. Für eine Detektion von IFN- γ zeigte sich eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml (1×10^5 Zellen/Well) und für die beiden Interleukine von 2×10^6 Zellen/ml (2×10^5 Zellen/Well) als optimal.

Die Vitalitätsbestimmungen mit der Neubauerzählkammer zeigten, dass sich nach dem Auftauen ein gewisser Prozentsatz an toten Zellen in den Zellsuspensionen befand. Dieser Prozentsatz wurde bei der Berechnung der endgültigen Konzentration an Zellen in der Suspension berücksichtigt. Wenn beispielsweise 10% tote Zellen gezählt wurden, so wurde eine Konzentration von $2,2 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Dieses Verfahren findet auch in der Literatur Anwendung [61]. Um homogene Zellkonzentrationen in den Wells zu erhalten, wurde außerdem darauf geachtet, die Zellsuspensionen regelmäßig mit einer Transferpipette vorsichtig zu homogenisieren.

2.2.8 Leerwerthintergrund

Um klare Aussagen über den Einfluss einer Stimulation der Zellen durch ein Mitogen oder die Neurotransmitter machen zu können, ist es bedeutsam, dass die Leerwerte keine Spots aufweisen. Um die Platten mit dem ELISpot-Reader valide ausmessen zu können, ist es darüber hinaus erforderlich, dass jegliches Hintergrundrauschen weitgehend vermieden wird, um einen ausreichenden Kontrast zwischen den Spots und der Nitrozellulosemembran zu erreichen. Mögliche Einflussfaktoren für verfärbte Membranen können unspezifische Bindungen des zweiten Antikörpers auf der Nitrozellulosemembran, Staubpartikel in den Lösungen [290], die Art der Durchführung der Waschschrte, die Zusammensetzung des Mediums [274] sowie die Dauer der Farbreaktion [62] sein. Soweit möglich wurden daher alle Lösungen vor Verwendung mit Rotring-Filtern gefiltert, ein Blockierschritt wurde eingeführt und die Spot-Entwicklung während der Farbreaktion unter Sichtkontrolle überwacht.

Spots in den Leerwerten können auch von einer unspezifischen Stimulation, beispielsweise durch Kontaminationen oder einer Aktivierung der Zellen durch die Oberflächenstrukturen der Falcons, herrühren. In einer Vorversuchsreihe wurde daher ermittelt, inwieweit die Zellen an den einzelnen Gefäßen adhären und so möglicherweise aktiviert werden. Es wurden Silikon-beschichtete 500-ml-Tubes, kleine Eppendorf-Behälter und Rotdeckel-Falcons untersucht. Dabei wurde keine nennenswerte Adhäsion der Zellen an die Kunststoff-Oberflächen beobachtet und so eine unspezifische Aktivierung durch die verwendeten Materialien weitgehend ausgeschlossen.

Durch die Optimierung der ELISpot-Methode (siehe Flussdiagramm 2.6.0.1 auf Seite 32) konnten Farbveränderungen der Nitrozellulosemembran vermieden, ein deutlicher Kontrast zwischen Spots und Membran sowie Leerwerte ohne Spots durchgehend erreicht werden, sodass die Auswertung über den ELISpot-Reader ohne Schwierigkeiten möglich war. Im Anhang finden sich zwei Beispielwells für je eine Messung von IFN- γ und IL-4 aus den letzten Versuchsreihen der endgültigen Stichprobe (siehe 7.11.1 auf Seite 138).

2.2.9 Blockierschritt

Zur Optimierung des Leerwerthintergrundes wurde ein Blockierschritt eingebaut. Durch den Blockierschritt werden Bereiche der Nitrozellulosemembran, die nicht durch den ersten Antikörper beschichtet wurden, mit Proteinpartikeln besetzt, um ein Binden des zweiten Antikörpers, und damit eine unspezifische Färbung, zu vermeiden. Hierzu wurden die Platten anfangs nach dem Abwaschen des ersten Antikörpers für eine Stunde mit reinem Medium und zum Vergleich mit PBS inkubiert. Nach einer Stunde wurde das Medium/PBS mit der 8-Kanal-Pipette abgesaugt und die Substanzen für die Stimulation vorgelegt. Die Verwendung eines Mediums zum Blockieren zeigte qualitativ leicht bessere Leerwerthintergründe [62]. Später war dieser Blockierschritt als ein Teil des Waschvorgangs mit RPMI-Medium nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper integriert.

2.2.10 Grundstimulation

Lymphozyten, die nicht bereits vorab aktiviert wurden, müssen mit einem Mitogen stimuliert werden, um Zytokine zu produzieren. Mitogene regen die Zellen zur Mitose an und bewirken somit eine Proliferation. Es stehen verschiedene Substanzen zur Auswahl, beispielsweise Phyto-Mitogene wie Phythämagglutinin

(PHA), Concanavalin A (ConA), Pokeweed-Mitogen (PWM) oder bakterielle Lipopolysaccharide (LPS). In dieser Arbeit wurde PHA verwendet und in Lösung II (siehe 7.4.1.6 auf Seite 129) gelöst. PHA stimuliert sowohl CD2 als auch CD3-Rezeptoren [82], es induziert die Blastogenese und Mitose von PBMC und wird bei einer Vielzahl von Studien an PBMC verwendet. Die optimale Konzentration wurde in Vorversuchen ermittelt, dabei wurden PHA-Konzentrationen von 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0,175 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 3,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 5,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ untersucht. Für IFN- γ waren Konzentrationen von 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und für IL-4 und IL-13 von 3,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ schließlich eine geeignete Konzentration, um eine gut auswertbare Anzahl an Spots zu erhalten.

2.2.11 Probenvorinkubation - Homogenisierung der Zellsuspension

Die Stimulation der Zellen kann auf den Platten oder bereits vor dem Auftragen in Falcons erfolgen. Das optimale Vorgehen wurde in Vorversuchen untersucht. Dabei wurden Vorinkubationen mit oder ohne FCS, mit und ohne PHA oder Neurotransmitter sowie verschiedene Inkubationszeiten und - bei längeren Inkubationszeiten - ein Waschgang nach der Vorinkubation mit Medium getestet. Die besten Ergebnisse in Bezug auf die Mehrfachwerte konnten mit einer Vorinkubation der Zellen in FCS-haltigem Medium ohne Stimulation im Falcon und ohne nachfolgenden Waschgang erzielt werden [3]. Eine Vorinkubation der Zellen mit PHA führte zu stärkeren Schwankungen der Mehrfachwerte, möglicherweise aufgrund einer Agglutination der Zellen durch PHA in den Falcons. Als Inkubationszeit wurde ein Zeitraum von etwa 3 h gewählt. Während dieser Zeit können sich die Zellen nach dem Waschen ausreichend mit neuen Nährstoffen aus dem Medium versorgen und sich homogen im Medium verteilen. Zur Vorinkubation wurden die 50-ml-Falcons in einem Winkel von 45° in Gestellen angeordnet, um eine geringere Sedimentation der Zellen auf den Böden der Falcons zu erreichen. Vor dem Auftragen auf die Platten wurden die Zellsuspensionen mit einer Transferpipette vorsichtig homogenisiert. Nach dem Auftragen wurden die Zell-Neurotransmitter-Mitogen-Lösungen in den Wells durch vorsichtiges Beklopfen der Platten nochmals vermischt [101].

2.2.12 Inkubation des Detektionsantikörpers

Der Detektionsantikörper oder 2. Antikörper (2. Ak) wurde in sterilem PBS in einer Konzentrationen von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gelöst. Nach dem Verschütteln auf dem Vortex wurden jeweils 100 μl der Lösung in ein Well gefüllt. Zu Beginn der Versuche wurden die Platten mit dem 2. Antikörper für 180 min bei Raumtemperatur (Mittelwert 24,6 °C (21,5 - 28,5 °C)) inkubiert, wie vom Hersteller empfohlen [3]. Später wurde eine Inkubation bei 4 °C über Nacht durchgeführt.

2.2.13 Waschschritte

Der erste Antikörper wurde zuletzt mit reinem RPMI-Medium unterhalb der Laminarflow abgewaschen. Zum Waschen wurde eine 8-Kanal-Pipette verwendet. Die Wells wurden jeweils mit 200 μl Medium befüllt. Um bei Arbeiten mit mehreren Platten möglichst einheitliche Zeiten zu erhalten, wurde zunächst jede Platte dreimal gewaschen und dann in einem zweiten Durchgang erneut drei Waschgänge durchgeführt. Zwischenzeitlich blieben die Platten mit Medium gefüllt, um ein Austrocknen der Nitrozellulosemembranen zu vermeiden. Hierdurch wurde auch automatisch der "Blockierschritt" eingebaut (siehe 2.2.9 auf der vorherigen Seite). Nach sechs Waschgängen wurden die Platten über einem Becherglas ausgeklopft und die Ränder mit Ethanol abgewischt. Alle weiteren Waschschritte wurden unter nicht-sterilen Bedingungen mit PBS durchgeführt. Die Platten wurden fünf Mal mit einer 8-Kanal-Pipette gewaschen und einmal mit der Laborspritzflasche ausgespritzt, um den Hintergrund beim Färbeschritt möglichst rein zu erhalten. Schließlich wurden die Platten auf Saugpapier ausgeklopft, um etwaige Rückstände aufnehmen zu können.

2.2.14 Färbung

Die Färbung der Spots wurde den Angaben des Herstellers zufolge mit Streptavidin-Alkalische Phosphatase (ALP) durchgeführt. Eine Modifikation der Methode war nicht erforderlich. Die gelieferte Enzym-Lösung wurde im Verhältnis 1:1000 verdünnt, es wurden jeweils 100 μl /Well aufgetragen und für 2 h bei Raumtemperatur, wie vom Hersteller empfohlen, inkubiert.

Bei der anschließenden Färbung wurde die im Anhang angegebene Herstellungsformel für das Verhältnis von Puffer und der beiden Farbreagenzien eingehalten (siehe 7.4.3.4 auf Seite 131). Lediglich die Volumina wurden den Plattenerfordernissen entsprechend angepasst. Für eine Millipore-Platte wurden also beispielsweise 10 ml Gesamt-Lösung hergestellt. Die Wells wurden erneut mit 100 μl Farb-Lösung gefüllt und die Platten für 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Länge der Inkubationszeit richtete sich dabei nach der Entwicklung sichtbarer Spots. Die Farbreaktion wurde durch Verwerfen der Lösung und anschließendes Waschen mit a.d. in sechs Waschgängen beendet. Die Platten wurden vor dem Auswerten über Nacht getrocknet.

2.2.15 Übersicht der Versuchsvariationen

Tabelle 2.2.15.1 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die durchgeführten Versuchsvariationen.

Tabelle 2.2.15.1: Versuchsvariationen

Methodenschritt	Variationen
Plattenaufteilung	a) Randwells ausgespart b) Gesamte Platte verwendet
Konzentration 1. Ak	a) 7,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ b) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ c) 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Antibiotika	a) Mit Antibiotika (Pen/Strep vs. Gentamicin) b) Ohne Antibiotika
Mediumwechsel	a) Mediumwechsel auf der Platte nach halber Zeit b) Kein Mediumwechsel
Inkubationszeiten Zellsuspensionen	a) 12 h b) 17 h c) 24 h d) 48 h
Suspensionszusammensetzung	a) Zellen vorgelegt b) Neurotransmitter/PHA vorgelegt c) Gemeinsame Vorinkubation
Well-Gesamtvolumen	a) 100 ml b) 200 ml
Zellkonzentration	a) 2×10^6 Zellen/ml b) 1×10^6 Zellen/ml c) $0,75 \times 10^6$ Zellen/ml
Leerwert hintergrund	a) Verschiedene Kunststoffbehälter b) PBS gefiltert vs. ungefiltert c) Waschschritte d) Mit/ohne Blockierschritt
Grundstimulation	a) Mit PHA b) Nur Neurotransmitter
Probenvorinkubation	a) Native Vorinkubation b) Vorinkubation mit PHA/Neurotransmitter c) Vorinkubation mit PHA/Neurotransmitter und Nachinkubation
Waschschritte	a) 1. Ak mit Medium oder PBS abwaschen b) 6 Waschschritte oder 5 Waschschritte und Abspritzen mit Flasche
Inkubationszeiten 2. Ak	a) 180 min bei Raumtemperatur b) Über Nacht bei 4 °C

2.3 Stimulation der Zellen mit Neurotransmittern

2.3.1 Abwiegen und Lagerung der Substanzen

Substanz P und Serotonin wurden mit einer selbst entwickelten Methode hochrein abgewogen und trocken aliquotiert. Die Hersteller empfehlen eine Lösung der Substanzen erst am Tag des Gebrauchs. Zum Abwiegen wurde eine Analysenwaage mit einem Fehler von $\pm 0,03$ mg im Gewichtsbereich von 0,1-1,0 mg verwendet. Vor dem Abwiegen wurden die Waage, Waagschale und die Arbeitsunterfläche der Waage mit Isopropanol und 70%igem Alkohol gereinigt. Die zur Lagerung verwendeten 2-ml-Glasfläschchen wurden bei 180 °C für 30 min ausgeheizt und mit Alufolie abgedeckt. Alle Gegenstände, die beim Abwiegen Verwendung fanden, wie Pinzette, Spatel, Aluschiffchen, Ersatzalufoliendeckel für die Gläschen und die Lochverschlusschraubdeckel der Gläschen, wurden für 30 min bei 121 °C und 3 bar autoklaviert. Die Waage wurde vor jeder neuen Verwendung austariert. Beim Abwiegen wurden die Aluschiffchen mit Substanz beladen und in die Gläschen überführt. Serotonin wurde bei 8 °C und Substanz P bei -20 °C gelagert. Die aliquotierten Substanzen wurden innerhalb von zwei Monaten verbraucht.

2.3.2 Lösen von Substanz P und Serotonin

Substanz P kann als Oligopeptid mit basischen Aminosäuren am besten in einer angesäuerten Lösung gelöst werden oder durch eine Protein-Lösung vor dem Zerfall geschützt werden [2]. Um die Stabilität zu bewahren kann Substanz P aber auch trocken aliquotiert aufbewahrt und erst am Verbrauchstag in Lösung gebracht werden. In den Vorversuchsreihen wurden verschiedene Lösemittel für Substanz P getestet und mittels kommerziell erhältlichen EIAs kontrolliert. Die Vorschrift des Assays wurde dabei genau eingehalten (siehe 7.5.1 auf Seite 132). Untersucht wurden reines RPMI-Medium, DMSO, eine essigsäure Lösung, PBS (eigene Herstellung oder steril aus der Apotheke geliefert) und NaCl (aus pyrogenfreien Infusions-Lösungen oder von der klinikeigenen Apotheke hergestellt und sterilisiert). Als das am besten geeignete Lösemittel erwies sich nach mehrfachen Voruntersuchungen eine auf 37 °C vorgewärmte, sterile 0,09%ige NaCl-Lösung. Um ein Ausflocken von Substanz P bei Raumtemperatur zu verhindern, wurde die Verdünnungsreihe in den Eppendorf-Behältern in einem Inkubator bei 37 °C unter der Laminarflow durchgeführt und Substanz P so in Lösung gehalten. Für das verwendete Lösungsmittel wurden die entsprechenden Versuchsreihen kontrolliert.

Serotonin lässt sich in RPMI-Medium lösen, sodass keine Kontrolle für das Lösungsmittel erforderlich war. Die Verdünnungsreihen wurden ebenfalls mittels kommerziellem EIA-Kit kontrolliert (Vorschrift siehe 7.5.2 auf Seite 132).

2.3.3 Verdünnungsreihen der Neurotransmitter

Substanz P wurde in Konzentrationen von 10^{-6} bis 10^{-12} mol/l und Serotonin in Konzentrationen von 10^{-3} bis 10^{-6} mol/l untersucht. Die Verdünnungsreihen wurden jeweils in kleinen Eppendorf-Behältern durchgeführt. Dabei wurden jeweils 900 μ l P/S-Medium vorgelegt, 100 μ l Lösung hinzugefügt und die Lösung auf dem Vortex verschüttelt. Für das Lösungsmittel von Substanz P wurde jeweils eine analoge Verdünnungsreihe angelegt und dieses im gleichen Konzentrationsbereich als Kontrolle verwendet. Die Berechnungen hierzu sind unter 7.4.1.10 und 7.4.1.11 auf Seite 130 aufgeführt. Für die Hauptfragestellung wurde eine Konzentration für Substanz P von 10^{-10} mol/l und für Serotonin von 10^{-5} mol/l sowie 10^{-4} mol/l untersucht.

2.3.4 Spezifität der Stimulationen

Um die Spezifität der Stimulation mit den Neurotransmittern über postulierte Rezeptoren zu untersuchen, wurden einige Messreihen mit spezifischen Rezeptorblockern bzw. -agonisten durchgeführt.

2.3.4.1 Serotonin bzw. 5-HT-Rezeptoren Zum Nachweis der Spezifität der Serotoninwirkung wurden Versuche mit 8-OH-DPAT, einem spezifischen 5-HT_{1A}-Agonisten sowie S-WAY 100135, einem spezifischen 5-HT_{1A}-Antagonisten durchgeführt. Dabei wurden die Zellsuspensionen zunächst mit verschiedenen Konzentrationen (10^{-3} mol/l bis 10^{-6} mol/l) des Antagonisten, welcher bei 37 °C in sterilem Wasser gelöst wurde, vorinkubiert und auf die Platten aufgetragen. Anschließend wurden die Zellen nur mit PHA, 5-HT oder 8-OH-DPAT inkubiert.

2.3.4.2 Substanz P bzw. Neurokinin-1-Rezeptor Eine spezifische Wirkung von Substanz P wurde mit dem NK-1-Rezeptoragonisten Sar-Met-Substanz P untersucht. Analog zu dem hochreinen Abwiegen von Substanz P wurde auch dieser NK-1 Agonist abgewogen und zunächst in essigsaurer Lösung, später in PBS gelöst. Es wurde eine Verdünnungsreihe bis 10^{-12} mol/l angelegt und die Zellen damit inkubiert.

2.4 Zellkulturarbeiten

Alle Arbeitsvorgänge zur Zellaufbereitung erfolgten unterhalb der Sterilarbeitsbank. Alle Gegenstände wurden vor Platzierung unter der Laminarflow mit 70%igem Alkohol abgesprüht, um eine weitgehende Keimfreiheit zu gewährleisten.

2.4.1 Ficoll-Separation von PBMC

Das Prinzip der Ficoll-Separation beruht auf der unterschiedlichen Größe und Dichte der Blutzellen und eines Separationsmediums (Ficoll oder Biocoll) und stellt eine modifizierte isopyknische Dichtegradientenzentrifugation dar. Die Methode wurde erstmals von Boyum beschrieben [30].

Das Probandenblut wurde mit vorgewärmter Lösung I (siehe 7.4.1.5 auf Seite 129) in einer Verdünnung von etwa 3:1 aufgefüllt. Die Blut-Medium-Mischung wurde anschließend in 50-ml-Falcons über 15 ml Ficoll-Lösung überschichtet. Die zweiphasigen Röhrchen wurden für 40 min bei 25 °C, 1600 U/min und 400 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befanden sich, aufgrund der unterschiedlichen Dichte der Blutbestandteile und des Separationsmediums, die Lymphozyten und Monozyten zwischen der Ficoll-Lösung und dem Medium. Der Lymphozytenring wurde mit einer Transferpipette abgesaugt und in einem neuen Falcon auf 50 ml mit 37 °C warmer Lösung II aufgefüllt. Anschließend erfolgte ein Waschschritt für 12 min bei 23 °C und 1400 U/min in der Zentrifuge. Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet am Boden der Falcons in frischer Lösung II mit einer Transferpipette resuspendiert. Die Zellsuspension konnte nun entweder für einen Versuch verwendet oder bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren werden.

2.4.2 Einfrieren von Zellen

Zur Aufbewahrung wurden die Zellen in Nunc-Kryotubes in Gefriermedium mit DMSO zur Membranstabilisierung in Volumina von 1,8 ml eingefroren. Üblicherweise werden Zellkonzentrationen zwischen 10^5 und 5×10^7 Zellen in einem Kryo-Röhrchen eingefroren, wobei Bailey et al. noch bei Konzentration von 2×10^8 /ml die Funktionalität in ELISpot Assays nachweisen konnten [18]. Die mittlere Zellzahl/Kryotube für die Vorversuche ist in Tabelle 2.4.2.1 und für die endgültige Gesamtstichprobe in Tabelle 7.12.2.1 auf Seite 143 wiedergegeben.

Tabelle 2.4.2.1: Deskriptive Statistik Zellzahl/Kryotube

	N	Min.	Max.	MW	SD
Probanden T1	46	2,370	22,060	9,382	4,373
Probanden T1	28	0,824	20,198	9,190	4,029
Buffy Coats	53	1,940	52,350	21,057	11,153

N: Fallzahl; Min.: Minimum; Max.: Maximum; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Zellzahlangaben in 10^6 Zellen/ml

Das Einfrieren erfolgte über eine Kühlkette. Die Zellen wurden für mindestens zwei Stunden bei -20 °C (Mittlere Dauer: 2 h 58 min; SD: 3 h 17 min; Min.: 1 h 50 min; Max.: 22 h) und anschließend über Nacht bei -80 °C eingefroren (Mittlere Dauer: 18 h 22 min; SD: 2 h 28 min; Min.: 15 h; Max.: 24 h 45 min), bevor sie in der Gasphase des Stickstofftanks bei -167 °C lagerten.

2.4.3 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen wurden die Kryotubes kurz im 37-°C-Wasserbad geschwenkt bis sich die gefrorenen Zellen von der Wand lösten. Anschließend wurde die Zellsuspension in 50-ml-Falcons überführt, in denen 37 °C warmes Medium vorgelegt wurde und dann für 12 min bei 23 °C und 1400 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Becherglas verworfen und das Pellet mit der benötigten Menge Medium mit einer Transferpipette resuspendiert. Beim Auftauen wurde auf eine schnelle Verarbeitung geachtet, damit das zytotoxische DMSO nicht allzu lange auf die Zellen einwirken konnte.

2.4.4 Zählen von Zellen

2.4.4.1 Zählen von Zellen mit dem Coulter-Counter Die Bestimmung der Zellkonzentration mit dem Coulter-Counter erfolgte in Portionen von 20 μ l Zellsuspension in 20 ml isotonischer Kochsalz-Lösung in speziellen Accuvetten. Vorversuche zur Bestimmung der Varianz von Mehrfachzählungen wurden durchgeführt, wobei sich zeigte, dass die Streuung der Daten um den Mittelwert eher größer wird, je häufiger gemessen wird. Bei der endgültigen Versuchsreihe wurde daher auf Mehrfachmessungen verzichtet. Nach dem Einstellen der Zellkonzentration für die Interleukine wurde nach Verdünnung auch die Zellkonzentration für die IFN- γ -Bestimmung kontrolliert. Die prozentuale Abweichung vom Sollwert wurde erfasst und zeigte sehr geringe Abweichungen (siehe Tabellen 7.12.1.3 auf Seite 141 und 7.12.2.1 auf Seite 143).

2.4.4.2 Zählen von Zellen mit der Neubauer-Kammer Die Vitalität der Zellen wurde durch eine Färbung mit Trypanblau beurteilt, bei der sich tote Zellen intensiv violett anfärben. Zur quantitativen Bestimmung der Zellen wurde die Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau-Lösung gemischt und 10 μ l der Lösung unterhalb der Neubauerkammer begutachtet. Die Zellen von vier großen Quadraten der Neubauerkammer wurden ausgezählt und die Anzahl geviertelt. Die Endkonzentration von Zellen/ml ergibt sich nach der Multiplikation der Anzahl mit 20.000. Die prozentualen Abweichungen beim Zählen mit der Neubauerkammer und dem Coulter-Counter wurden ebenso wie der Anteil toter Zellen erfasst (siehe Ergebnisteil Tabellen 7.12.1.3 auf Seite 141 und 7.12.2.1 auf Seite 143).

2.4.5 Nachweis und Klassifikation von Verunreinigungen

Um den Einfluss von möglichen Verunreinigungen auf die Güte der Ergebnisse erfassen zu können, wurden alle Zelllösungen auf Sterilität und Reinheit überprüft. Um diese Beobachtungen statistisch auswerten zu können, wurde eine Klassifikation des bildlichen Eindrucks unter der Neubauerkammer erstellt und als mögliche Kovariate bei der Auswertung berücksichtigt. Die Lösungen wurden nach ihrem Reinheitsgrad klassifiziert und danach ob die Zellen zu Zellclustern agglutiniert vorlagen. Mögliche Verunreinigungen, wie das Vorhandensein von Erythrozyten, Thrombozyten, Proteinschotter, Schmutzpartikeln oder mikrobiellen Kontaminationen wurden beurteilt. Tabelle 2.4.5.1 auf der nächsten Seite zeigt die verwendeten Parameter.

2.4.6 Zusammensetzung des Zellpellets

Um den prozentualen Anteil von Lymphozyten in der Zellsuspension der PBMCs erfassen zu können, wurde die Zytopsin-Mikroskopier-Methode angewandt.

Tabelle 2.4.5.1: Klassifikation des Zellaspekts unter der Neubauerzählkammer

Kategorie	Bedeutung
1	sehr rein, keine Zellen
2	recht rein
3	Schotter
4	sehr rein, Zellen sichtbar
5	Zellen + tote Zellen
6	recht rein + Cluster
7	verdächtige Strukturen
8	kontaminiert
9	sehr rein + Cluster

2.4.6.1 Zytopspin-Zentrifugation Das Verhältnis von Lymphozyten zu Monozyten wurde aus der Zellsuspension für die Messung von Interferon- γ bestimmt. 200 μ l Zellsuspension von beiden Zeitpunkten wurden entnommen und jeweils mit weiteren 400 μ l Lösung II verdünnt. 500 μ l dieser Zellsuspension wurden über die Trichter der Sample-Chambers aufgetragen. Die Metall-Ständer mit den Shandon-Cyto-Trägern wurden mit aufgesetzten Deckeln für 5 min bei 800 U/min zentrifugiert. Die Zellen setzten sich dabei in der Mitte der Objektträger ab, die schließlich über Nacht getrocknet wurden.

2.4.6.2 Färben der Objektträger Die Objektträger wurden mit einer Pappenheim-Färbung gefärbt. Das erste Bad erfolgte in 100 ml May-Grünwald-Lösung für 5 min. Nachdem die überschüssige Farbe in Wasser abgewaschen wurde, kamen die Objektträger für weitere 10 min in 100 ml Giemsa-Lösung. Die Objektträger wurden schließlich gründlich getrocknet.

2.4.6.3 Auswertung der Objektträger Nach dem Trocknen wurden die Objektträger mit Eukitt eingedeckt und unter einem 100er-Objektiv mit Dispersionsöl betrachtet. Von drei Probanden wurden zu beiden Zeitpunkten jeweils 5×100 Zellen ausgezählt. Von den übrigen Probanden wurden jeweils 2×100 Zellen ausgezählt und die Mittelwerte gebildet.

2.5 Genotypisierungen

2.5.1 DNA-Isolierung

Aus jeweils 10 ml EDTA-Blut wurde durch das Präparationsverfahren der Firma Qiagen (QIAamp Blood Kit) genomische DNA der Probanden isoliert. Diese Methodik basiert auf der Anlagerung von DNA an eine Silica-Gel-Matrix (Anionen Austausch), welche wiederum in Säulen gepackt ist und sich innerhalb eines optimierten Puffersystems für Zell- und Kernlysen befindet, wodurch die Eluierung der DNA aus dem Säulenmaterial erfolgen kann. Durch dieses Verfahren ist es möglich, auf toxische oder mutagene Substanzen wie Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol zu verzichten.

Zur Lyse wurden die Zellen aus den 10 ml EDTA-Blut mit 10 ml kaltem Puffer C1 und 30 ml kaltem Wasser 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 15 min bei 1300 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet mit 2 ml kaltem Puffer C1 und 6 ml Wasser resuspendiert. Dieses wurde nochmals bei 1300 g zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Um die Zellkerne zu lysieren und Proteine abzubauen wurde der Rückstand durch die Zugabe von 10 ml Puffer G2 und 200 μ l Protease-K-Lösung aufgelöst und anschließend 60 min bei 50 °C inkubiert.

Nach der Equilibrierung der Qiagen-Tips-500-Säulen mit 10 ml QBT-Puffer wurden die Zellkernlösungen auf das Säulenmaterial aufgetragen, zweimal mit je 15 ml Puffer QC gewaschen und zuletzt mit 15 ml Puffer QF eluiert.

2.5.2 IFN- γ , CA-Repeat, rs3138557

Die Bestimmung des Mikrosatelliten Markers (CA-Repeat) im Intron 1 des Gens für IFN- γ wurde mit einer Fluoreszenz basierenden Genotypisierungsmethode am ABI 310 Kapillarelektrophorese Gerät (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Das CA-Repeat wurde mittels PCR (PTC-200 Thermocycler, MJ Research, Watertown, MA, USA) und den nachfolgenden Oligonukleotiden amplifiziert: Vorwärtsprimer: 5'-6FAM-gCT gTC ATA ATA TTC AgA C - 3'; Rückwärtsprimer: 3' - CgA gCT TTA AAA gAT AgT TCC - 5'. Der PCR Ansatz bestand aus 50 ng DNA, 0,25 μ l (5 Units/ μ l) AmpliTaq Gold, 2,5 μ l 10 \times PCR-Puffer, 0,625 μ l jeden Primers (0,5 μ M) und 2,5 μ l Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) (2 mM) in einem Gesamtvolumen von 25 μ l. Folgende PCR-Bedingungen wurden verwendet: 1.) Denaturierung (95 °C) für 5 min; 2.) 30 Zyklen jeweils Denaturierung (95 °C) für eine Minute, Annealing (57 °C) für 45 Sekunden, Extension (72 °C) für 45 Sekunden; 3.) Finale Extension (72 °C) für 7 min. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit Wasser im Verhältnis 1:100 verdünnt, davon 1 μ l mit 11,5 μ l Formamid und 0,5 μ l Längenstandard (500 Rox) versetzt, 4 min bei 94 °C denaturiert und nach Abkühlung auf Eis auf dem ABI 310 Gerät unter Verwendung einer 41 cm Kapillare und POP4 Polymer aufgetrennt. Die Detektion der Allele (11 bis 17 Repeats; 123 bp bis 137 bp) und die Auswertung erfolgten mit Hilfe der Computer Programme Genscan Analysis Version 3.7 and Genotyper Version 3.7.

2.5.3 IL-4, C589T, rs2243250

Die Genotypisierung erfolgte mittels der FRET-Technik (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer) am Light Cycler PCR-System (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Der Nachweis des IL-4 C589T-Polymorphismus erfolgte nach folgenden Bedingungen: Vorwärtsprimer: 5'-ATC AAA CAT TGC ATT TCA GCC-3'; Rückwärtsprimer: 5'-GTT GTA ATG CAG TCC TCC TGG-3'; Donor Hybridisierungs-sonde: 5'-GGA GAA CAT TGT CCC CCA GTG CT-Fluorescein-3'; Akzeptor Hybridisierungs-sonde: 5'-LCRed640-GGT AGG AGA GTC TGC CZG TTA TTC TGC C-3'. Die PCR-Reaktion wurde mit 50 ng DNA, 2 μ l Reaktions-Mix, 0,2 μ M eines jeden Primers, 0,2 μ M der jeweiligen Hybridisierungs-sonde und 2 μ M MgCl₂ in einem Gesamtvolumen von 20 μ l nach Herstellerangaben durchgeführt. Die PCR-Bedingungen bestanden aus 40 Zyklen (95 °C/ 0 s; 58 °C/ 10 s; 72 °C/ 10 s, jeweils mit einer Aufheizrate von 20 °C/s). Danach wurde eine Schmelzkurve generiert, indem eine konstante Temperatur von 40 °C für 20 s gehalten wurde, an die sich ein langsames Erhitzen auf 95 °C (0,2 °C/s) anschloss. Durch Auftragen des Fluoreszenzsignals gegen die Temperatur wurden Schmelzkurven für die jeweiligen Proben erhalten. Dabei zeigten sich Signale bei 60 °C (T-Allel) und bei 66 °C (C-Allel).

2.5.4 IL-13, A4257G, Gln (Q) zu Arg (R), rs20541

Der A4257G Polymorphismus im IL-13-Gen wurde mit Hilfe der ABI-PRISM-Snapshot-Methode (Applied Biosystems, Foster City, USA) detektiert. Dabei handelt es sich um eine kommerzielle Mini-Sequenzierungsmethode, die auf der Verlängerung eines unmittelbar vor dem SNP gebundenen Primers mittels fluoreszenzmarkierter Dideoxynukleotiden beruht. Die Primerverlängerung kann letztendlich durch automatische Kapillarelektrophorese am ABI-PRISM-310-Sequenzierungsgerät detektiert werden. Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der Programme Genscan Analysis Version 3.7 und Genotyper Version 3.7 detektiert und ausgewertet. Die PCR wurde in 25 μ l Gesamtvolumen mit 50 ng DNA, 2,5 μ l 10 \times PCR-Puffer, 200 μ M dNTPs, 0,5 μ M Vorwärts- (5'-TTC TAC TCA CGT GCT GAC CT-3') und Rückwärtsprimer (5'-CTg TCT CTg CAA ATA ATg AT-3') sowie 0,5 Units Taq Polymerase (Ampli Taq Gold, Applied Biosystems, Foster City, USA) am PTC-200 Thermocycler (MJ Research, Watertown, MA, USA) durchgeführt. Die PCR-Bedingungen waren: Anfangs Denaturierung bei 95 °C für 10 min, anschließend 35 Zyklen bestehend aus 95 °C/ 30 s, 58 °C/ 30 s, 72 °C/ 1 min und abschließend 72 °C für 10 min. Um nicht verbrauchte dNTPs und Primer zu entfernen, wurde zum PCR-Ansatz anschließend 2 μ l SAP (1 Unit/ μ l) (USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA), 0,1 μ l EXO I (20 Units/ μ l) (USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA), und 5,9 μ l deionisiertes Wasser gegeben, 60 min bei 37 °C inkubiert

und die Reaktion durch 15-minütige Inkubation bei 72 °C gestoppt. Die Multiplex Snapshot-Reaktion wurde im 10 µl Gesamtvolumen mit 1 µl Ready Reaction Mix, 0,2 µM Snapshot Primer (5'-GAA ACT TTT TCG CGA GGG AC-3') und 2 µl des inkubierten PCR-Ansatzes unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 25 Zyklen bestehend aus 96 °C/ 10 s, 50 °C/ 5 s, 60 °C/ 30 s. Die abschließende Entfernung nicht verbrauchter ddNTPs erfolgte wiederum durch enzymatischen Abbau. Dabei wurden 0,5 Units SAP zum Multiplex Snapshot-Ansatz gegeben und nochmals 60 min bei 37 °C und 15 min bei 72 °C inkubiert. Zu 0,5 µl dieses Ansatzes wurden 9,75 µl Formamid und 0,25 µl GS120 Längenstandard gegeben und die Produkte der Primer-Extensionsreaktion in einer 41-cm-Kapillare (POP 4-Gel) am ABI-PRISM-310-Kapillarelektrophoresegerät aufgetrennt.

2.6 Zusammenfassung der Methodik

In Abb. 2.6.0.1 auf der nächsten Seite ist ein Flussdiagramm dargestellt, welches den Ablauf der ELISpot-Durchführung zusammenfassend dokumentiert. Zuletzt wurden jeweils vier Platten parallel verarbeitet, dabei zwei Platten für Interleukin 13, um zwei verschiedene Inkubationszeiten zu vergleichen.

2.7 Datenauswertung mit dem ELISpot-Reader

Vor jeder quantitativen Auswertung wurden die Well-Abstände für jede Platte neu individuell konfiguriert. Zur exakten Erfassung der Spots und Abgrenzung vom Well-Hintergrund wurden die in Tabelle 2.7.0.1 aufgeführten Parameter und die Farbeinstellungen des Grabber des Mikroskops jeweils so verändert, dass möglichst viele Spots automatisch durch die Software erfasst wurden. Als Grabber-Farbeinstellungen wurden folgende Grenzen bei den Grundfarben verwendet: Rot: min. 0,177, max. 0,365, Grün: min. 0,491, max. 0,789 und Blau: min. 0,307, max. 0,808. Die Lichtstärke des Mikroskops wurde während der Messungen auf 3200 Kelvin konstant gehalten.

Tabelle 2.7.0.1: KS-ELISpot Parameter

Parameter	Letzte Einstellung	Modifikationen
Durchmesser	20 – 300	20 (70) – (111) 300
Hue*	55,0 – 75,0	58,7 (54,0) – 75,0 (85,0)
Sättigung	9,6 – 97,0	9,6 (9,0) – 97,0 (81,0; 93,0)
Kontrast	4,5 – 100,0	4,0 (5,0) – 100,0
Form (Shape)	20,0 – 97,0	(15,0) 20,0 – 97,0 (98,0)
Randsteigung	15,6 – 100,0	15,6 (15,0) – 100,0

**Hue" gibt einen Farbbereich an

Bei der Auswertung wurden sowohl die Anzahl der Spots als auch die eingenommene Fläche, d.h. die Summe aller Spots in Quadratmikrometer erfasst. Beides zu bestimmen ist sinnvoll, da große Spots die gleiche Fläche einnehmen können wie mehrere kleine Spots. Hierzu beschreiben ElGhazali et al. in ihrer Arbeit, dass zum Teil erhebliche Unterschiede in der Größe der einzelnen Spots festgestellt wurden [79].

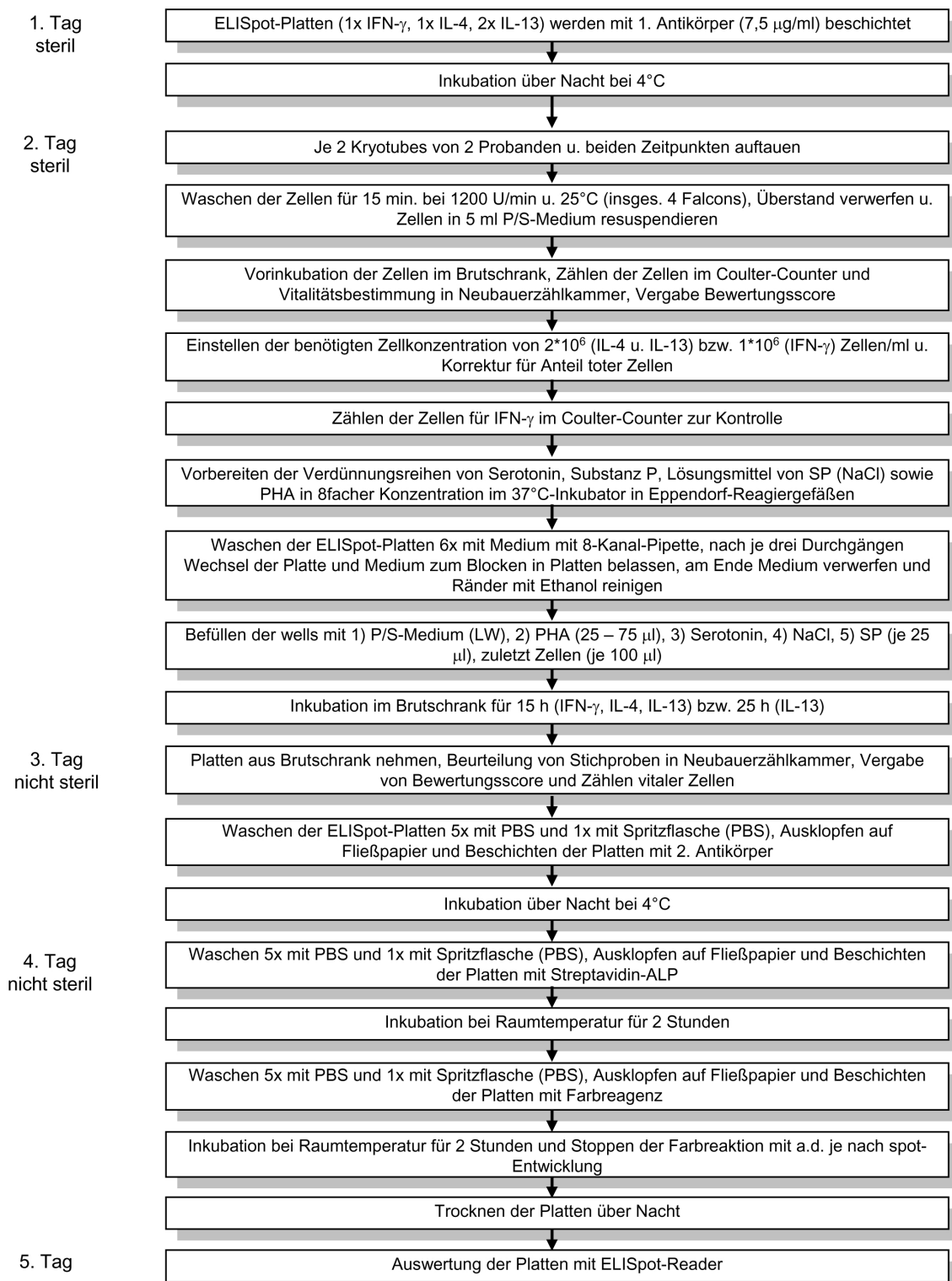
2.8 Datenanalyse

Die Datenanalyse erfolgte nach eingehender und kontinuierlicher statistischer Beratung durch Diplomstatistiker.

2.8.1 Stichprobengrößen

Die Vorversuche umfassen Experimente mit Zellen aus Buffy Coats oder Zellen von wenigen Kontrollpersonen zur Etablierung der grundlegenden methodischen Schritte. Die Endversuchsreihe wurde mit Zellen aus dem Probandenkollektiv durchgeführt. Innerhalb dieser Stichprobe wurde zunächst untersucht, ob

Abbildung 2.6.0.1: Flussdiagramm des ELISpot-Ablaufs



methodische Faktoren einen Einfluss auf die Varianz der Werte ausüben. Insofern es möglich war, diese Störfaktoren auszuschließen, wurde die Stichprobe entsprechend verkleinert, um die primäre Fragestellung der Arbeit zu beantworten. Die deskriptiven Ergebnisse sind für die Gesamt- und endgültige Stichprobe beschrieben.

2.8.2 Verwendete Testverfahren

Die Daten der ELISpot-Zählungen wurden in Excel-Tabellen und SPSS übertragen. Die statistischen Berechnungen wurden überwiegend mit SPSS durchgeführt.

Die Ergebnisse der Vorversuchsreihen wurden deskriptiv und graphisch dargestellt. Unterschiede bei den Zähldurchgängen mit dem Coulter-Counter wurden mit einem T-Test für verbundene Stichproben berechnet. Die Stichproben wurden deskriptiv beschrieben, dabei in der Regel die Fallzahl, Mittelwerte, Standardabweichungen, Minimum und Maximum sowie die prozentuale Verteilung, falls sinnvoll, angegeben. Mögliche Unterschiede in den deskriptiven Daten zwischen den beiden Blutentnahmezeitpunkten wurden mittels Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben berechnet.

Um mögliche Einflussfaktoren auf die Ergebnisse zu bestimmen, wurde ein allgemeines lineares Modell verwendet. Als abhängige Variable wurde die jeweilige Versuchsbedingung (Parameter) gewählt. Tabelle 2.8.2.1 listet die verschiedenen Bedingungen auf.

Tabelle 2.8.2.1: Versuchsbedingungen

Parameter	Beschreibung
LW	Leerwert, Zellen in reinem Medium
PHA	Basiswert, Zellen + PHA
SER_5	Zellen + PHA + Serotonin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l
SER_4	Zellen + PHA + Serotonin in einer Konzentration von 10^{-4} mol/l
SP	Zellen + PHA + Substanz P in einer Konzentration von 10^{-10} mol/l
NaCl	Zellen + PHA + Substanz P-Trägersubstanz NaCl in identischer Verdünnungsreihe („ 10^{-10} mol/l ^e “)
SER_SP	Zellen + PHA + Serotonin (10^{-5} mol/l) + Substanz P (10^{-10} mol/l)
SER_NaCl	Zellen + PHA + Serotonin (10^{-5} mol/l) + Substanz P-Trägersubstanz („ 10^{-10} mol/l ^e “)

Als feste Faktoren wurden der Zeitpunkt der Blutentnahme und die Position des jeweiligen Wells verwendet. Als Kovariaten dienten die Hinzunahme von Antibiotika, das Vorliegen einer möglichen Kontamination, der qualitative Aspekt der Zellsuspension unter der Neubauerkammer sowie der prozentuale Anteil toter Zellen. Ein Test auf Homogenität der Varianzen (Levene-Test) wurde durchgeführt und das partielle Etaquadrat zur Schätzung der jeweiligen Effektstärke berechnet. Das Modell wurde auf alle drei untersuchten Zytokine angewandt sowie auf die Auswertungen der Spot-Zahlen und der Flächenwerte. Die Korrelation der Werte zwischen den einzelnen Blutentnahmen wurde nach Spearman berechnet und mittels Streudiagrammen dargestellt. Der Einfluss durch Benutzung von Antibiotika wurde graphisch mit Histogrammen dargestellt, der Einfluss durch den qualitativen Aspekt der Zellsuspension durch Liniendiagramme und der Einfluss des Well-Ortes durch Abbildung der geschätzten Randmittel der linearen Modelle.

Nach Auswahl der endgültigen Stichprobe zur Beantwortung der primären Fragestellung wurde der Datensatz auf Normalverteilung durch P-P-Diagramme getestet. Mögliche Unterschiede zwischen den einzelnen Parametern in Bezug auf die Zytokin-Produktion wurden mit dem nicht-parametrischen Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben berechnet. Die Ergebnisse wurden nach Bonferroni korrigiert und das Signifikanzniveau entsprechend erniedrigt. Die Daten wurden graphisch mit Liniendiagrammen für alle Probanden und für die Mittelwerte dargestellt.

Mögliche interindividuelle Unterschiede wurden in Bezug auf Alter, Geschlecht, Nikotinkonsum und genetische Polymorphismen hin untersucht. Dabei wurden sowohl die einzelnen Bedingungen als insbesondere auch die neu gebildete Variable “Zytokin-Produktionsniveau”, welche aus den Mittelwerten der Bedingungen “PHA”, “SER_5”, “SP”, “NaCl”, “SER_SP” und “SER_NaCl” gebildet wird, untersucht. Die jeweiligen Gruppen (Alter: Mediansplit, Geschlecht, Raucherstatus, Wildtyp vs. Polymorphismus) wurden mit einem Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben miteinander verglichen. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ als statistisch signifikant festgelegt. Die Daten wurden graphisch mit Box-Plots oder Liniendiagrammen für die Mittelwerte dargestellt. Mögliche Interaktionen zwischen den

soziodemographischen und genetischen Einflussfaktoren wurden in einem allgemeinen linearen Modell berechnet und die Ergebnisse graphisch durch die geschätzten Randmittel abgebildet.

Das Verhältnis der Produktion von Th2- und Th1-Zytokinen wurde aus den jeweiligen Mittelwerten berechnet und für vier Bedingungen graphisch durch Box-Plots dargestellt. Mögliche Unterschiede zwischen den Parametern wurden mit dem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben berechnet.

Die Verteilung der Genotypen und Allel-Frequenzen wurden auf ihre Übereinstimmung mit der Hardy-Weinberg-Verteilung getestet mit dem Programm hwsim (<http://krunch.med.yale.edu/hwsim>) und mit den Daten der SNP-Datenbank des NIH (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) sowie Studien mit repräsentativen Stichproben verglichen. Ein Chi-Quadrat-Test wurde verwendet.

3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in sechs Abschnitte. Im ersten Abschnitt finden sich die Ergebnisse von Vorversuchsreihen, bei denen noch nicht mit der endgültigen Methodik gearbeitet wurde und die zur Bestimmung der verwendeten Konzentrationsbereiche von PHA, Serotonin und Substanz P erforderlich waren (siehe 3.1). Im zweiten Abschnitt wird die Gesamtstichprobe aller zur Verfügung stehenden Probandendaten beschrieben (siehe 3.2 auf der nächsten Seite). Im folgenden dritten Abschnitt werden verschiedene Einflussfaktoren ermittelt, die auf die Güte und Varianz der Ergebnisse Einfluss nehmen. Schrittweise wird dabei festgelegt, mit welcher endgültigen Stichprobe die Hauptfragestellung beantwortet wird (siehe 3.3 auf Seite 38). Im vierten Abschnitt finden sich die Ergebnisse zur primären Fragestellung der Arbeit (siehe 3.4 auf Seite 51) und im fünften Abschnitt werden weitere Einflussfaktoren näher dargestellt, die interindividuelle Unterschiede möglicherweise erklären können (siehe 3.5 auf Seite 64). Im letzten Abschnitt schließlich wird das Verhältnis von Th2/Th1-Zytokinen dargestellt.

Zum einfacheren Lesen finden sich längere Tabellen der deskriptiven Statistik im Tabellenanhang (siehe 7.12 auf Seite 139).

3.1 Ergebnisse der Vorversuchsreihen

3.1.1 Einfluss der PHA-Konzentration

Bei den Vorversuchsreihen zeigte sich, dass PHA einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Spot-Zahlen aufweist. Dies war bei allen drei Zytokinen der Fall, wobei generell geringere PHA-Konzentrationen ausreichend waren, um eine hohe IFN- γ -Produktion zu erhalten und für die beiden Interleukine höhere PHA-Konzentrationen erforderlich waren. In den Abb. 7.11.1.3 und 7.11.1.4 auf Seite 138 im Bildanhang ist die PHA-Konzentrationsabhängigkeit optisch in den Platten gut erkennbar. Ohne eine Stimulation mit PHA ließ sich praktisch keine Zytokin-Produktion anregen, weder durch Serotonin, Substanz P, deren Kombination oder NK-1-Agonisten (Graphiken nicht gezeigt).

3.1.2 Einfluss der Serotonin-Konzentration

Auch Serotonin zeigte in den Vorversuchen einen konzentrationsabhängigen Effekt (Graphiken nicht dargestellt). So hemmte Serotonin in einer Konzentration von 10^{-3} mol/l die Produktion von IL-4 und IL-13 nahezu vollständig und minderte die Produktion von IFN- γ wesentlich. Eine Konzentrationsabhängigkeit von Serotonin zeigte sich durchgehend ab einer Konzentration von 10^{-4} mol/l. Bei niedrigeren Serotonin-Konzentrationen war der Effekt je nach Zytokin unterschiedlich, insgesamt aber geringer ausgeprägt. Teilweise zeigte sich sogar ein verstärkender Einfluss, am deutlichsten für IL-13.

In den Abb. 7.11.1.3 und 7.11.1.4 auf Seite 138 im Bildanhang ist dieser Zusammenhang optisch in den Platten erkennbar.

3.1.3 Einfluss der Substanz P-Konzentration

Es wurden mehrere Versuchsreihen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Substanz P (10^{-6} mol/l bis 10^{-12} mol/l) durchgeführt, um einen möglichen Konzentrations-Wirkungszusammenhang von Substanz P zu untersuchen. Letztendlich konnte keine konzentrationsabhängige Wirkung von Substanz P festgestellt werden. Auch im Zusammenspiel mit Serotonin zeigte sich keine Dosis-Wirkungsbeziehung (Graphiken nicht dargestellt).

3.1.4 Spezifität der Stimulation

3.1.4.1 Serotonin Durch die Hinzugabe des 5-HT_{1A}-Rezeptoragonisten 8-OH-DPAT konnte der gleiche Effekt wie durch die alleinige Gabe von Serotonin erreicht werden. Insbesondere in höheren Konzentrationen zeigte sich die erhebliche Minderung der Spot-Produktion. In geringeren Konzentrationen zeigte

auch 8-OH-DPAT ähnlich wie Serotonin in Konzentrationen von 10^{-6} mol/l einen geringen stimulatorischen Effekt.

Die Wirkungen von Serotonin ließen sich durch den 5-HT_{1A}-Rezeptorantagonisten S-WAY 100135 in einer Konzentration von 10^{-4} mol/l weitgehend aufheben. In niedrigeren Konzentrationen ließen sich die Effekte nicht antagonisieren. Bei höheren Konzentrationen (10^{-3} mol/l) wurde die Zytokinproduktion interessanterweise auch durch S-WAY 100135 unterdrückt. Diese Zusammenhänge zeigten sich für alle drei Zytokine (Graphiken nicht dargestellt).

3.1.4.2 Substanz P Eine Stimulation mit dem selektiven NK-1-Rezeptoragonisten Sar-Met-SP resultierte nicht in einer konzentrationsabhängigen Veränderung der Mitogen-aktivierten Zytokin-Produktion. In Kombination mit Serotonin in geringerer Konzentration (10^{-5} mol/l) konnte jedoch ein schwacher kostimulatorischer Effekt auf die IL-4-Produktion festgestellt werden. Interessanterweise führte die Kombination des NK-1-Agonisten mit Serotonin in hohen Konzentrationen (10^{-3} mol/l) noch zu einer gewissen IFN- γ -Produktion, was durch die ledigliche Hinzugabe von SP nicht erreicht werden konnte. Für IL-13 ergaben sich ähnliche Effekte (Graphiken nicht abgebildet).

3.2 Deskriptive Statistik

3.2.1 Beschreibung der Gesamtstichprobe

3.2.1.1 Soziodemographische Charakteristika Im Folgenden wird die Gesamtstichprobe von allen Probanden beschrieben, die an der Studie teilgenommen haben. Hiervon ging jedoch nur ein bestimmter Anteil in die Endauswertung ein, wie im weiteren Verlauf ersichtlich wird. Insgesamt nahmen 73 Probanden an der Studie teil. Das durchschnittliche Alter der Probanden lag bei 31,75 Jahren (22 - 60 Jahre, SD: 9,3). Das Geschlechterverhältnis war weitgehend ausgewogen. Deren Blut wurde in 89 Versuchsreihen untersucht. Hierdurch werden die unterschiedlichen Fallzahlen für die einzelnen Variablen erklärbar. Dabei wurden 46 ELISpot-Gesamtdurchgänge vollzogen, bei denen zwischen einer und vier ELISpot-Platten parallel verarbeitet wurden. In Tabelle 7.12.1.1 auf Seite 139 im Tabellenanhang sind die Ergebnisse soziodemographischer Variablen zusammengefasst.

Die PBMCs von Probanden, die Medikamente einnahmen wurden überwiegend in den Vorversuchsreihen verwendet, um bei der endgültigen Stichprobe hierdurch möglichst keinen Störfaktor zu erhalten. Von 11 Probanden waren Blutentnahmen nur zu einem Zeitpunkt möglich, da diese nicht zu einer weiteren Entnahme bereit waren. Bei etwas mehr als der Hälfte der Versuchsdurchgänge (n=49) wurde mit Antibiotika gearbeitet. Eine sichere Kontamination wurde jedoch nur bei 9 Versuchen festgestellt.

In Tabelle 7.12.1.2 auf Seite 140 finden sich die Angaben zu Alkohol- und Nikotinkonsum sowie die wichtigsten Vitalparameter und klinischen Laborwerte. Von einigen Probanden wurden keine Werte erfasst. Der Wortschatztest gibt eine Grundeinschätzung der Intelligenz wider. Den Vitalparametern und Laborwerten kann man entnehmen, dass es sich grundsätzlich um eine weitgehend gesunde Population handelte.

3.2.1.2 Methodische Charakteristika Die Kategorien des Zellaspekts unter der Neubauerzählkammer sind in Tabelle 3.2.1.1 auf der nächsten Seite beschrieben (siehe auch 2.4.5 auf Seite 28).

Das Klassifikationssystem wurde erst ab einem bestimmten Zeitpunkt durchgehend verwendet, was die Erfassung von max. 85,4% der Fälle erklärt. Nach Inkubation der Zellen in den Platten wurden vor dem Waschen der Platten nochmals stichprobenartig einige Wells unter dem Mikroskop untersucht, um zu sehen, ob lebende Zellen sichtbar sind oder sich während der Versuche eine Kontamination entwickelt hat. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 3.2.1.2 auf der nächsten Seite wiedergegeben.

Eine sichere Kontamination zeigte sich in bis zu 4,5% der Versuchsreihen am Ende und eine mögliche Kontamination in bis zu 6,7% der Fälle.

Tabelle 3.2.1.1: Klassifikation der Zellsuspension unter der Neubauerzählkammer stratifiziert nach Abnahmezeitpunkt vor Beginn der Versuchsreihen (Gesamtstichprobe)

Variable	Kategorien	N	Prozent
T1 Zellaspekt	Sehr rein, keine Zellen	13	14,6
	Recht rein	37	41,6
	Schotter	21	23,6
	Sehr rein, Zellen sichtbar	0	0,0
	Verdächtige Strukturen	3	3,4
	kontaminiert	2	2,2
	Gesamt	76	85,4
T2 Zellaspekt	Sehr rein, keine Zellen	8	9,0
	Recht rein	28	31,5
	Schotter	31	34,8
	Sehr rein, Zellen sichtbar	1	1,1
	Verdächtige Strukturen	4	4,5
	kontaminiert	0	0,0
	Gesamt	72	80,9

Tabelle 3.2.1.2: Zellaspektklassifikation am Ende der Versuchsreihen, stratifiziert nach Zytokinen für Gesamtstichprobe

Zytokin	IFN- γ				IL-4				IL-13			
	T1		T2		T1		T2		T1		T2	
Kategorien	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Sehr rein, keine Zellen	5	5,6	6	6,7	0	0	2	2,2	2	2,2	1	1,1
Recht rein	8	9,0	12	13,5	9	10,1	4	4,5	9	10,1	10	11,2
Schotter	3	3,4	5	5,6	2	2,2	5	5,6	8	9,0	10	11,2
Sehr rein, Zellen sichtbar	16	18,0	13	14,6	9	10,1	8	9,0	3	3,4	2	2,2
Recht rein + Cluster	5	5,6	4	4,5	7	7,9	5	5,6	13	14,6	10	11,2
Verdächtige Strukturen	6	6,7	4	4,5	3	3,4	0	0	0	0	1	1,1
Kontaminiert	4	4,5	2	2,2	2	2,2	3	3,4	2	2,2	4	4,5
Sehr rein + Cluster	3	3,4	4	4,5	3	3,4	2	2,2	1	1,1	6	6,7
Gesamt	50	56,2	50	56,2	35	39,3	29	32,6	38	42,7	44	49,4

N: Fallzahl der untersuchten Proben (Gesamtstichprobe: 89 Versuchsreihen)

Die Ergebnisse für die Zählungen im Coulter-Counter und in der Neubauerkammer sind in Tabelle 7.12.1.3 auf Seite 141 jeweils für die beiden Zeitpunkte angegeben. Ein Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben zeigte keine Unterschiede zwischen den beiden Blutentnahmezeitpunkten. Die gezählte Zellzahl mit der Neubauerkammer betrug durchschnittlich 68,6% der gezählten Zellzahl mit dem Coulter-Counter. Der Anteil toter Zellen lag im Mittel bei 6,9% und wurde für das Einstellen der Zellkonzentration berücksichtigt. Die weitere Verdünnung der Zellsuspension für die Messungen von IFN- γ erreichten die angestrebten Werte sehr genau.

Die Ergebnisse der Zellzusammensetzung in den Suspensionen, ermittelt durch die Zytospin-Messungen, sind in Tabelle 3.2.1.3 auf der nächsten Seite dargestellt. Die Fallzahl ist gering, da diese Messungen erst am Ende der Versuchsreihen hinzugenommen wurden und entspricht in etwa der endgültigen Stichprobe (siehe 3.4.1 auf Seite 51).

Durch die Ficoll-Trennung scheinen also fast alle Granulozyten entfernt worden und nur ein Rest von etwa 1% zurückgeblieben zu sein. In den Proben fand sich neben der Lymphozytenfraktion aber mit etwa 7,5% ein nicht unerheblicher Anteil von Monozyten.

Die Zeiten der Versuchsabläufe sowie die jeweiligen Inkubationszeiten sind in Tabelle 7.12.1.4 auf Seite 142 dargestellt. Der Ablauf ist im Detail unter Punkt 2.6 auf Seite 31 zum besseren Verständnis abgehandelt.

Tabelle 3.2.1.3: Zytospin-Kategorisierungen

Variable	N	MW	Min.	Max.	SD	Wilcoxon Z	p-Werte
T1 Lymphozyten	40	92,15	78	99	4,58	Z = -0,412	p = 0,681
T2 Lymphozyten	41	91,83	78	98	4,22		
T1 Monozyten	40	7,43	1	21	4,51	Z = -0,292	p = 0,771
T2 Monozyten	41	7,51	1	22	4,09		
T1 Granulozyten	10	1,10	1	2	0,32	Z = -1,342	p = 0,180
T2 Granulozyten	20	1,35	1	3	0,67		

MW: Mittelwert; Min.: Minimum; Max.: Maximum; SD: Standardabweichung; Angaben für MW, Min., Max. und SD in Prozent.

3.3 Ermittlung von Einflussfaktoren

Um mögliche Einflussfaktoren auf die Ergebnisse zu bestimmen, wurde ein allgemeines lineares Modell in sequentieller Ausführung angewandt. Dabei wurden der Blutentnahmezeitpunkt, der Well-Ort und die Verwendung von Antibiotika in einem ersten Schritt als feste Faktoren im Modell verwendet. Als abhängige Variablen wurden nacheinander die Leerwerte der einzelnen Zytokine sowie die Werte bei alleiniger Stimulation mit PHA einbezogen. Für IL-13 wurde lediglich die Inkubationszeit von 15 Stunden wie bei den anderen beiden Zytokinen betrachtet, da die längere Inkubationszeit erst später eingeführt wurde und somit die Fallzahlen nicht vergleichbar sind. In die Analysen gingen die Versuchsergebnisse von allen Probanden ein. Der Hintergrund für diese Vorgehensweise war, dass als größtmöglicher Einflussfaktor auf die Varianz der Einzelwerte eine mögliche Kontamination der Proben in Frage kam. Da Kontaminationen sowohl bei Platten beobachtet wurden, bei denen ein Antibiotikum verwendet wurde, aber mehr noch bei Versuchen, bei denen kein Antibiotikum verwendet wurde, ging zunächst nur die Antibiotika-Verwendung als fester Faktor in das Modell ein.

Rein qualitativ war eine höhere Varianz der Einzelwerte bei den Wells zu beobachten, die am Rand der Platte lagen, daher wurde auch mit Triplets gearbeitet, um einen möglichen Effekt testen oder diesen ausschließen zu können. Ob ein solcher Effekt tatsächlich besteht, sollte ebenfalls durch das Modell getestet werden. Angenommen wurden auch mögliche intraindividuelle Schwankungen, sodass der Zeitpunkt der Blutentnahme ebenfalls in das Modell aufgenommen wurde.

Somit wurden in diesem ersten Testdurchgang methodische als auch individuelle Einflussfaktoren untersucht, um erste Anhaltspunkte zur Ermittlung der letztendlichen Stichprobe für die Berechnungen der primären Fragestellung zu erlangen.

3.3.1 Ergebnisse der allgemeinen linearen Modelle

Nachfolgend werden die Ergebnistabellen der allgemeinen linearen Modelle dargestellt und erklärt. Dies erfolgt im Detail für die Bedingung Leerwert und die Grundstimulation mit PHA. Für die anderen Bedingungen (siehe Tabelle 2.8.2.1 auf Seite 33) wurde das Modell ebenfalls gerechnet. Die Ergebnisse sind sehr ähnlich. Der Übersicht wegen, werden diese Ergebnisse jedoch nicht näher dargestellt, da sich durch diese keine anderen Schlussfolgerungen ergeben hatten.

3.3.1.1 Ergebnisse für die Bedingung "Leerwert" Tabelle 3.3.1.1 auf der nächsten Seite zeigt die Fallzahlen der berechneten Wells. Dabei muss die Anzahl unter Blutabnahme und Antibiotika durch drei (für jeweils drei Wells) und die Anzahl unter "Well" durch zwei geteilt werden (für jeweils zwei Blutentnahmen), um auf die Anzahl der Probanden zu kommen. Aufgrund unterschiedlich hoher Zellzahlen in den Kryotubes sind die Fallzahlen der verwendeten Wells etwas verschieden, da die Zellen zum Teil nicht für alle Wells gereicht hatten.

Tabelle 3.3.1.2 auf der nächsten Seite gibt die Mittelwerte, Standardabweichungen und Fallzahlen der Spots für die Leerwerte der jeweiligen Zytokine wieder. Diese sind nach dem Well-Ort, dem Blutentnahmezeitpunkt und der Verwendung von Antibiotika gemäß dem verwendeten Modell aufgeteilt.

Tabelle 3.3.1.1: Fallzahlen der Zwischensubjektfaktoren der allgemeinen linearen Modelle

			IFN- γ	IL-4	IL-13
		Wertelabel	N	N	N
Well	1	Randwell	151	143	130
	2	Mittelwell	163	161	162
	3	Innenwell	106	112	111
Blutabnahme	1	Zeitpunkt 1	218	217	209
	2	Zeitpunkt 2	202	199	194
Antibiotika	1	ja	249	247	234
	2	nein	171	169	169

Tabelle 3.3.1.2: Deskriptive Statistik für den Leerwert, stratifiziert nach Zytokinen

		IFN- γ			IL-4			IL-13			
Well	Blutabnahme	Antibiotika	MW	SD	N	MW	SD	N	MW	SD	N
Rand	T1	ja	4,41	12,90	41	0,97	1,84	38	1,55	5,31	31
		nein	22,03	32,34	38	14,29	42,27	34	17,21	25,43	34
		Gesamt	12,89	25,69	79	7,26	29,62	72	9,74	20,22	65
	T2	ja	6,21	25,20	39	0,71	1,27	38	0,47	0,67	32
		nein	16,91	21,25	33	3,76	6,85	33	18,24	29,11	33
		Gesamt	11,11	23,92	72	2,13	4,96	71	9,49	22,45	65
	Gesamt	ja	5,29	19,76	80	0,84	1,58	76	1,00	3,76	63
		nein	19,65	27,68	71	9,10	30,73	67	17,72	27,10	67
		Gesamt	12,04	24,79	151	4,71	21,39	143	9,62	21,28	130
Mitte	T1	ja	2,40	6,44	45	0,51	0,90	45	1,49	3,14	45
		nein	20,45	31,89	40	11,48	37,02	40	35,37	96,23	40
		Gesamt	10,89	24,00	85	5,67	25,83	85	17,44	67,78	85
	T2	ja	4,67	21,02	42	0,37	0,54	41	0,45	0,92	42
		nein	21,19	26,89	36	5,29	9,34	35	29,43	59,68	35
		Gesamt	12,29	25,15	78	2,63	6,77	76	13,62	42,48	77
	Gesamt	ja	3,49	15,27	87	0,44	0,75	86	0,99	2,39	87
		nein	20,80	29,43	76	8,59	27,78	75	32,60	80,78	75
		Gesamt	11,56	24,49	163	4,24	19,34	161	15,62	57,03	162
Innen	T1	ja	1,95	3,68	42	0,82	1,17	45	1,05	3,17	44
		nein	33,33	33,58	12	12,47	23,65	15	81,87	159,55	15
		Gesamt	8,93	20,44	54	3,73	12,63	60	21,59	86,09	59
	T2	ja	3,15	11,97	40	0,50	0,91	40	0,63	1,06	40
		nein	39,25	34,99	12	16,83	22,36	12	48,17	60,82	12
		Gesamt	11,48	24,69	52	4,27	12,52	52	11,60	34,75	52
	Gesamt	ja	2,54	8,73	82	0,67	1,06	85	0,85	2,40	84
		nein	36,29	33,67	24	14,41	22,75	27	66,89	124,76	27
		Gesamt	10,18	22,55	106	3,98	12,53	112	16,91	67,03	111
Gesamt	T1	ja	2,90	8,50	128	0,76	1,33	128	1,34	3,80	120
		nein	22,83	32,21	90	12,72	36,99	89	36,27	94,30	89
		Gesamt	11,13	23,76	218	5,66	24,36	217	16,22	63,80	209
	T2	ja	4,66	20,00	121	0,52	0,95	119	0,52	0,91	114
		nein	22,12	26,85	81	6,39	12,09	80	27,63	49,93	80
		Gesamt	11,66	24,48	202	2,88	8,19	199	11,70	34,64	194
	Gesamt	ja	3,76	15,21	249	0,64	1,17	247	0,94	2,82	234
		nein	22,50	29,71	171	9,72	28,20	169	32,18	76,48	169
		Gesamt	11,39	24,08	420	4,33	18,51	416	14,04	51,84	403

Man kann gut erkennen, dass die Leerwerte bei den Versuchen, bei denen mit Antibiotika gearbeitet wurde, kaum Spots beinhalten, während doch einige Spots bei den Versuchen ohne Antibiotika zu sehen sind. Am stärksten ist dieser Effekt bei IL-13 zu beobachten. Bezüglich des Well-Ortes und des

Blutentnahmezeitpunkts ergibt sich zunächst kein einheitliches Bild.

In diesem Modell muss man berücksichtigen, dass der Levene-Test auf Gleichheit der Fehlervarianzen für die Leerwerte signifikant ist und damit die Varianzen über die einzelnen Gruppen hinweg nicht gleich sind. Die Güte und Verallgemeinerung des verwendeten Modells sind daher prinzipiell leicht eingeschränkt (siehe Tabelle 3.3.1.3).

Tabelle 3.3.1.3: Levene-Test auf Gleichheit der Fehlervarianzen für Leerwert

Zytokin	F	df1	df2	Signifikanz
IFN- γ	11,901	11	408	,000
IL-4	8,847	11	404	,000
IL-13	19,300	11	391	,000

Ein p-Wert $> 0,05$ bedeutet, dass die Varianzen gleich sind und die Grundbedingung der Normalverteilung zur Anwendung des Modells nicht verletzt ist.

Dies wird ebenfalls in Histogrammen zur Prüfung der Normalverteilung der Werte für den Leerwert ersichtlich. Die Abb. 3.3.1.1 und 3.3.1.2 zeigen einen zweiten Gipfel bei etwa 75 Spots, sodass eine Normalverteilung nicht mehr gegeben erscheint. Die Werte wurden daher in zwei Gruppen aufteilt - mit oder ohne Antibiotika. Bei den Versuchen mit Antibiotika zeigte sich kein zweiter Gipfel mehr (Graphiken nicht dargestellt). In den Abb. 3.3.1.3 und 3.3.1.4 auf der nächsten Seite erkennt man die deutliche Rechtsverschiebung bei Versuchen ohne Antibiotika aufgrund der höheren Spot-Zahlen und die flachere Normalverteilungskurve (Abb. 3.3.1.3). Wenn man nur die Mittelwerte der Leerwerte für die Gesamtstichprobe verwendet, ergeben sich ähnliche Kurven (siehe Abb. 3.3.1.2, und 3.3.1.4 auf der nächsten Seite). Für die anderen Zytokine ergeben sich ganz ähnliche Kurven (Abbildungen nicht dargestellt).

Abbildung 3.3.1.1: IFN- γ : Histogramm über alle Wells

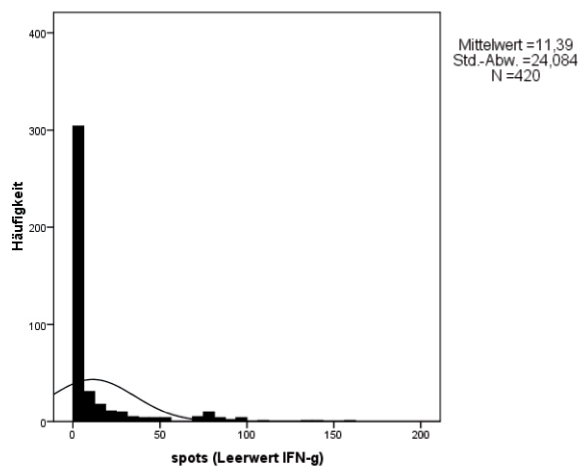
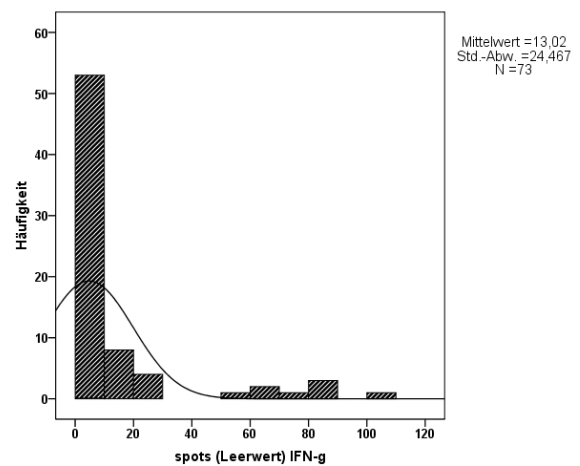


Abbildung 3.3.1.2: IFN- γ : Histogramm nur für Mittelwerte



Bereits aus diesen Ergebnissen und Darstellungen scheint es plausibel, nur die Versuche für die Endauswertung einzuschließen, bei denen mit Antibiotika gearbeitet wurde, um unspezifische Stimulationen auszuschließen. In den nachfolgenden Tabellen sind die Ergebnisse der Zwischensubjekteffekte und deren Einfluss auf das Modell wiedergegeben (siehe Tabellen 3.3.1.4 für IFN- γ , 3.3.1.5 für IL-4 und 3.3.1.6 auf Seite 42 für IL-13).

Die Tabellen 3.3.1.4 bis 3.3.1.6 zeigen für die Modelle insgesamt einen signifikanten Zusammenhang (korrigiertes Modell, Spalte Signifikanz). Das heißt, es gibt einen Gruppenunterschied zwischen den einzelnen Werten. Dabei zeigt sich, dass bei allen drei Zytokinen die Verwendung von Antibiotika einen signifikanten Einfluss hat. Das partielle Eta-Quadrat zeigt die Stärke des Einflusses auf die Varianz von 0-1. Die Werte zeigen einen nicht unerheblichen Einfluss auf das Gesamtmodell. Für IFN- γ und IL-13

Abbildung 3.3.1.3: IFN- γ : Histogramm über alle Wells ohne Antibiotika

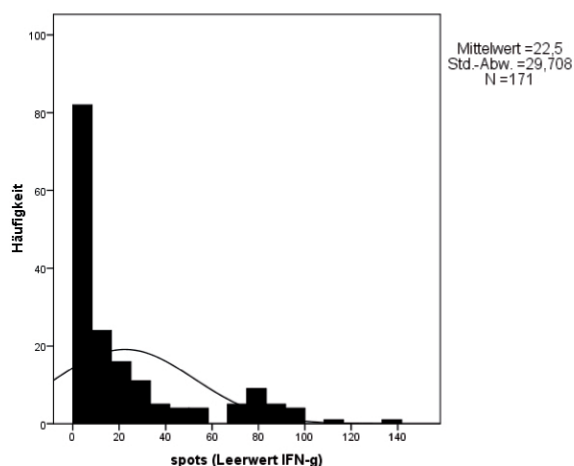


Abbildung 3.3.1.4: IFN- γ : Histogramm nur für Mittelwerte ohne Antibiotika

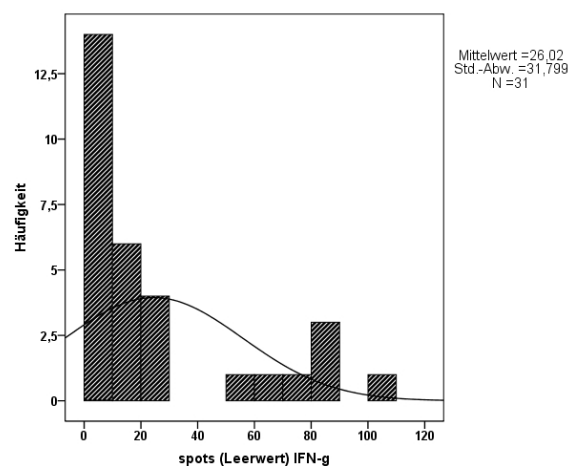


Tabelle 3.3.1.4: Tests der Zwischensubjekteffekte für IFN- γ (Leerwerte)

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz	Partielles Eta-Quadrat
Korrigiertes Modell	42 175,91 ^a	11	3834,17	7,79	0,000	0,174
Konstanter Term	73 548,28	1	73 548,28	149,40	0,000	0,268
Well	3062,96	2	1531,48	3,11	0,046	0,015
Blutabnahme	109,81	1	109,81	0,22	0,637	0,001
Antibiotika	40 380,21	1	40 380,21	82,03	0,000	0,167
Well*Antibiotika	5026,07	2	2513,03	5,11	0,006	0,024
Fehler	200 853,61	408	492,29			
Gesamt	297 476,00	420				
Korrigierte Gesamtvariation	243 029,51	419				

^aR-Quadrat = ,174 (korrigiertes R-Quadrat = ,151)

Tabelle 3.3.1.5: Tests der Zwischensubjekteffekte für IL-4 (Leerwerte)

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz	Partielles Eta-Quadrat
Korrigiertes Modell	11 696,46 ^a	11	1063,32	3,29	0,000	0,082
Konstanter Term	11 283,47	1	11 283,47	34,92	0,000	0,080
Well	595,86	2	297,93	0,92	0,399	0,005
Blutabnahme	418,16	1	418,16	1,29	0,256	0,003
Antibiotika	8852,99	1	8852,99	27,40	0,000	0,064
Fehler	130 533,76	404	323,10			
Gesamt	150 036,00	416				
Korrigierte Gesamtvariation	142 230,22	415				

^aR-Quadrat = ,082 (korrigiertes R-Quadrat = ,057)

scheint auch die Platzierung des Wells einen Einfluss zu haben und es scheint eine Wechselwirkung zwischen dem Well-Ort und der Antibiotikaverwendung zu geben (Well*Antibiotika). Beide Einflüsse sind allerdings eher schwach, was die niedrigen Werte für das partielle Eta-Quadrat zeigen. Der Zeitpunkt der Blutabnahme hat jedoch allem Anschein nach keinen Einfluss auf die Spot-Zahlen der Leerwerte.

3.3.1.2 Ergebnisse für die Bedingung “Grundstimulation mit PHA” Das gleiche allgemeine lineare Modell wie oben ausführlich beschrieben, wurde auch für die Grundstimulation mit PHA angewandt. Ausschnitte dieser Berechnungen werden, sofern sie für das weitere Vorgehen von Relevanz sind

Tabelle 3.3.1.6: Tests der Zwischensubjekteffekte für IL-13 (Leerwerte)

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz	Partielles Eta-Quadrat
Korrigiertes Modell	150 603,82 ^a	11	13 691,26	5,76	0,000	0,139
Konstanter Term	132 338,63	1	132 338,63	55,66	0,000	0,125
Well	27 941,93	2	13 970,97	5,88	0,003	0,029
Blutabnahme	4025,73	1	4025,73	1,69	0,194	0,004
Antibiotika	120 009,70	1	120 009,70	50,48	0,000	0,114
Well*Antibiotika	28 359,68	2	14 179,84	5,96	0,003	0,030
Fehler	929 589,55	391	2377,47			
Gesamt	1 159 630,00	403				
Korrigierte Gesamtvariation	1 080 193,37	402				

^aR-Quadrat = ,139 (korrigiertes R-Quadrat = ,115)

hier ebenfalls wiedergegeben. Der Levene-Test auf Gleichheit der Fehlervarianzen war in diesem Fall nur für IFN- γ nicht verletzt, was vermutlich auf die deutlich höheren Spot-Zahlen bei IFN- γ zurückzuführen ist (siehe Tabelle 3.3.1.7).

Tabelle 3.3.1.7: Levene-Test auf Gleichheit der Fehlervarianzen für Grundstimulation mit PHA

Zytokin	F	df1	df2	Signifikanz
IFN- γ	0,525	11	439	,887
IL-4	3,489	11	433	,000
IL-13	6,605	11	421	,000

Dies wird auch aus den Histogrammen ersichtlich (nicht abgebildet). Tabelle 3.3.1.8 auf der nächsten Seite zeigt die deskriptive Statistik für dieses Modell.

Die Werte der deskriptiven Statistik zeigen, dass bei den Wells, bei denen nicht mit Antibiotika gearbeitet wurde, deutlich höhere Spot-Werte enthalten sind. Außerdem zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Werten der beiden Blutentnahmezeitpunkten in jenen Wells, die am Rand gelegen sind. Inwieweit diese Unterschiede statistisch signifikant sind, ist aus den Tabellen 3.3.1.9 bis 3.3.1.11 auf Seite 44 ersichtlich.

Die Tests der Zwischensubjekteffekte zeigen nur noch bei IL-4 und IL-13 einen signifikanten Zusammenhang mit der Verwendung von Antibiotika (siehe Tabellen (3.3.1.5) und (3.3.1.6)). Daneben zeigt sich auch wieder eine Interaktion zwischen der Antibiotikaverwendung und dem Well-Ort für IL-13. Für den Blutabnahmezeitpunkt zeigen sich keine signifikanten Zusammenhänge im gerechneten Modell.

Das gleiche Modell wurde auch für die Flächenwerte der Spots angewandt und es zeigten sich hierbei ähnliche Ergebnisse, wobei diese teilweise noch stärker ausfielen. So zeigten sich z.B. für IL-13 bei den Platten ohne Antibiotikum bis zu dreifach erhöhte Flächenwerte im Vergleich zu den Platten mit Antibiotikum, sodass gefolgert werden kann, dass durch eine mögliche Kontamination nicht nur die Anzahl Spot-formierender Zellen erhöht ist, sondern diese auch mehr Zytokine produzieren. Die Ergebnisse werden nicht weiter detailliert dargestellt, da sie für das weitere Vorgehen keine weitere Informationen liefern.

Auf Grund dieser linearen Modelle werden in die Endauswertung nur Versuche einbezogen, bei denen Antibiotika verwendet wurden. In den folgenden Abschnitten wird geklärt, ob sich weitere methodische oder soziodemographische Einflussfaktoren auf die Varianz ermitteln lassen, inwieweit sich der mögliche Einfluss des Well-Ortes auch graphisch darstellen lässt und inwieweit die Werte zwischen den beiden Blutentnahmezeitpunkten miteinander korrelieren.

Tabelle 3.3.1.8: Deskriptive Statistik für Stimulation mit PHA

Well	Blutabnahme	Antibiotika	IFN- γ			IL-4			IL-13		
			MW	SD	N	MW	SD	N	MW	SD	N
Rand	T1	ja	641,38	361,88	45	228,69	226,41	39	48,45	63,06	33
		nein	654,56	358,27	39	301,77	205,79	22	78,09	99,29	22
		Gesamt	647,50	358,10	84	255,05	220,32	61	60,31	80,03	55
	T2	ja	737,49	329,49	41	337,55	200,17	40	83,06	104,40	35
		nein	669,46	294,45	35	355,43	245,41	21	85,86	93,15	21
		Gesamt	706,16	313,64	76	343,70	214,93	61	84,11	99,47	56
	Gesamt	ja	687,20	348,15	86	283,81	219,11	79	66,26	87,94	68
		nein	661,61	327,50	74	327,98	224,92	43	81,88	95,27	43
		Gesamt	675,36	337,94	160	299,38	221,26	122	72,32	90,75	111
Mitte	T1	ja	653,15	348,99	47	220,91	168,56	47	50,68	68,59	47
		nein	709,80	347,70	40	347,58	248,30	40	156,52	190,59	40
		Gesamt	679,20	347,53	87	279,15	217,23	87	99,34	147,66	87
	T2	ja	658,26	304,86	42	222,67	165,51	42	53,90	70,17	42
		nein	638,69	307,83	36	336,80	236,80	35	166,21	206,30	34
		Gesamt	649,23	304,40	78	274,55	207,69	77	104,14	156,77	76
	Gesamt	ja	655,56	327,06	89	221,74	166,18	89	52,20	68,96	89
		nein	676,12	329,19	76	342,55	241,43	75	160,97	196,65	74
		Gesamt	665,03	327,20	165	276,99	212,17	164	101,58	151,52	163
Innen	T1	ja	680,55	336,90	42	230,51	169,16	45	47,67	58,26	45
		nein	719,14	364,15	22	323,50	234,84	40	146,48	182,74	40
		Gesamt	693,81	344,11	64	274,27	206,82	85	94,16	140,51	85
	T2	ja	696,28	340,30	40	264,40	185,24	40	54,28	58,94	40
		nein	719,64	263,08	22	351,35	248,89	34	161,68	208,35	34
		Gesamt	704,56	313,04	62	304,35	219,63	74	103,62	156,15	74
	Gesamt	ja	688,22	336,56	82	246,46	176,67	85	50,78	58,33	85
		nein	719,39	313,94	44	336,30	240,13	74	153,46	193,71	74
		Gesamt	699,10	327,91	126	288,27	212,73	159	98,57	147,60	159
Gesamt	T1	ja	657,78	347,42	134	226,53	186,39	131	49,01	63,07	125
		nein	690,50	352,99	101	328,25	232,85	102	135,67	172,95	102
		Gesamt	671,85	349,45	235	271,06	213,61	233	87,95	131,97	227
	T2	ja	697,03	323,90	123	274,02	188,51	122	62,75	79,25	117
		nein	669,42	291,31	93	346,64	240,81	90	145,52	187,96	89
		Gesamt	685,14	309,89	216	304,85	214,79	212	98,51	142,86	206
	Gesamt	ja	676,57	336,29	257	249,43	188,55	253	55,65	71,53	242
		nein	680,40	324,23	194	336,87	236,17	192	140,26	179,69	191
		Gesamt	678,22	330,80	451	287,16	214,60	445	92,97	137,20	433

Tabelle 3.3.1.9: Tests der Zwischensubjekteffekte für IFN- γ (PHA)

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz	Partielles Eta-Quadrat
Korrigiertes Modell	459 852,86 ^a	11	41 804,81	0,38	0,965	0,009
Konstanter Term	$1,98 \times 10^8$	1	$1,99 \times 10^8$	1778,67	0,000	0,802
Well	104 849,47	2	52 424,74	0,47	0,624	0,002
Blutabnahme	11 081,54	1	11 081,54	0,10	0,752	0,000
Antibiotika	5770,27	1	5770,27	0,05	0,820	0,000
Fehler	$4,88 \times 10^7$	439	111 121,95			
Gesamt	$2,57 \times 10^8$	451				
Korrigierte Gesamtvariation	$4,92 \times 10^7$	450				

^aR-Quadrat = ,009 (korrigiertes R-Quadrat = -,015)

Tabelle 3.3.1.10: Tests der Zwischensubjekteffekte für IL-4 (PHA)

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz	Partielles Eta-Quadrat
Korrigiertes Modell	$1,31 \times 10^6$ ^a	11	118 973,53	2,69	0,002	0,064
Konstanter Term	$3,60 \times 10^7$	1	$3,60 \times 10^7$	815,45	0,000	0,653
Well	37 672,87	2	18 836,43	0,43	0,653	0,002
Blutabnahme	134 662,92	1	134 662,92	3,05	0,082	0,007
Antibiotika	761 123,06	1	761 123,06	17,22	0,000	0,038
Fehler	$1,91 \times 10^7$	433	44 198,86			
Gesamt	$5,71 \times 10^7$	445				
Korrigierte Gesamtvariation	$2,05 \times 10^7$	444				

^aR-Quadrat = ,064 (korrigiertes R-Quadrat = ,040)

Tabelle 3.3.1.11: Tests der Zwischensubjekteffekte für IL-13 (PHA)

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz	Partielles Eta-Quadrat
Korrigiertes Modell	994 104,45 ^a	11	90 373,13	5,33	0,000	0,122
Konstanter Term	3 634 851,30	1	3 634 851,30	214,39	0,000	0,337
Well	76 697,40	2	38 348,70	2,26	0,105	0,011
Blutabnahme	16 828,64	1	16 828,64	0,99	0,320	0,002
Antibiotika	590 966,53	1	590 966,53	34,86	0,000	0,076
Well*Antibiotika	160 577,83	2	80 288,91	4,74	0,009	0,022
Fehler	7 137 659,21	421	16 954,06			
Gesamt	$1,20 \times 10^7$	433				
Korrigierte Gesamtvariation	8 131 763,67	432				

^aR-Quadrat = ,122 (korrigiertes R-Quadrat = ,099)

3.3.2 Einfluss weiterer Faktoren

Da auch beim Arbeiten mit Antibiotika nicht auszuschließen ist, dass eine Kontamination der Proben erfolgt, wurden die Zellsuspensionen vor dem Auftragen auf die ELISpot-Platten unter der Neubauerzählkammer untersucht und, wie in Punkt 2.4.5 auf Seite 28 beschrieben, klassifiziert. Auch die Vitalität der Zellen kann einen möglichen Beitrag leisten zur Erklärung der Varianz. Mit der Neubauerzählkammer wurde der prozentuale Anteil der toten Zellen durch eine Trypan-Blau-Färbung ermittelt. In dem folgenden Schritt wurden nur die Versuche ausgewählt, bei denen mit Antibiotika gearbeitet wurde und dabei getestet, ob eine Kontamination noch auftritt, ob der prozentuale Anteil toter Zellen und das verwendete Klassifikationssystem unter der Neubauerzählkammer einen Einfluss auf die Varianz zeigen.

Des Weiteren wurde auch der Einfluss soziodemografischer Faktoren getestet, wie Alter, Geschlecht und die Einnahme von Medikamenten, da es in der Literatur Hinweise gibt, dass die Zytokinproduktion alters- und geschlechtsabhängig ist. Im folgenden linearen Modell wurden diese möglichen Einflussfaktoren als Kovariaten verwendet. Als feste Faktoren dienten nochmals der Well-Ort sowie der Blutabnahmezeitpunkt. Dieses Modell wurde für alle drei Zytokine und alle Parameter, bei denen der Well-Ort nach der Plattenaufteilung von Abb. 2.2.1.1 auf Seite 21 entscheidend sein könnte (LW, PHA, Ser 5, SP, NaCl sowie Ser 5_NaCl), angewandt. Das Modell wurde durchgehend für die Anzahl der Spots sowie für die LW- und PHA-Bedingungen der Flächenwerte getestet. Es werden nachfolgend nur die wichtigsten Ergebnisse präsentiert.

Der Tabelle 3.3.2.1 auf der nächsten Seite kann man unter der Spalte Levene-Test entnehmen, dass durch die Auswahl der Platten, bei denen mit Antibiotika gearbeitet wurde, eine bessere Annäherung an eine Normalverteilung gegeben ist und die Grundvoraussetzung für die Anwendung linearer Modelle nur noch für drei Bedingungen verletzt ist. Des Weiteren zeigen sich Alter und Geschlecht als Einflussfaktoren auf die Varianz der Werte für IL-4 und IL-13, nicht aber für IFN- γ . Hierauf wird unter Punkt 3.5.1 noch

Tabelle 3.3.2.1: Statistik des Gesamtmodells und der Einflussfaktoren Alter, Geschlecht und Medikation

		<i>p</i> (Levene-Test)	<i>p</i> (Gesamtmodell)	<i>p</i> (Medikamente)	<i>p</i> (Alter)	<i>p</i> (Geschlecht)
IFN- γ	LW	0.665	< 0.001	0.030	0.425	0.023
	PHA	0.969	0.227	0.114	0.115	0.259
	SER	0.989	0.071	0.325	0.151	0.180
	SP	0.960	0.135	0.144	0.152	0.260
	NaCl	0.997	0.326	0.420	0.365	0.443
	SER_NaCl	0.962	0.009	0.301	0.253	0.134
IL-4	LW	0.141	0.018	0.326	0.020	0.068
	PHA	0.658	< 0.001	0.035	< 0.001	< 0.001
	SER	0.443	< 0.001	0.466	< 0.001	< 0.001
	SP	0.015	< 0.001	0.819	< 0.001	0.009
	NaCl	0.982	< 0.001	0.931	< 0.001	0.003
	SER_NaCl	0.001	< 0.001	0.838	< 0.001	0.005
IL-13	LW	0.361	< 0.001	0.429	0.473	0.190
	PHA	0.053	< 0.001	0.142	0.001	0.001
	SER	0.885	< 0.001	0.875	0.024	< 0.001
	SP	0.394	< 0.001	0.032	0.012	0.002
	NaCl	0.773	< 0.001	0.768	0.004	0.001
	SER_NaCl	0.029	< 0.001	0.642	0.023	0.002

LW: Leerwert; PHA: Grundstimulation mit nur PHA; SER: Stimulation mit Serotonin ($c = 10^{-5}$ mol/l) + PHA; SP: Stimulation mit Substanz P ($c = 10^{-10}$ mol/l); NaCl: Lösemittel von Substanz P + PHA; SER_NaCl: Stimulation mit Serotonin ($c = 10^{-5}$ mol/l) + PHA + Lösemittel von SP

genauer eingegangen. Die eingenommenen Medikamente der Probanden scheinen keinen größeren Einfluss auszuüben.

Tabelle 3.3.2.2: Weitere methodische Einflussfaktoren

		<i>p</i> (T1 Nb ^a - Aspekt)	<i>p</i> (T1 % tote Zellen)	<i>p</i> (T2 Nb- Aspekt)	<i>p</i> (T2 % tote Zellen)	<i>p</i> (Well)	<i>p</i> (Zeitpunkt)	<i>p</i> (Well* Zeitpunkt)
IFN- γ	LW	< 0.001	0.015	0.681	0.552	0.575	0.343	0.974
	PHA	0.031	0.151	0.573	0.449	0.808	0.269	0.601
	SER	0.004	0.302	0.156	0.329	0.316	0.428	0.331
	SP	0.013	0.765	0.153	0.442	0.079	0.322	0.592
	NaCl	0.009	0.427	0.088	0.862	0.577	0.885	0.995
	SER_NaCl	0.012	0.853	0.068	0.390	< 0.001	0.801	0.922
IL-4	LW	0.907	0.049	0.024	0.502	0.082	0.137	0.759
	PHA	< 0.001	0.563	0.958	0.065	0.059	0.005	0.087
	SER	< 0.001	0.602	0.629	0.124	0.048	< 0.001	0.058
	SP	< 0.001	0.864	0.691	0.560	0.004	< 0.001	0.239
	NaCl	< 0.001	0.858	0.673	0.922	0.615	0.299	0.815
	SER_NaCl	< 0.001	0.565	0.595	0.070	< 0.001	0.035	0.601
IL-13	LW	< 0.001	0.033	0.565	< 0.001	0.953	0.008	0.720
	PHA	< 0.001	0.102	0.346	0.446	0.286	0.073	0.193
	SER	< 0.001	0.008	0.280	0.609	0.147	0.002	0.071
	SP	< 0.001	0.040	0.278	0.328	0.004	0.005	0.260
	NaCl	< 0.001	0.251	0.615	0.288	0.764	0.081	0.805
	SER_NaCl	< 0.001	0.045	0.390	0.180	< 0.001	0.100	0.363

Nb^a: Neubauerkammer-Aspekt, Klassifikation; LW: Leerwert; PHA: Grundstimulation mit nur PHA; SER: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA; SP: Stimulation mit Substanz P mit $c = 10^{-10}$ mol/l; NaCl: Lösemittel von Substanz P + PHA; SER_NaCl: Stimulation mit Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA + Lösemittel von SP

Aus Tabelle 3.3.2.2 geht wiederum hervor, dass der Aspekt der Neubauerzählkammer zu Zeitpunkt 1

einen erheblichen und durchgehenden Einfluss auf die Varianz aller drei Zytokine hat. Hingegen sind der prozentuale Anteil der toten Zellen oder die Beobachtungen zum Zeitpunkt 2 von untergeordneter Relevanz. Der Well-Ort zeigt sich doch bei einigen Parametern als wichtige Einflussgröße. Daneben zeigen sich intraindividuelle Schwankungen vor allem hinsichtlich der Interleukin-Produktion zu den beiden Blutabnahmezeitpunkten. Dabei hat der Well-Ort möglicherweise einen konfluierenden Einfluss, zumindest sind manche Well*Zeitpunkt-Interaktionen tendenziell signifikant.

Im Folgenden sind Liniendiagramme dargestellt, die den Einfluss der Qualität der Zellsuspension, klassifiziert unter der Neubauerzählkammer beispielhaft für zwei Bedingungen abbilden (siehe Abb. 3.3.2.1 bis 3.3.2.6 auf der nächsten Seite).

Abbildung 3.3.2.1: Zellaspekt Neubauerkammer für IFN- γ , Bedingung "LW"

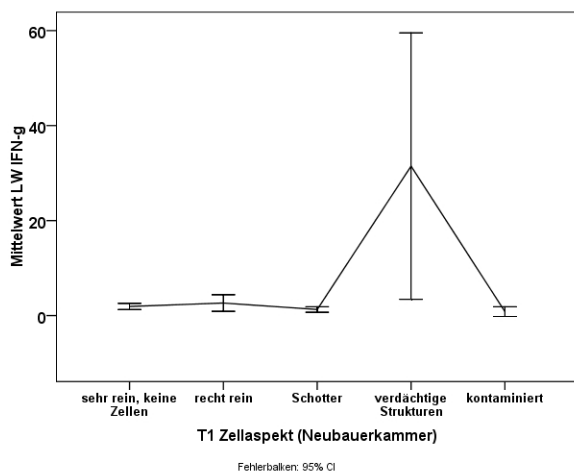


Abbildung 3.3.2.2: Zellaspekt Neubauerkammer für IFN- γ , Bedingung "SER_NaCl"

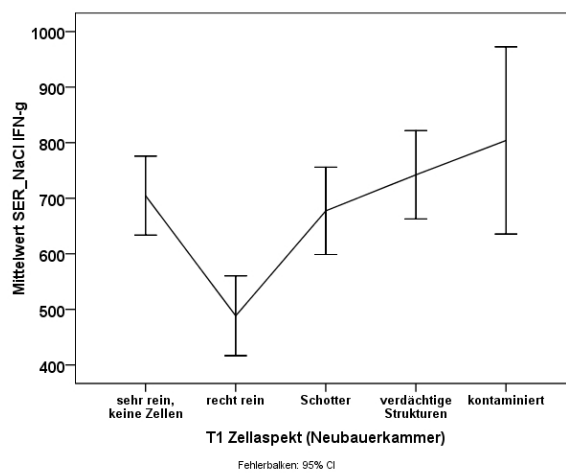


Abbildung 3.3.2.3: Zellaspekt Neubauerkammer für IL-4, Bedingung "LW"

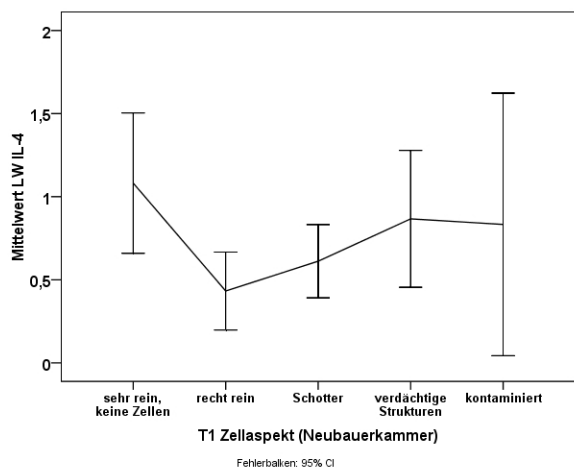
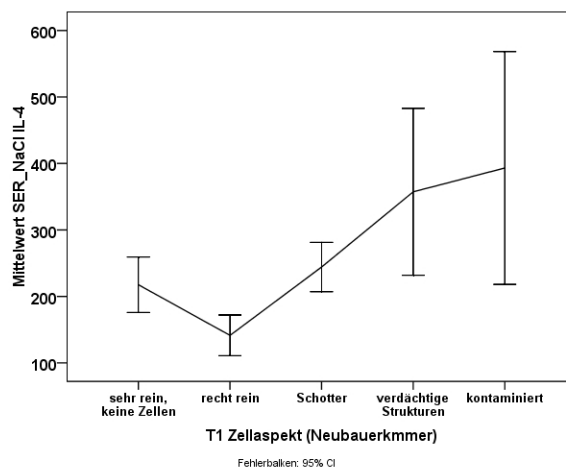


Abbildung 3.3.2.4: Zellaspekt Neubauerkammer für IL-4, Bedingung "SER_NaCl"



Diese Abbildungen zeigen relativ klar, dass die beiden Kategorien „verdächtige Strukturen“ und „kontaminiert“ eine deutlich größere Schwankungsbreite zeigen und die Mittelwerte auch höher liegen als bei den anderen Kategorien. Es ist daher zu vermuten, dass trotz einer Antibiotikaverwendung manche Zellsuspensionen möglicherweise eine Kontamination aufwiesen oder zumindest nicht ausreichend rein waren. Da dies zu Artefakten führen kann, wurden solche ELISpot-Platten, bei denen diese beiden Kategorien zu Zeitpunkt T1 zutrafen, für die Endauswertung ausgeschlossen.

Im nächsten Abschnitt wird der Einfluss der Randwells nochmals gesondert dargestellt.

Abbildung 3.3.2.5: Zellaspekt Neubauerkammer für IL-13, Bedingung "LW"

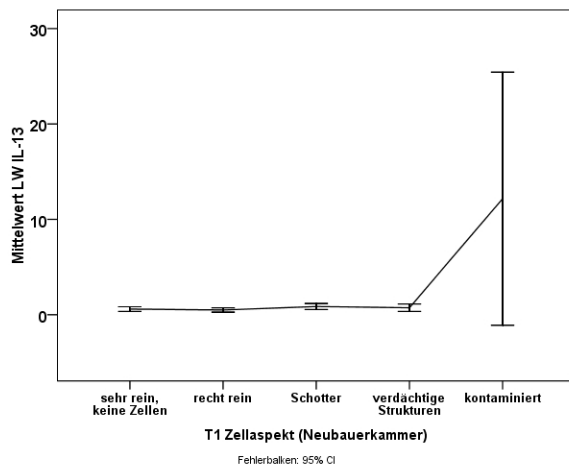
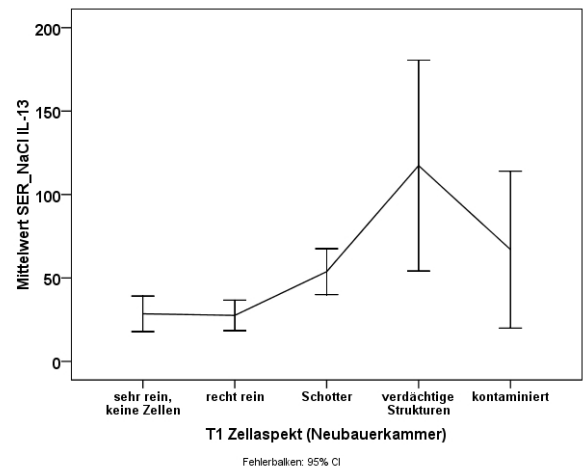


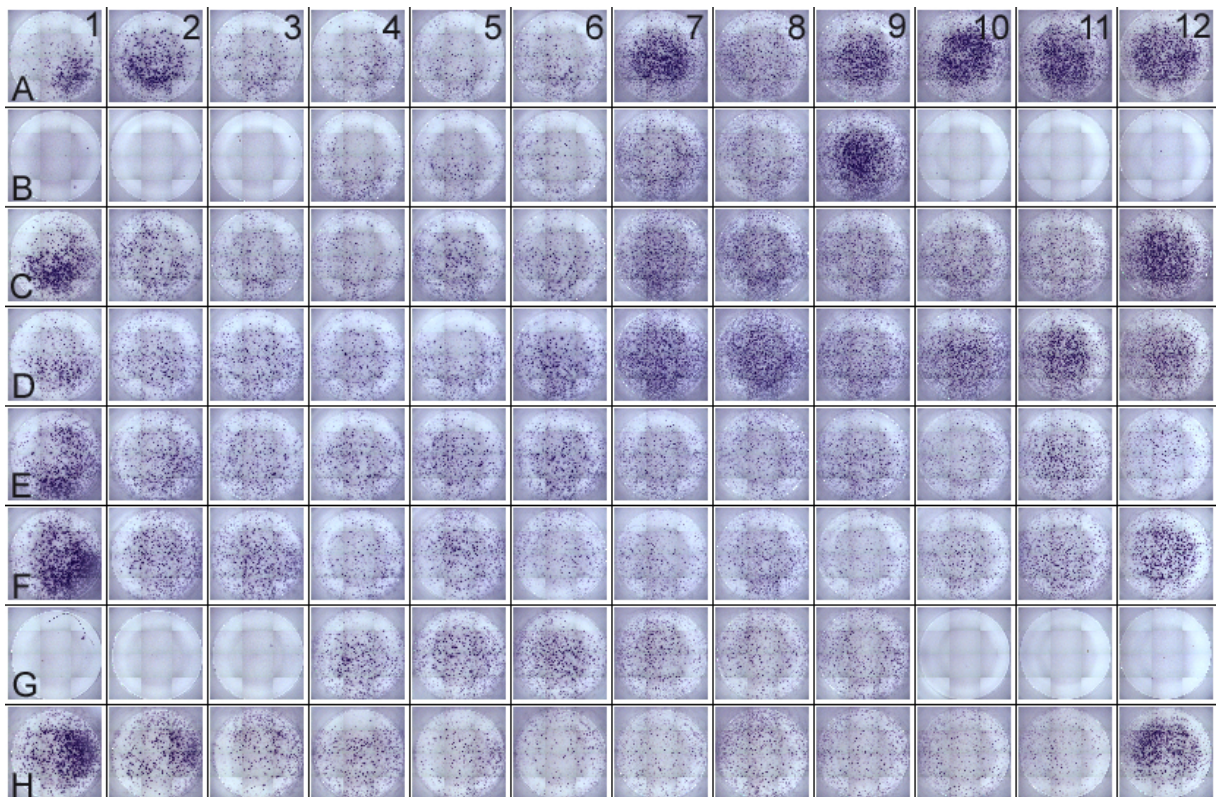
Abbildung 3.3.2.6: Zellaspekt Neubauerkammer für IL-13, Bedingung "SER_NaCl"



3.3.3 Einfluss der Randwells

Bereits optisch war qualitativ zu erkennen, dass die Spot-Zahlen an den Randwells die höchste Varianz aufwiesen. In Abb. 3.3.3.1 wird dies exemplarisch an einer Platte gezeigt. Die ersten beobachteten Randeffekte waren eine Verminderung der Spot-Zahl in den Wells am Rand. In weiteren Versuchen trat aber auch eine Erhöhung der Spot-Zahl am Rand auf, sodass allgemein nur von größeren Schwankungen gesprochen werden kann.

Abbildung 3.3.3.1: Beispiel-Platte mit Randeffekten



Man sieht, dass die Wells am Rand (vor allem Spalte 1 und 12) teilweise eine wesentlich höhere Spot-Zahl aufweisen, als alle anderen Wells und auch der Kontrast zur Nitrozellulosemembran etwas schlechter ist. Diese Unterschiede zeigten sich, wie oben angegeben, auch in den linearen Modellen, die für einige Bedingungen einen Einfluss des Well-Ortes zeigen konnten. Die Abbildungen 3.3.3.2 bis 3.3.3.5 zeigen

diese Unterschiede in den Spot-Zahlen beispielhaft.

Abbildung 3.3.3.2: Geschätztes Randmittel für IFN- γ , Bedingung “PHA”

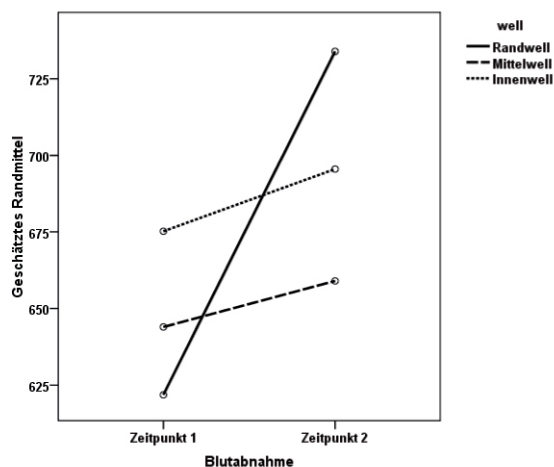


Abbildung 3.3.3.3: Geschätztes Randmittel für IFN- γ , Bedingung “SER_NaCl”

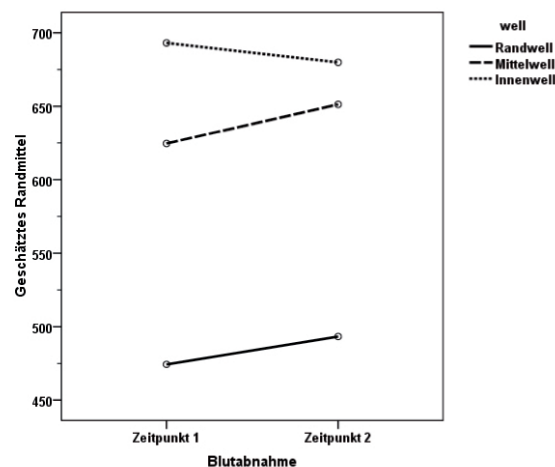


Abbildung 3.3.3.4: Geschätztes Randmittel für IL-4, Bedingung “PHA”

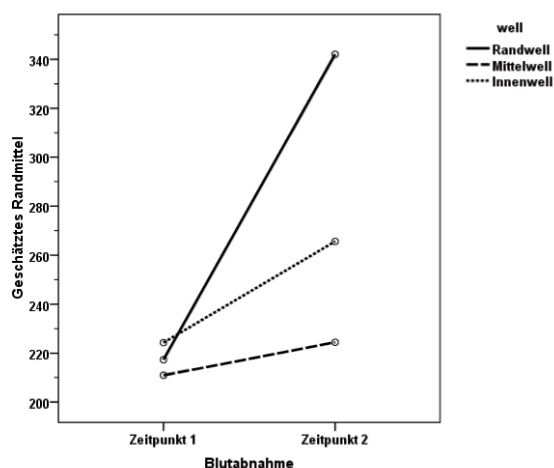
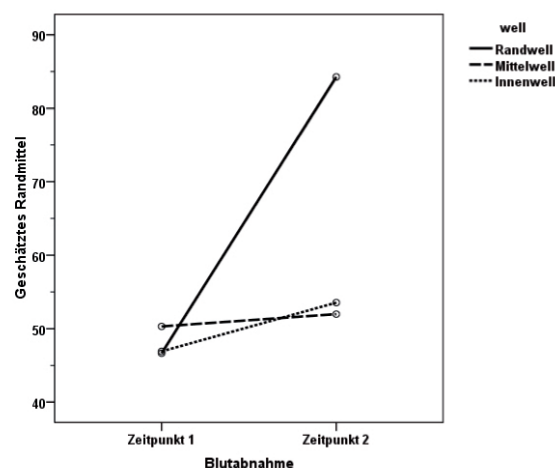


Abbildung 3.3.3.5: Geschätztes Randmittel für IL-13, Bedingung “PHA”



Die Graphiken der geschätzten Randmittel zeigen, dass sich die Werte für die beiden Zeitpunkte am Rand klar unterscheiden oder, dass ein anderes Spot-Niveau für die Wells am Rand als für die beiden anderen besteht. Für die anderen Bedingungen, die Flächenwerte und die Werte für IL-13 zeigten sich zumeist ähnliche Zusammenhänge (Graphiken nicht abgebildet).

Damit können intraindividuelle Schwankungen in Bezug auf den Blutabnahmezeitpunkt, wie er z.T. aus der deskriptiven Statistik der linearen Modell hervorgeht, möglicherweise auf die Lage des Well-Ortes zurückzuführen sein. Da es sich bei dem Well-Ort um einen methodischen Einflussfaktor handelt, den man ausschließen kann, wurden die Berechnungen zur Beantwortung der primären Fragestellung nur mit Mittelwerten aus den Mittel- und Innenwells durchgeführt. Für die Bedingung “SER_4”, bei der alle Wells am Rand liegen (siehe Abb. 2.2.1.1 auf Seite 21), wurde das Well an der Ecke ausgeschlossen, die Ergebnisse für diese Bedingung aber dennoch dargestellt, da keine andere Ersatzmöglichkeit vorhanden war.

3.3.4 Einfluss des Blutentnahmezeitpunkts

Um mögliche intraindividuelle Schwankungen ausschließen oder näher untersuchen zu können, wurde den Probanden der Studie an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten Blut entnommen. Wie bereits aus

den allgemeinen linearen Modellen oben ersichtlich, zeigte der Blutentnahmezeitpunkt für die Bedingungen “Leerwert” und “PHA” keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Varianz der Werte. Die Tabellen der deskriptiven Statistik legen aber vor allem bei den Interleukinen mögliche intraindividuelle Schwankungen nahe. Daher wurden von allen Bedingungen die Korrelationen zwischen den beiden Blutabnahmezeitpunkten berechnet und in Tabelle 3.3.4.1 dargestellt. Korreliert wurden die Mittelwerte der Wells unter Ausschluss der Randwells (Erklärung siehe 3.3.3 auf Seite 47). Ausgeschlossen wurden daneben alle Platten ohne Verwendung von Antibiotika und Platten, bei denen die Klassifikationen unter der Neubauerzählkammer “verdächtige Strukturen” oder “Kontamination” zutrafen (siehe Punkt 3.3.2 auf Seite 44).

Tabelle 3.3.4.1: Korrelationen zwischen Zeitpunkten T1 und T2

Zytokin	Bedingung	Spearman-Rho	<i>p</i> (Spearman)
IFN- γ N = 37-42	LW	0.357	0.030
	PHA	0.822	< 0.001
	SER_5	0.758	< 0.001
	SER_4	0.748	< 0.001
	SP	0.837	< 0.001
	NaCl	0.842	< 0.001
	SER_SP	0.810	< 0.001
	SER_NaCl	0.777	< 0.001
IL-4 N = 37-42	LW	0.265	0.113
	PHA	0.678	< 0.001
	SER_5	0.621	< 0.001
	SER_4	0.620	0.001
	SP	0.679	< 0.001
	NaCl	0.760	< 0.001
	SER_SP	0.652	< 0.001
	SER_NaCl	0.643	< 0.001
IL-13_15h N = 37-42	LW	0.216	0.199
	PHA	0.659	< 0.001
	SER_5	0.687	< 0.001
	SER_4	0.472	0.065
	SP	0.624	< 0.001
	NaCl	0.705	< 0.001
	SER_SP	0.576	< 0.001
	SER_NaCl	0.730	< 0.001
IL-13_25h N = 17-19	LW	0.438	0.069
	PHA	0.679	0.002
	SER_5	0.639	0.006
	SER_4	-0.800	0.200
	SP	0.444	0.074
	NaCl	0.715	0.001
	SER_SP	0.695	0.001
	SER_NaCl	0.592	0.012

LW: Leerwert; PHA: Grundstimulation mit nur PHA; SER: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA; SP: Stimulation mit Substanz P mit $c = 10^{-10}$ mol/l; NaCl: Lösemittel von Substanz P + PHA; SER_NaCl: Stimulation mit Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA + Lösemittel von SP

Nach Tabelle 3.3.4.1 geht klar hervor, dass die Werte zwischen den einzelnen Zeitpunkten hoch miteinander korrelieren. Eine Ausnahme bilden hierbei nur die Leerwerte und die Werte für die Bedingung mit “SER_4”. Zu erklären ist dies dadurch, dass bei den Leerwerten bereits kleinste Schwankungen das Ergebnis erheblich beeinflussen können, da die Werte nur knapp über “0” liegen. Für die Bedingung mit “SER_4” ist die Fallzahl kleiner als bei den anderen Bedingungen, da diese erst später eingeführt wurde und auch ausgelassen wurde, falls die Zellzahl nicht ausreichend war, sodass hier ebenfalls stär-

kere Schwankungen zu erwarten sind. Daneben liegen bei dieser Bedingung alle Wells am Rand, sodass sich Artefakte hier schneller abbilden können. Das Gleiche gilt auch für IL-13 mit einer Inkubationszeit von 25 h. Diese Versuchsvariation wurde ebenfalls nur bei den letzten Probanden eingeführt, sodass die Fallzahl geringer ausfällt.

Für die Flächenwerte der Spots ergaben sich sehr ähnliche Ergebnisse, die hier nicht weiter dargestellt werden. Insgesamt bedeutet dies, dass nicht nur die Anzahl der Spots, sondern auch die Menge an produziertem Zytokin zwischen den beiden Abnahmezeitpunkten signifikant miteinander korrelieren. Um die Korrelation der einzelnen Werte zwischen den Abnahmezeitpunkten graphisch darzustellen, wurden Punkt-Streudiagramme erstellt mit entsprechenden Ausgleichsgeraden. Nachfolgend soll dies anhand der Grundstimulation mit PHA exemplarisch gezeigt werden (siehe Abb. 3.3.4.1 bis 3.3.4.4).

Abbildung 3.3.4.1: Korrelation zwischen Zeitpunkt T1 und T2 für IFN- γ , Bedingung "PHA"

Abbildung 3.3.4.2: Korrelation zwischen Zeitpunkt T1 und T2 für IL-4, Bedingung "PHA"

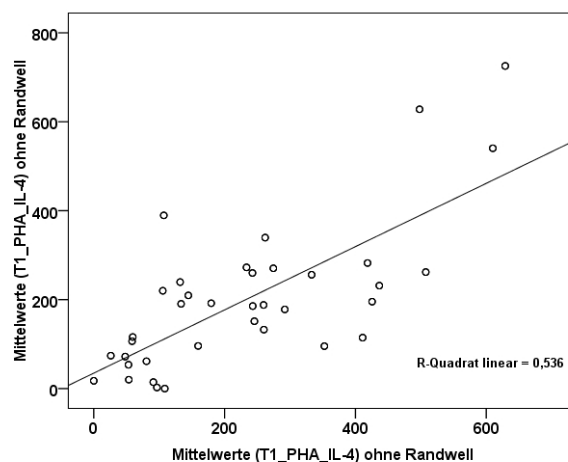
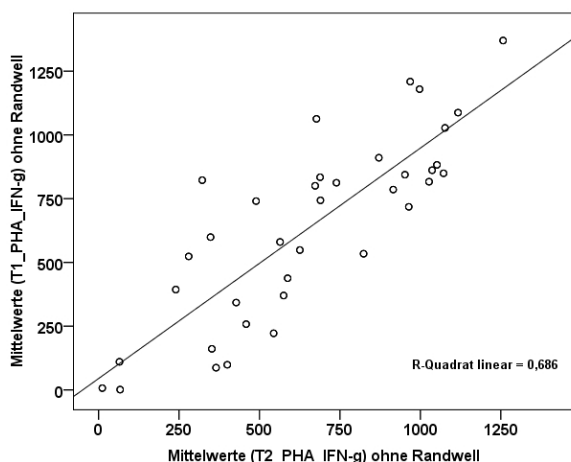
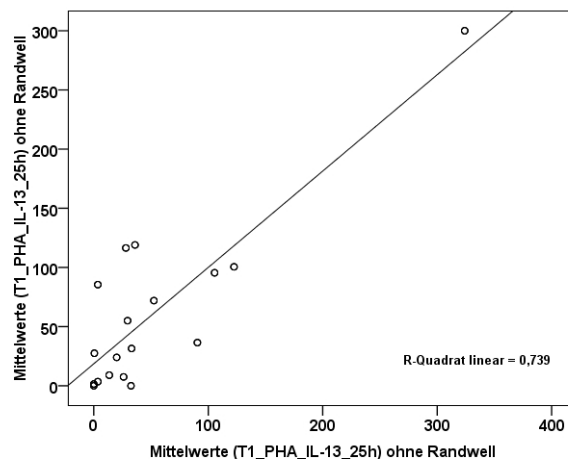
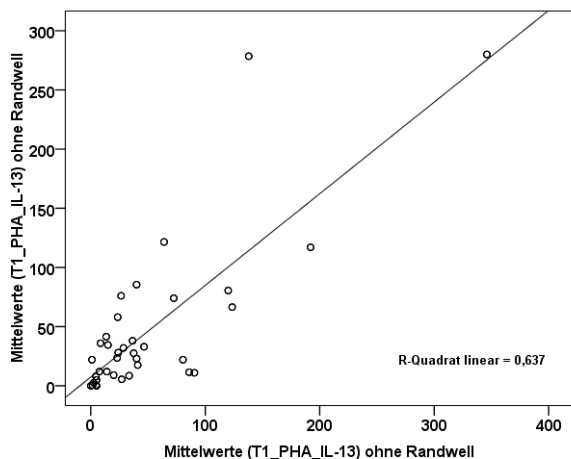


Abbildung 3.3.4.3: Korrelation zwischen Zeitpunkt T1 und T2 für IL-13, Bedingung "PHA" und 15 h Inkubationszeit

Abbildung 3.3.4.4: Korrelation zwischen Zeitpunkt T1 und T2 für IL-13, Bedingung "PHA" und 25 h Inkubationszeit



Die Graphiken zeigen deutlich, dass relativ starke interindividuelle Schwankungen bestehen, was an späterer Stelle noch eingehend abgehandelt wird (siehe Punkt 3.5 auf Seite 64). Insgesamt lässt sich festhalten, dass Probanden, die zu einem Zeitpunkt hohe Spot-Werte aufwiesen, dies auch am zweiten Zeitpunkt taten. Um für die intraindividuellen Schwankungen zu kontrollieren, wurde bei der Endauswertung daher mit den Mittelwerten der beiden Blutabnahmezeitpunkte gerechnet.

3.4 Ergebnisse zur primären Fragestellung

3.4.1 Auswahl und Beschreibung der endgültigen Stichprobe

Die Abhandlungen unter Punkt 3.3 haben gezeigt, dass mehrere Faktoren einen Einfluss auf die Varianz der Werte nehmen. Am stärksten ist dies für die Verwendung von Antibiotika der Fall. Dann folgt der qualitative Aspekt, mikroskopisch klassifiziert unter der Neubauerkammer. Des Weiteren haben soziodemografische Faktoren wie Alter und Geschlecht einen Einfluss. Auch der Well-Ort hat in einigen Fällen einen signifikanten Einfluss. Um die Ergebnisse nicht durch diese Faktoren artifiziell zu verfälschen, wurde das Kollektiv für die Untersuchung der Hauptfragestellung entsprechend ausgewählt. Es wurden also nur Fälle ausgewählt, bei denen mit Antibiotika gearbeitet wurde. Die Kategorien "verdächtige Strukturen" und "kontaminiert" in der Neubauerkammer zu Zeitpunkt T1 und die Randwells wurden ausgeschlossen. Die Werte der beiden Blutabnahmezeitpunkte wurden zusammengefasst. Die Ergebnisse stellen also Mittelwerte von Duplets zu zwei Zeitpunkten dar.

In Anlehnung von Punkt 3.2.1 auf Seite 36 "Beschreibung der Gesamtstichprobe" soll an dieser Stelle die Stichprobe näher beschrieben werden, die für die Endauswertung herangezogen wurde nach Ausschluss der oben angegebenen Punkte, wobei hierfür nur die Kategorien "Antibiotika-Verwendung" und Zellaspekt in der Neubauerkammer relevant sind. Der Ausschluss der Randwells und die Zusammenfassung beider Blutabnahmezeitpunkte verändern die Fallzahl nicht.

Insgesamt waren Daten von 42 Probanden mit einem durchschnittlichen Alter von 30,95 Jahren (23 - 60 Jahre, SD 7,8) für die Endauswertung vorhanden. In Tabelle 3.4.1.1 sind die soziodemographischen und einige methodische Charakteristika zusammengefasst.

Tabelle 3.4.1.1: Soziodemographische und methodische Charakteristika (Endstichprobe)

Variable	Kategorien	N	Prozent
Geschlecht	männlich	27	64,3
	weiblich	15	35,7
Familienstand	Nie verheiratet gewesen	27	64,3
	Geschieden	3	7,1
	Verheiratet	4	9,5
	Verheiratet mit Kind(ern)	2	4,8
	Geschieden mit Kind(ern)	1	2,4
Schulabschluss	Hauptschule	5	11,9
	Realschule	4	9,5
	Gymnasium	26	61,9
	Fachoberschule	1	2,4
Berufsausbildung	Arbeiter ohne Ausbildung	1	2,4
	Student	11	26,2
	Lehre	12	28,6
	Meister	1	2,4
	FH Diplom	1	2,4
	Hochschulabschluss	8	19,0
Medikamenteneinnahme*	Ja	6	14,3
	Nein	36	85,7
Kontamination	Nein	42	100,0
Zeitpunkt	Nur Zeitpunkt T1	5	11,9
	Beide Zeitpunkte	37	88,1

*Erfasste Medikamente: Ibuprofen, Calcium und Actonel (N=1), Neuralgin (N=1), Ovulationshemmer (N=1). Bei drei Probanden waren keine näheren Angaben erfasst; FH: Fachhochschule.

Es zeigt sich, dass keine Kontaminationen bei diesen Versuchen mehr vorkamen und von fünf Probanden Daten zum zweiten Zeitpunkt fehlten. Im Vergleich zur Gesamtstichprobe liegt ein weniger ausgewogenes Geschlechter-Verhältnis vor und die Ausbildung ist durchschnittlich etwas höher. Die Werte

für die untersuchten Laborparameter, Vitalparameter sowie Alkohol- und Nikotinkonsum unterscheiden sich nicht wesentlich von den Werten der Gesamtstichprobe (Werte nicht dargestellt). Die Kategorien des Zellaspekts unter der Neubauerzählkammer sind in Tabelle 3.4.1.2 näher beschrieben. Wie a priori ausgeschlossen finden sich die Kategorien “verdächtige Strukturen” und “kontaminiert” nicht zu Zeitpunkt T1. Zu Zeitpunkt T2 sind noch zwei Platten vorhanden, für die die Kategorie “verdächtige Strukturen” zutrifft, eine Kontamination wurde nicht mehr beobachtet.

Tabelle 3.4.1.2: Klassifikation der Zellsuspension unter der Neubauerzählkammer stratifiziert nach Abnahmezeitpunkt vor Beginn der Versuchsreihen (endgültige Stichprobe)

Variable	Kategorien	N	Prozent
T1 Zellaspekt	Sehr rein	9	21,4
	Recht rein	20	47,6
	Schotter	13	31,0
	Verdächtige Strukturen	0	0,0
	Gesamt	42	100,0
T2 Zellaspekt	Sehr rein	6	16,2
	Recht rein	12	32,4
	Schotter	17	45,9
	Verdächtige Strukturen	2	5,4
	Gesamt	37	100,0

Wie bereits weiter oben erwähnt, wurden am Ende der Versuche vor dem Waschen der Platten nochmals stichprobenartig einige Wells unter dem Mikroskop untersucht, um zu sehen, ob lebende Zellen sichtbar sind oder sich während der Versuche eine Kontamination entwickelt hat. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 3.4.1.3 wiedergegeben.

Tabelle 3.4.1.3: Zellaspektklassifikation am Ende der Versuchsreihen, stratifiziert nach Zytokinen für Endstichprobe

Zytokin	IFN- γ				IL-4				IL-13			
	T1		T2		T1		T2		T1		T2	
Kategorien	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Sehr rein, keine Zellen	4	9,5	1	2,4	0	0	1	2,4	2	4,8	0	0
Recht rein	6	14,3	7	16,7	5	11,9	4	9,5	7	16,7	7	16,7
Schotter	3	7,1	5	11,9	2	4,8	4	9,5	7	16,7	9	21,4
Sehr rein, Zellen sichtbar	10	23,8	7	16,7	8	19,0	5	11,9	3	7,1	1	2,4
Recht rein + Cluster	5	11,9	2	4,8	5	11,9	3	7,1	12	28,6	6	14,3
Verdächtige Strukturen	1	2,4	1	2,4	0	0	0	0	0	0	1	2,4
Sehr rein + Cluster	2	4,8	3	7,1	1	2,4	2	4,8	1	2,4	4	9,5
Gesamt	31	73,8	26	61,9	21	50	19	45,2	32	76,2	28	66,7

Es zeigt sich, dass bei 45,2 bis 76,2% der Probanden Stichproben gezogen wurden. Die Fallzahlen erklären sich wieder dadurch, dass diese Kontrolle erst zu einem späteren Zeitpunkt eingeführt und somit nicht alle Platten erfasst wurden. Im Gegensatz zur Gesamtstichprobe finden sich in diesem Kollektiv am Ende der Versuchsreihen keine Kontaminationen mehr und “verdächtige Strukturen” wurden nur noch bei IFN- γ in 2,4% der Fälle zu beiden Zeitpunkten und 2,4% der Fälle zu Zeitpunkt T2 bei IL-13 beobachtet. Das ist wiederum deutlich geringer als bei der Gesamtstichprobe (siehe Tabelle 3.2.1.2). Die Anzahl der lebenden Zellen ist in Tabelle 3.4.1.4 auf der nächsten Seite wiedergegeben.

Diese Tabelle zeigt deutlich, obgleich die Stichproben teilweise nur eine geringe Fallzahl aufweisen, dass sich am Ende der Assays in den kontrollierten Wells weiterhin einige lebende Zellen befinden. Die Gesamtzahl an Zellen/ml wurde mit der unter Punkt 2.4.4 auf Seite 28 angegebenen Formel berechnet. Die ermittelten Zellzahlen lagen bis auf Zeitpunkt 2 für Interleukin 13 im Schnitt unter den Ausgangs-

Tabelle 3.4.1.4: Zellzahl am Ende der ELISpot Assays

	N	MW	Min.	Max.	SD	Zellzahl ges./ml
T1 Nb ^a Zellzahl IFN- γ End	15	4,13	0	10	3,44	82600
T2 Nb Zellzahl IFN- γ End	7	2,29	1	3	0,95	45800
T1 Nb Zellzahl IL-4 End	3	4,00	2	5	1,73	80000
T2 Nb Zellzahl IL-4 End	5	8,80	2	27	10,43	176000
T1 Nb Zellzahl IL-13 End	10	7,80	2	22	5,77	156000
T2 Nb Zellzahl IL-13 End	9	32,89	2	254	83,11	657800

Nb^a: Neubauerkammer; N: Fallzahl; MW: Mittelwert; Min.: Minimum; Max.: Maximum; SD: Standardabweichung

konzentrationen und waren durchschnittlich niedriger für IFN- γ als für die beiden Interleukine, bei denen auch höhere Ausgangskonzentrationen eingesetzt wurden.

Die Ergebnisse für die Zählungen im Coulter-Counter sowie in der Neubauerkammer zu Beginn der Versuchsreihen sind für die Endstichprobe in Tabelle 7.12.2.1 auf Seite 143 in Analogie zu Tabelle 7.12.1.3 jeweils für die beiden Zeitpunkte angegeben. Es wurde wiederum mit einem Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben getestet, ob sich die Werte für die einzelnen Zeitpunkte unterscheiden. Dabei konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Ein Vergleich der Werte mit der Gesamtstichprobe zeigte keine wesentlichen Unterschiede.

Die durchgeführten Versuchsanordnungen der Endstichprobe sind in Tabelle 3.4.1.5 dargestellt.

Tabelle 3.4.1.5: Versuchsvariationen Endstichprobe

Variable	Kategorien	N	Prozent
Volumen – Pellet gelöst	2,5 ml	2	4,8
	3 ml	3	7,1
	5 ml	37	88,1
Gesamt		42	100,0
Inkubations_Temp. 2. Ak	4 °C	18	100,0
Waschen des 1. Ak	Medium	18	100,0
Mediumaspekt	klar	18	100,0
Mediumwechsel	Nein	18	100,0
Mediumvolumen	200 ml	18	100,0
Volumen Zelltransfer	100 ml	18	100,0
Zellvorinkubation	nativ	18	100,0
Pipettierschema	Substanzen vorgelegt	18	100,0
Lösemittel für Substanz P	NaCl	18	100,0
Gesamt		18	100,0

Die Fallzahl ergibt sich mit 18 dadurch, dass immer von zwei Probanden gleichzeitig alle Zytokine und Zeitpunkte gemessen wurden. Da von einigen Probanden nur von einem Zeitpunkt Zellen vorhanden waren, wurden diese teilweise zusammengefasst, sodass sich eine Gesamtzahl von 18 Versuchsdurchgängen für die 42 Probanden ergeben hat, deren Versuchsaufbau nun identisch war.

Die Werte für die einzelnen Inkubationszeiten der ELISpot-Abläufe sind in Tabelle 7.12.2.2 auf Seite 144 wiedergegeben.

Die Inkubationszeiten unterscheiden sich nicht wesentlich von denen der Gesamtstichprobe (siehe Tabelle 7.12.1.4 auf Seite 142). Die Inkubationszeit der IFN- γ -Platte ist etwas länger. Insgesamt sind die Standardabweichungen geringer, sodass die Versuchsbedingungen im Vergleich zur Gesamtstichprobe einheitlicher gehalten wurden.

3.4.2 Auswahl der statistischen Verfahren

Wie aus den Levene-Tests auf Normalverteilung der allgemeinen linearen Modelle aus Punkt 3.3 auf Seite 38 bereits ersichtlich war, verstoßen einige Bedingungen, vor allem bei den Interleukinen, gegen die Hypothese einer Normalverteilung. Um den oben beschriebenen Datensatz auf eine Normalverteilung zu testen, sind P-P-Diagramme dienlich, die die Abweichung der Daten von einer bestimmten Verteilung darstellen. Dies ist in den Abbildungen 3.4.2.1 bis 3.4.2.4 für die Grundstimulation mit PHA dargestellt.

Abbildung 3.4.2.1: P-P-Diagramm für IFN- γ

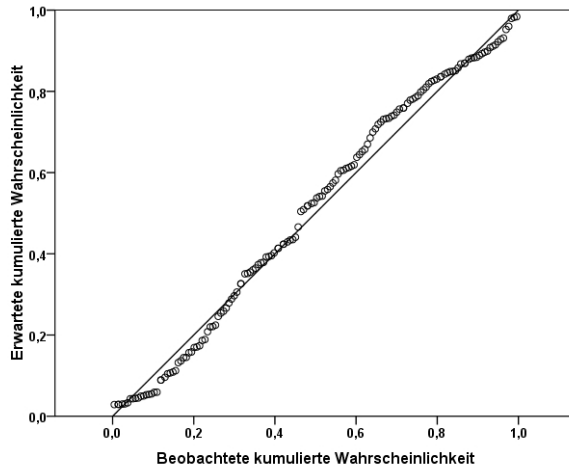


Abbildung 3.4.2.2: P-P-Diagramm für IL-4

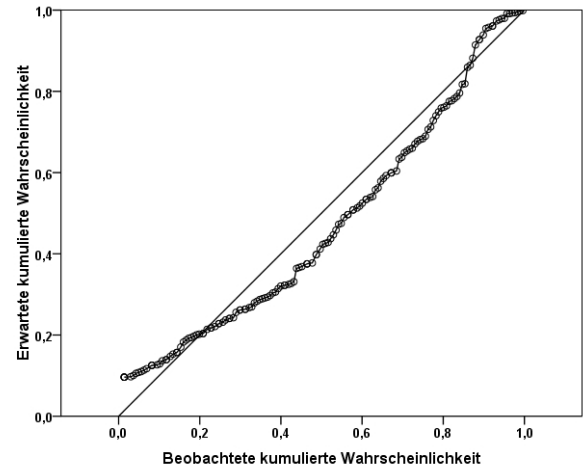


Abbildung 3.4.2.3: P-P-Diagramm für IL-13 bei 15 h Inkubationszeit

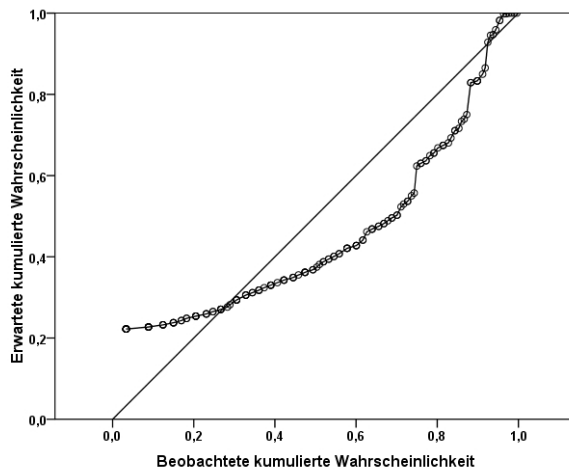
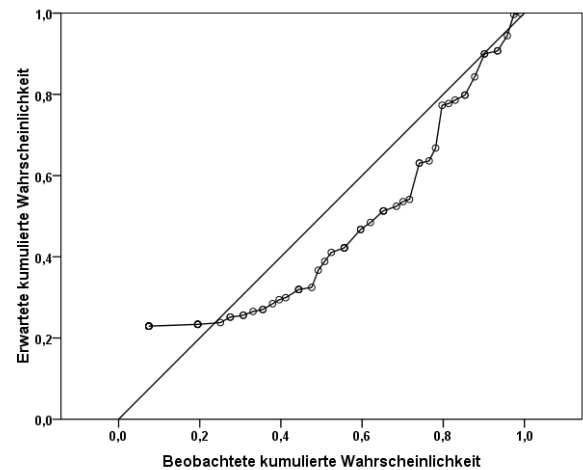


Abbildung 3.4.2.4: P-P-Diagramm für IL-13 bei 25 h Inkubationszeit



Die P-P-Diagramme zeigen für IFN- γ praktisch keine Abweichung von einer Normalverteilung. Für IL-4 sind die Abweichungen bereits größer und für IL-13 bei beiden Inkubationszeiten bereits so groß, dass eine Normalverteilung nicht mehr gegeben ist. Als statistische Testverfahren finden deshalb nicht-parametrische Tests Anwendung. Der geeignete Test hierfür ist der Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben. Dabei werden alle Variablen in Pärchen verbunden, über die eine Aussage getroffen werden soll. In Tabelle 3.4.2.1 auf der nächsten Seite sind die relevanten Pärchen angegeben, sowie die erwarteten Aussagen.

Diese 18 Tests wurden sowohl für die Anzahl der Spots als auch für die Flächenwerte gerechnet. Um für multiples Testen zu kontrollieren, wurde das Signifikanzniveau angehoben. Eine Möglichkeit ist die Korrektur nach Bonferroni. Dabei wird das allgemein übliche Signifikanzniveau von $p < 0.05$ durch die Anzahl der berechneten Tests geteilt. Als neues Signifikanzniveau erhält man so $p < 0.00278$. Werte,

Tabelle 3.4.2.1: Erwartete Ergebnisse der Hypothesenprüfung

Nummer	Variable 1	Variable 2	Erwartete Aussage
1	LW	PHA	Deutlicher Unterschied
2	PHA	SER_5	Möglicher Unterschied
3	PHA	SER_4	Möglicher, stärkerer Unterschied
4	PHA	SP	Möglicher Unterschied
5	PHA	NaCl	Kein Unterschied
6	PHA	SER_SP	Möglicher Unterschied
7	PHA	SER_NaCl	Unterschied wie 2
8	SER_5	SER_4	Möglicher Unterschied
9	SER_5	SP	Möglicher Unterschied
10	SER_5	NaCl	Unterschied wie 2 und 7
11	SER_5	SER_SP	Möglicher Unterschied
12	SER_5	SER_NaCl	Kein Unterschied
13	SP	NaCl	Unterschied wie 4
14	SP	SER_SP	Möglicher Unterschied
15	SP	SER_NaCl	Unterschied wie 9
16	NaCl	SER_SP	Möglicher Unterschied wie 6
17	NaCl	SER_NaCl	Möglicher Unterschied wie 2, 7, 10
18	SER_SP	SER_NaCl	Möglicher Unterschied wie 11

LW: Leerwert; PHA: Grundstimulation mit nur PHA; SER_5: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA; SER_4: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-4}$ mol/l + PHA; SP: Stimulation mit Substanz P mit $c = 10^{-10}$ mol/l + PHA; NaCl: Lösemittel von Substanz P + PHA; SER_NaCl: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA + Lösemittel von SP; SER_SP: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA + Substanz P mit $c = 10^{-10}$ mol/l.

die kleiner als dieser p -Wert sind, werden als statistisch signifikant bewertet. Insofern man auch die Berechnungen für die Flächenwerte in diese Korrektur einbezieht, würde sich das Signifikanzniveau weiter auf $p < 0,00139$ absenken. Um mit einer möglichst großen Fallzahl zu rechnen, wurden die fehlenden Werte zu Zeitpunkt 2 für die fünf Probanden (siehe Tabelle 3.4.1.1) mit Schätzwerten aufgefüllt. Da - wie unter Punkt 3.3.4 auf Seite 48 gezeigt - die Werte der einzelnen Probanden zwischen den Blutentnahmezeitpunkten hoch miteinander korrelieren, wurde als Schätzwert für diese fünf Probanden der Wert zu Zeitpunkt 1 eingesetzt.

3.4.3 Ergebnisse für IFN-gamma

Mit der oben beschriebenen Datenauswahl erhält man für den Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben die in Tabelle 3.4.3.1 angegebene deskriptive Statistik.

Tabelle 3.4.3.1: Deskriptive Statistik für IFN- γ , Spotanzahl und Flächenwerte

Variablen	N		MW		SD		Min.		Max.	
	Spots	Fläche	Spots	Fläche	Spots	Fläche	Spots	Fläche	Spots	Fläche
LW	42	38	1,7	$0,05 \times 10^6$	3,5	$1,94 \times 10^5$	0,0	0,00	22,0	$1,21 \times 10^6$
PHA	42	38	654,1	$1,35 \times 10^6$	323,2	$7,65 \times 10^5$	9,3	6470,75	1313,5	$2,92 \times 10^6$
SER_5	42	38	634,0	$1,21 \times 10^6$	313,9	$6,65 \times 10^5$	6,5	4699,25	1272,8	$2,37 \times 10^6$
SER_4	32	30	575,2	$1,18 \times 10^6$	312,8	$6,79 \times 10^5$	13,8	26 162,25	1250,8	$2,32 \times 10^6$
SP	42	38	649,6	$1,26 \times 10^6$	315,6	$7,16 \times 10^5$	3,8	3296,50	1292,5	$2,47 \times 10^6$
NaCl	42	37	640,0	$1,29 \times 10^6$	318,4	$7,11 \times 10^5$	10,0	11 746,25	1334,5	$2,69 \times 10^6$
SER_SP	40	38	696,2	$1,37 \times 10^6$	331,9	$7,35 \times 10^5$	14,0	15 985,25	1416,3	$2,66 \times 10^6$
SER_NaCl	40	38	661,4	$1,25 \times 10^6$	318,7	$6,90 \times 10^5$	10,8	8570,75	1267,3	$2,60 \times 10^6$

N: Fallzahl; SD: Standardabweichung; LW: Leerwert; PHA: Grundstimulation mit nur PHA; SER_5: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA; SER_4: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-4}$ mol/l + PHA; SP: Stimulation mit Substanz P mit $c = 10^{-10}$ mol/l + PHA; NaCl: Lösemittel von Substanz P + PHA; SER_NaCl: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA + Lösemittel von SP; SER_SP: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA + Substanz P mit $c = 10^{-10}$ mol/l.

In Tabelle 3.4.3.2 sind die Ergebnisse für IFN- γ dargestellt. Dabei werden die Ergebnisse in der letzten Spalte entsprechend bewertet. Beide Tabellen enthalten die Werte für die Spot-Zahlen sowie die Flächenwerte. Die Fallzahl für die Flächenwerte fällt etwas geringer aus, da von vier Probanden keine Flächenwerte aus methodischen Gründen bestimmt werden konnten.

Tabelle 3.4.3.2: Ergebnisse für IFN- γ , Spotanzahl und Flächenwerte

Nr.	Var. 1	Var. 2	Z-Wert		p-Wert		Aussage	
			Spots	Fläche	Spots	Fläche	Spots	Fläche
1	LW	PHA	-5,645	-5,301	0,000 000	0,000 001	Sign.	Sign.
2	PHA	SER_5	-1,821	-3,096	0,069 000	0,001 960	ns	Grenzw. sign.
3	PHA	SER_4	-4,488	-3,507	0,000 007	0,000 450	Sign.	Sign.
4	PHA	SP	-0,569	-2,154	0,569 000	0,031 000	ns	ns
5	PHA	NaCl	-1,138	-1,577	0,255 000	0,115 000	ns	ns
6	PHA	SER_SP	-1,868	-0,515	0,062 000	0,607 000	ns	ns
7	PHA	SER_NaCl	-0,686	-2,458	0,493 000	0,014 000	ns	ns
8	SER_5	SER_4	-3,796	-1,697	0,000 140	0,090 000	Sign.	ns
9	SER_5	SP	-2,320	-2,371	0,020 000	0,018 000	ns	ns
10	SER_5	NaCl	-0,800	-1,924	0,424 000	0,054 000	ns	ns
11	SER_5	SER_SP	-3,817	-4,010	0,000 130	0,000 061	Sign.	Sign.
12	SER_5	SER_NaCl	-2,379	-1,646	0,017 000	0,100 000	ns	ns
13	SP	NaCl	-0,419	-0,626	0,675 000	0,531 000	ns	ns
14	SP	SER_SP	-3,750	-3,531	0,000 180	0,000 410	Sign.	Sign.
15	SP	SER_NaCl	-0,726	-0,022	0,468 000	0,983 000	ns	ns
16	NaCl	SER_SP	-2,742	-1,742	0,006 000	0,081 000	Grenzw. sign.	ns
17	NaCl	SER_NaCl	-0,598	-0,807	0,550 000	0,420 000	ns	ns
18	SER_SP	SER_NaCl	-2,870	-3,836	0,004 000	0,000 130	Grenzw. sign.	Sign.

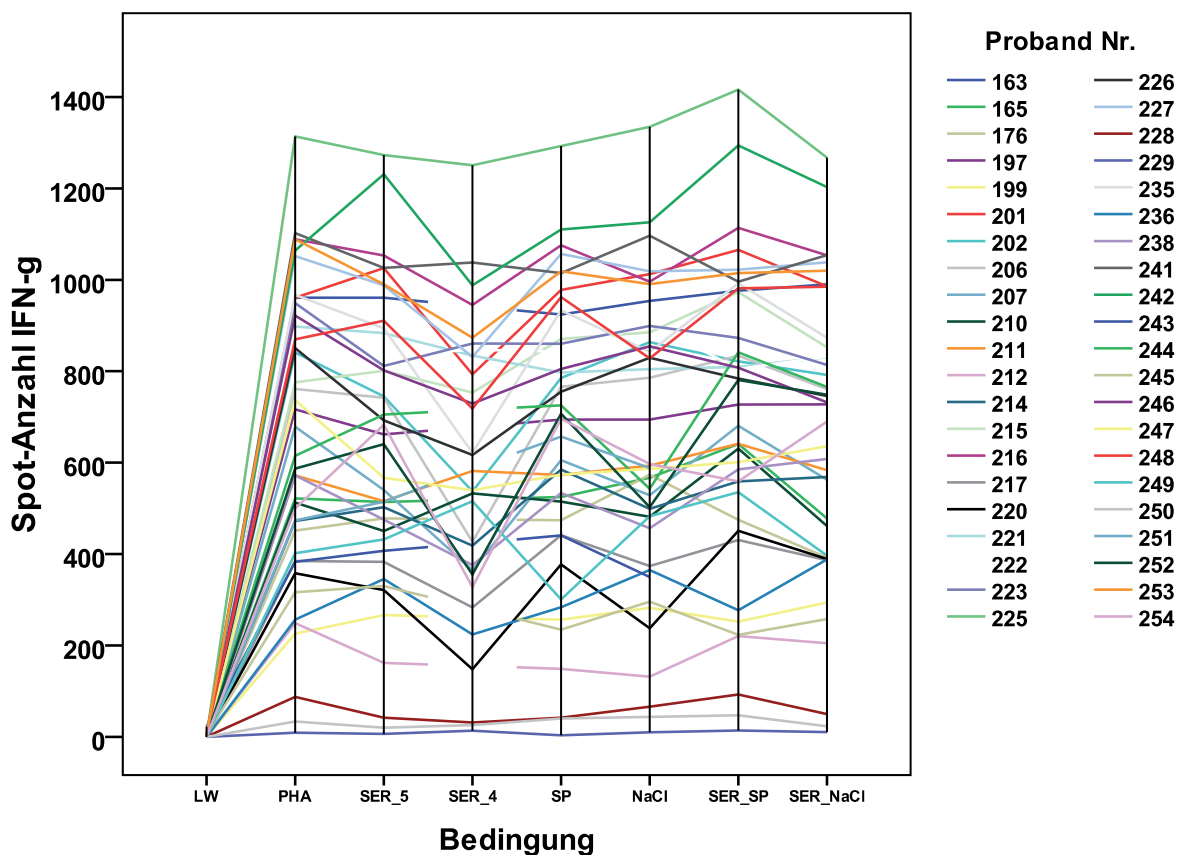
LW: Leerwert; PHA: Grundstimulation mit nur PHA; SER_5: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA; SER_4: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-4}$ mol/l + PHA; SP: Stimulation mit Substanz P mit $c = 10^{-10}$ mol/ + PHA; NaCl: Lösemittel von Substanz P + PHA; SER_NaCl: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA + Lösemittel von SP; SER_SP: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA + Substanz P mit $c = 10^{-10}$ mol/l; ns: nicht signifikant, sign.: signifikant nach Korrektur für multiples Testen, grenzw. sign.: $p < 0.01$, aber vorgegebenes Signifikanzniveau für multiples Testen nicht ganz erreicht.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Leerwerte signifikant von der Grundstimulation mit PHA unterscheiden (Nr. 1). Dieses Ergebnis lässt sich aus der deskriptiven Statistik auch auf die anderen Bedingungen extrapolieren, d.h. jede Bedingung mit PHA zeigt einen signifikanten Unterschied zu den Leerwerten. Die Hinzugabe von physiologischer Kochsalz-Lösung - dem Trägermittel von Substanz P - zeigt keinen Unterschied zur reinen Grundstimulation mit PHA, was eine Voraussetzung ist zur Bewertung einer möglichen Wirkung von Substanz P (Nr. 5). Ebenso wenig hat die Hinzugabe von physiologischer Kochsalz-Lösung einen Einfluss auf die Wirkung von Serotonin (Nr. 12). Serotonin zeigt, wie bereits in den Vorversuchen, eine konzentrationsabhängige Wirkung. In einer Konzentration von 10^{-5} mol/l kommt es zwar zu einer geringeren Spot-Produktion, die jedoch nicht signifikant ist (Nr. 2, Nr. 10, Nr. 7, Nr. 17). Bei der höheren Serotonin-Konzentration (10^{-4} mol/l) zeigt sich hingegen eine deutliche Abnahme der Spot-Anzahl im Vergleich zur Grundstimulation mit PHA (Nr. 3). Das gleiche Ergebnis zeigt sich auch im Vergleich mit Serotonin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l (Nr. 8). Allerdings zeigen sich die Flächenwerte hier nicht statistisch signifikant unterschiedlich. Substanz P zeigt keine Wirkung auf die IFN- γ -Produktion (Nr. 4, 13). Ebenso zeigt sich kein Unterschied gegenüber einer alleinigen Stimulation mit Serotonin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l (Nr. 9, 15). Die Kombination aus Substanz P und Serotonin zeigt gegenüber einer alleinigen Stimulation mit PHA höhere Werte, diese sind jedoch nicht statistisch signifikant (Nr. 6 und Nr. 16). Interessanterweise zeigt sich jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kombination aus Substanz P und Serotonin gegenüber einer alleinigen Stimulation mit Serotonin (Nr. 11) oder gegenüber einer alleinigen Stimulation mit Substanz P (Nr. 14). Die Ergebnisse für den Vergleich mit Serotonin und dem Trägermittel von Substanz P sind für die Spot-Werte

allerdings nur grenzwertig signifikant, für die Flächenwerte jedoch signifikant.

Um die Ergebnisse graphisch darzustellen eignen sich am ehesten die Verläufe der einzelnen Probanden und die Mittelwertverläufe zur besseren Übersicht.

Abbildung 3.4.3.1: Liniendiagramm für IFN- γ



Unterbrochene Linien bei Bedingung SER_4 (Serotonin in einer Konzentration von 10^{-4} mol/l) sind durch eine geringere Fallzahl bei dieser Bedingung zu erklären.

Das Liniendiagramm zeigt, dass die einzelnen Probanden ein unterschiedliches Niveau haben in Bezug auf die Menge an produziertem IFN- γ . Es gibt Probanden, die generell sehr viel produzieren und diese Menge wird dann innerhalb ihres Reaktionsniveaus durch die einzelnen Bedingungen moduliert. Andere Probanden produzieren nur recht wenig, bleiben aber auch auf diesem Niveau. Daneben ist die Absenkung durch Serotonin in einer Konzentration von 10^{-4} mol/l gut erkennbar. Die anderen statistischen Ergebnisse lassen sich hingegen weniger deutlich im Diagramm zeigen. Zu vermuten ist auch, dass nicht alle Probanden in die gleiche Richtung reagieren und es vermutlich auch individuelle Reaktionsmuster gibt. Um den Verlauf der Mittelwerte nochmals klarer darzustellen soll die Abbildung 3.4.3.2 auf der nächsten Seite dienen.

In dieser Darstellung sind nun die Ergebnisse der deskriptiven Statistik am besten abgebildet, da erkennbar wird, dass die gemeinsame Stimulation aus SP und Serotonin die höchsten Werte erreichen lässt. Die Hilfslinie ist beim Mittelwert dieser Bedingung eingezeichnet. In Abb. 3.4.3.3 auf der nächsten Seite sind die Ergebnisse für die Flächenwerte abgebildet. Man sieht das prinzipiell gleiche Reaktionsmuster, allerdings sind die Werte für die Grundstimulation mit PHA größer als bei den Spot-Zahlen und damit erreicht die gemeinsame Stimulation aus Serotonin und Substanz P nur noch knapp die höchsten Werte.

Wertet man die prozentualen Veränderungen der einzelnen Bedingungen für die Spots und die Flächenwerte aus und setzt die Grundstimulation mit PHA als 100% an, so vermindert die alleinige Stimulation mit Serotonin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l die Spot-Produktion um 4,3% und Serotonin in

Abbildung 3.4.3.2: Mittelwertverlauf für IFN- γ , Spotanzahl

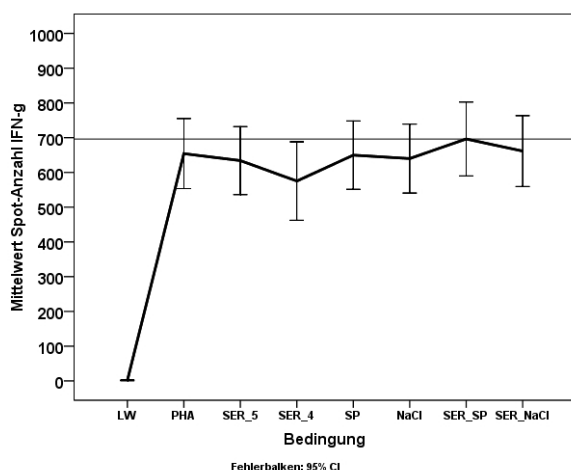
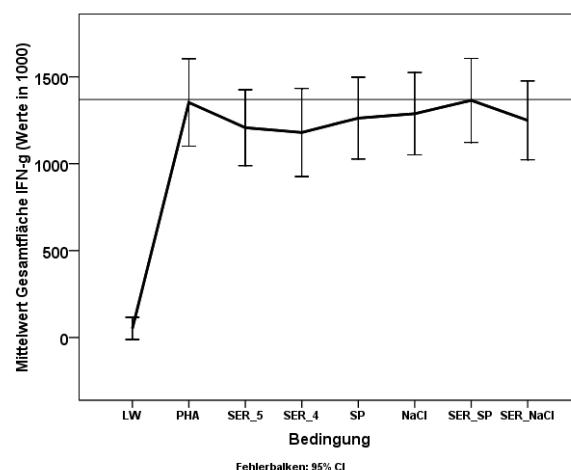


Abbildung 3.4.3.3: Mittelwertverlauf für IFN- γ , Flächenwerte



einer Konzentration von 10^{-4} mol/l diese um 18,4%. Substanz P erniedrigt die Spot-Produktion lediglich um 1,7% und die Kombination aus Serotonin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l und SP steigert die Spot-Produktion um 8,0%. Gegenüber der jeweiligen alleinigen Stimulation ergeben sich somit Differenzen von 12,3% für Serotonin und 9,7% für SP.

Für die Flächenwerte ergeben sich Veränderungen von -7,2% für Serotonin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l, -4,7% für SP und +10,9% für die Kombination aus beiden.

3.4.4 Ergebnisse für IL-4

In Analogie zu den Ergebnissen für IFN- γ beinhaltet die Tabelle 3.4.4.1 die deskriptive Statistik für IL-4. Es werden wieder die Daten für die Spot-Zahlen und die Flächenwerte angegeben.

Tabelle 3.4.4.1: Deskriptive Statistik für IL-4, Spotanzahl und Flächenwerte

Variablen	N	MW		SD		Min.		Max.		
		Spots	Fläche	Spots	Fläche	Spots	Fläche	Spots	Fläche	
LW	42	37	$0,5$	$0,22 \times 10^5$	0,6	$0,46 \times 10^5$	0,0	0,00	2,3	$2,81 \times 10^5$
PHA	42	38	220,8	$3,38 \times 10^5$	149,7	$2,55 \times 10^5$	8,8	11 645,50	677,3	$11,24 \times 10^5$
SER_5	42	38	208,1	$3,12 \times 10^5$	137,8	$2,30 \times 10^5$	9,3	23 124,50	593,3	$9,72 \times 10^5$
SER_4	27	29	196,1	$2,97 \times 10^5$	147,3	$2,64 \times 10^5$	4,3	6765,00	544,0	$9,18 \times 10^5$
SP	42	38	219,3	$3,17 \times 10^5$	137,0	$2,08 \times 10^5$	7,8	20 001,50	555,5	$8,29 \times 10^5$
NaCl	42	38	215,0	$3,36 \times 10^5$	152,7	$2,68 \times 10^5$	5,8	10 087,50	673,8	$11,85 \times 10^5$
SER_SP	42	38	247,9	$3,87 \times 10^5$	158,5	2,58	8,5	7462,00	680,5	$10,65 \times 10^5$
SER_NaCl	42	38	224,6	$3,27 \times 10^5$	146,5	$2,36 \times 10^5$	8,0	6754,00	656,3	$10,89 \times 10^5$

N: Fallzahl; SD: Standardabweichung; LW: Leerwert; PHA: Grundstimulation mit nur PHA; SER_5: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA; SER_4: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-4}$ mol/l + PHA; SP: Stimulation mit Substanz P mit $c = 10^{-10}$ mol/l + PHA; NaCl: Lösemittel von Substanz P + PHA; SER_NaCl: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA + Lösemittel von SP; SER_SP: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA + Substanz P mit $c = 10^{-10}$ mol/l.

Es zeigt sich erneut, dass die Kombination einer Stimulation mit Serotonin und Substanz P die höchsten Werte erreicht. In Tabelle 3.4.4.2 auf der nächsten Seite sind die Ergebnisse der Wilcoxon-Tests wiedergegeben und entsprechend bewertet.

Damit zeigt sich auch hier, dass sich die Leerwerte signifikant von der Grundstimulation mit PHA unterscheiden (Nr. 1). Dieses Ergebnis lässt sich aus der deskriptiven Statistik auch diesmal auf die anderen Bedingungen extrapolieren, d.h. jede Bedingung mit PHA zeigt einen signifikanten Unterschied zu den Leerwerten. Die Hinzugabe von physiologischer Kochsalz-Lösung zeigt keinen Unterschied zur reinen

Tabelle 3.4.4.2: Ergebnisse für IL-4, Spotanzahl und Flächenwerte

Nr.	Var. 1	Var. 2	Z-Wert		p-Wert		Aussage	
			Spots	Fläche	Spots	Fläche	Spots	Fläche
1	LW	PHA	-5,645	-5,288	0,000 000	0,000 000	Sign.	Sign.
2	PHA	SER_5	-1,232	-1,936	0,218 000	0,053 000	ns	ns
3	PHA	SER_4	-2,931	-1,827	0,003 000	0,068 000	Grenzw. sign.	ns
4	PHA	SP	-0,363	-1,283	0,717 000	0,199 000	ns	ns
5	PHA	NaCl	-1,032	-0,341	0,302 000	0,733 000	ns	ns
6	PHA	SER_SP	-1,763	-1,704	0,078 000	0,088 000	ns	ns
7	PHA	SER_NaCl	-0,269	-0,863	0,788 000	0,388 000	ns	ns
8	SER_5	SER_4	-1,970	-0,832	0,049 000	0,405 000	ns	ns
9	SER_5	SP	-1,250	-0,747	0,211 000	0,455 000	ns	ns
10	SER_5	NaCl	-0,317	-0,732	0,751 000	0,464 000	ns	ns
11	SER_5	SER_SP	-3,355	-3,575	0,000 384	0,000 350	Sign.	Sign.
12	SER_5	SER_NaCl	-1,432	-1,109	0,152 000	0,267 000	ns	ns
13	SP	NaCl	-0,644	-0,413	0,520 000	0,679 000	ns	ns
14	SP	SER_SP	-2,557	-3,415	0,011 000	0,000 637	ns	Sign.
15	SP	SER_NaCl	-0,388	-0,283	0,698 000	0,777 000	ns	ns
16	NaCl	SER_SP	-2,495	-2,168	0,013 000	0,030 000	ns	ns
17	NaCl	SER_NaCl	-0,631	-0,413	0,528 000	0,679 000	ns	ns
18	SER_SP	SER_NaCl	-2,038	-2,806	0,042 000	0,005 000	ns	Grenzw. Sign.

LW: Leerwert; PHA: Grundstimulation mit nur PHA; SER_5: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA; SER_4: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-4}$ mol/l + PHA; SP: Stimulation mit Substanz P mit $c = 10^{-10}$ mol/l + PHA; NaCl: Lösemittel von Substanz P + PHA; SER_NaCl: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA + Lösemittel von SP; SER_SP: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA + Substanz P mit $c = 10^{-10}$ mol/l; ns: nicht signifikant, sign.: signifikant nach Korrektur für multiples Testen, grenzw. sign.: $p < 0.01$, aber vorgegebenes Signifikanzniveau für multiples Testen nicht ganz erreicht.

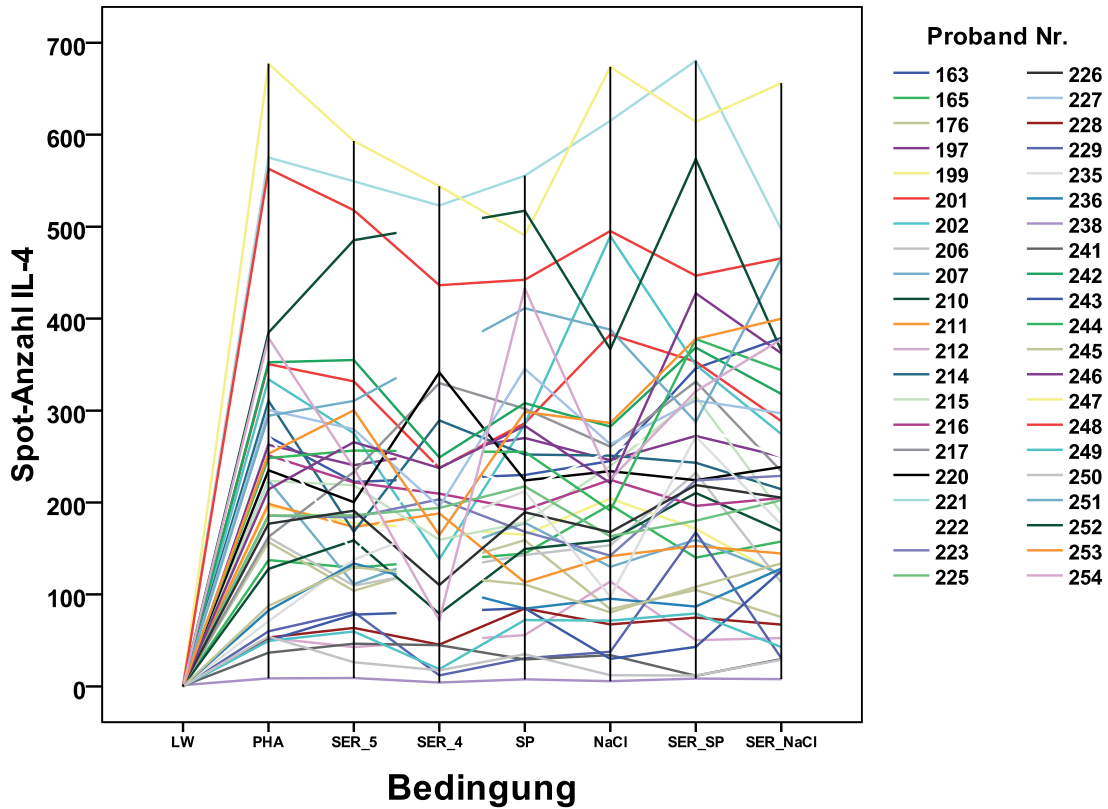
Grundstimulation mit PHA (Nr. 5). Ebenso wenig hat die Hinzugabe von physiologischer Kochsalz-Lösung einen Einfluss auf die Wirkung von Serotonin (Nr. 12). Die Wirkung von Serotonin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l zeigt diesmal keinen Unterschied zur Grundstimulation mit PHA (Nr. 2, 7, 10, 17). Die höhere Konzentration von 10^{-4} mol/l zeigt eine grenzwertig signifikante Erniedrigung der Spot-Anzahl im Vergleich zur Grundstimulation mit PHA (Nr. 3), jedoch nicht für die Flächenwerte. Kein Unterschied besteht zwischen den beiden Serotonin-Konzentrationen (Nr. 8). Die alleinige Stimulation mit Substanz P zeigt ebenfalls keine Wirkung auf die IFN- γ -Produktion (Nr. 4, 13). Ebenso zeigt sich kein Unterschied gegenüber einer alleinigen Stimulation mit Serotonin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l (Nr. 9, 15). Die Kombination aus Substanz P und Serotonin zeigt gegenüber einer alleinigen Stimulation mit PHA oder Kochsalz-Lösung keine Veränderung (Nr. 6, 16). Gegenüber Serotonin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l zeigt sich jedoch auch für IL-4 eine signifikante Steigerung der Spot-Anzahl (Nr. 11). Allerdings ist dieser Unterschied bei Kontrolle für das Lösungsmittel von SP nur für die Flächenwerte grenzwertig signifikant (Nr. 18). Ebenfalls zeigt sich nur für die Flächenwerte ein signifikanter Unterschied zwischen der Kombination aus Substanz P und Serotonin gegenüber einer alleinigen Stimulation mit SP (Nr. 14).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass für IL-4 - im Gegensatz zu IFN- γ - die Kombination aus SP und Serotonin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l eher zu einer Steigerung der Zytokinproduktion durch die jeweiligen Zellen als zu einer Vermehrung der IL-4 produzierenden Zellen führt. Die Ergebnisse für die Flächenwerte bleiben auch nach einer Korrektur nach Bonferroni für 36 Tests signifikant.

Wie bei IFN- γ sind im Liniendiagramm der Mittellinienverläufe für IL-4 wieder erhebliche interindividuelle Schwankungen sichtbar (siehe Abb. 3.4.4.1 auf der nächsten Seite).

Es wird deutlich, dass die einzelnen Probanden ein unterschiedliches Niveau in Bezug auf die IL-4-Produktion besitzen. Daneben führt interessanterweise die Stimulation mit Serotonin in einer Konzentration von 10^{-4} mol/l bei einigen Probanden optisch eher zu einer Zunahme der Zytokin-Produktion, obgleich das Mittel auch hier eine verminderte IL-4-Produktion ergibt, wie aus Abb. 3.4.4.2 ersichtlich

Abbildung 3.4.4.1: Liniendiagramm für IL-4

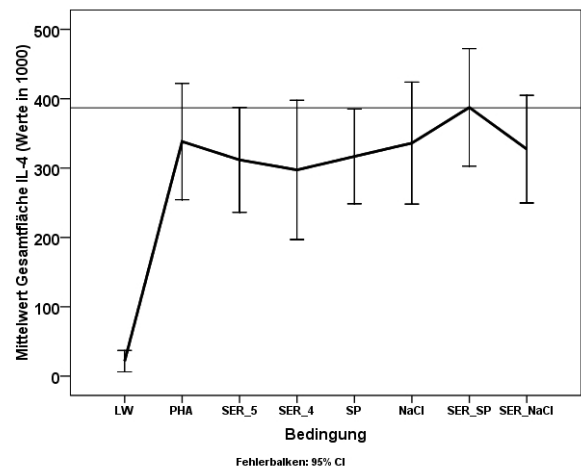
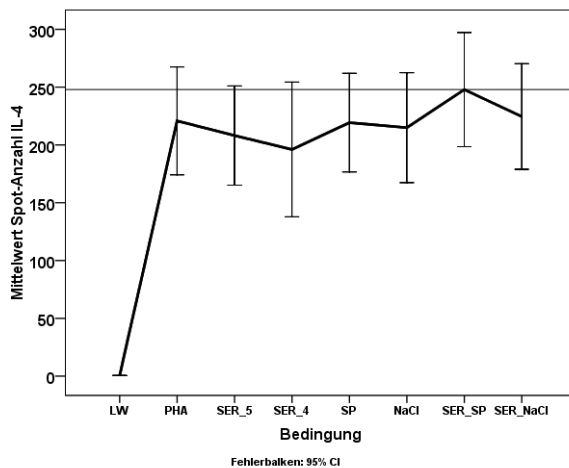


Unterbrochene Linien bei Bedingung SER_4 (Serotonin in einer Konzentration von 10^{-4} mol/l) sind durch eine geringere Fallzahl bei dieser Bedingung zu erklären.

wird. Der Verlauf der Mittelwerte für die Flächenwerte für IL-4 ähnelt dem Verlauf der Mittelwerte für die Spot-Zahlen deutlicher als das bei IFN- γ der Fall war (siehe Abb. 3.4.4.3).

Abbildung 3.4.4.2: Mittelwertverlauf für IL-4, Spotanzahl

Abbildung 3.4.4.3: Mittelwertverlauf für IL-4, Flächenwerte



Wenn man wieder die prozentualen Veränderungen der einzelnen Bedingungen für IL-4 auswertet, so steigert die alleinige Stimulation mit Serotonin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l die Spot-Produktion um 1,5%, während Serotonin in einer Konzentration von 10^{-4} mol/l die Produktion um 20,2% vermindert. Substanz P steigert die Spot-Produktion leicht um 6,7% und die Kombination aus

Serotonin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l und SP um 20,1%.

Für die Flächenwerte ergeben sich Veränderungen von 6,0% für Serotonin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l, 5,8% für SP und 28.2% für die Kombination aus beiden.

3.4.5 Ergebnisse für IL-13

Die Ergebnisse der deskriptiven Statistik für IL-13 sind in Tabelle 3.4.5.1 dargestellt.

Tabelle 3.4.5.1: Deskriptive Statistik für IL-13, Spotanzahl und Flächenwerte

Variablen	N		MW		SD		Min.		Max.	
	Spots	Fläche	Spots	Fläche	Spots	Fläche	Spots	Fläche	Spots	Fläche
LW	42	38	0,7	$1,66 \times 10^4$	0,6	$1,60 \times 10^4$	0,0	0,00	2,5	$0,60 \times 10^5$
PHA	42	38	47,4	$9,13 \times 10^4$	59,0	$9,30 \times 10^4$	0,0	0,00	313,0	$4,49 \times 10^5$
SER_5	42	38	43,1	$9,08 \times 10^4$	46,4	$9,66 \times 10^4$	0,3	416,50	215,5	$4,51 \times 10^5$
SER_4	18	18	43,8	$10,32 \times 10^4$	44,8	$10,26 \times 10^4$	1,8	3277,25	171,0	$4,10 \times 10^5$
SP	42	38	43,3	$8,79 \times 10^4$	45,3	$8,78 \times 10^4$	0,3	1416,50	185,5	$3,20 \times 10^5$
NaCl	42	38	43,0	$9,25 \times 10^4$	44,8	$9,21 \times 10^4$	1,0	797,50	165,0	$3,44 \times 10^5$
SER_SP	41	38	55,3	$12,09 \times 10^4$	57,3	$12,81 \times 10^4$	2,8	3322,50	221,0	$4,93 \times 10^5$
SER_NaCl142	38	38	44,0	$8,76 \times 10^4$	42,0	$8,49 \times 10^4$	0,5	1851,75	164,8	$3,25 \times 10^5$

N: Fallzahl; SD: Standardabweichung; LW: Leerwert; PHA: Grundstimulation mit nur PHA; SER_5: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA; SER_4: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-4}$ mol/l + PHA; SP: Stimulation mit Substanz P mit $c = 10^{-10}$ mol/l + PHA; NaCl: Lösemittel von Substanz P + PHA; SER_NaCl: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA + Lösemittel von SP; SER_SP: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA + Substanz P mit $c = 10^{-10}$ mol/l.

Auch für IL-13 zeigen sich die höchsten Werte für die Spot-Zahlen als auch die Flächenwerte bei der Kombination aus Substanz P und Serotonin. In Tabelle 3.4.5.2 auf der nächsten Seite finden sich die Ergebnisse der Wilcoxon-Tests mit der entsprechenden Bewertung.

Es zeigt sich ein ähnliches Muster wie bei den anderen beiden Zytokinen. Die Leerwert-Bedingung ist wieder hochsignifikant zu allen anderen Bedingungen unterschiedlich (Nr. 1). Des Weiteren unterscheidet sich die Kombination aus Substanz P und Serotonin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l gegenüber der alleinigen Stimulation mit Substanz P (Nr. 14) signifikant sowohl für die Spot- als auch die Flächenwerte. Gegenüber Serotonin allein ist die Kombination aus Serotonin und SP für die Spot-Anzahl signifikant und für die Flächenwerte grenzwertig signifikant (Nr. 11). Wenn man für die Trägersubstanz von SP kontrolliert, dreht es sich genau um. Gegenüber einer alleinigen Stimulation mit physiologischer Kochsalz-Lösung ist die Kombination für die Spot-Zahlen grenzwertig signifikant, nicht aber für die Flächenwerte und gegenüber der Grundstimulation mit PHA zeigen sich keine Unterschiede.

Auch für IL-13 sind wieder erhebliche interindividuelle Schwankungen im Liniendiagramm aus Abb. 3.4.5.1 sichtbar und es wird deutlich, dass die einzelnen Probanden ein unterschiedliches Niveau in Bezug auf die Zytokin-Produktion besitzen.

Bei sehr vielen Probanden liegt nur eine recht geringe IL-13-Produktion vor, deshalb wurde zur Bestimmung von IL-13 noch eine weitere Inkubationszeit eingeführt. Die Mittelwertverläufe für die Spot-Zahlen (Abb. 3.4.5.2) und die Flächenwerte (Abb. 3.4.5.3 auf Seite 63) ähneln sich wieder sehr deutlich. Für die Bedingung Serotonin in einer Konzentration von 10^{-4} mol/l sind die stärksten Schwankungen durch die Fehlerbalken markiert, was vermutlich zum einen an der geringen Fallzahl für diese Bedingung und zum anderen daran liegt, dass bei dieser Bedingung alle Wells am Rand lagen. Die durchbrochenen Linien in Abb. 3.4.5.1 auf Seite 63 für diese Bedingung spiegeln die geringe Fallzahl wider.

Bei IL-13 führt die alleinige Stimulation mit Serotonin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l zu einer Steigerung der Spot-Produktion um 19,1%, während Serotonin in einer Konzentration von 10^{-4} mol/l die Produktion um 8,3% vermindert. Substanz P steigert die Spot-Produktion bereits um 34,6% und die Kombination aus Serotonin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l und SP um 65,9%.

Tabelle 3.4.5.2: Ergebnisse für IL-13, Spotanzahl und Flächenwerte

Nr.	Var. 1	Var. 2	Z-Wert		p-Wert		Aussage	
			Spots	Fläche	Spots	Fläche	Spots	Fläche
1	LW	PHA	-5,633	-5,214	0,000 000	0,000 000	Sign.	Sign.
2	PHA	SER_5	-0,065	-0,007	0,948 000	0,994 000	ns	ns
3	PHA	SER_4	-1,633	-0,762	0,102 000	0,446 000	ns	ns
4	PHA	SP	-1,057	-0,529	0,291 000	0,597 000	ns	ns
5	PHA	NaCl	-0,556	-0,283	0,578 000	0,777 000	ns	ns
6	PHA	SER_SP	-2,508	-2,284	0,012 000	0,022 000	ns	ns
7	PHA	SER_NaCl	-0,481	-0,471	0,630 000	0,637 000	ns	ns
8	SER_5	SER_4	-2,113	-0,806	0,035 000	0,420 000	ns	ns
9	SER_5	SP	-0,063	-0,442	0,950 000	0,658 000	ns	ns
10	SER_5	NaCl	-0,500	-0,428	0,617 000	0,669 000	ns	ns
11	SER_5	SER_SP	-3,402	-2,632	0,000 669	0,008 000	Sign.	Grenzw. sign.
12	SER_5	SER_NaCl	-0,745	-0,065	0,456 000	0,948 000	ns	ns
13	SP	NaCl	-0,975	-1,008	0,329 000	0,313 000	ns	ns
14	SP	SER_SP	-3,920	-3,357	0,000 089	0,000 787	Sign.	Sign.
15	SP	SER_NaCl	-0,565	-0,152	0,572 000	0,879 000	ns	ns
16	NaCl	SER_SP	-2,851	-1,849	0,004 000	0,064 000	Grenzw. sign.	ns
17	NaCl	SER_NaCl	-0,255	-1,124	0,798 000	0,261 000	ns	ns
18	SER_SP	SER_NaCl	-3,018	-3,183	0,002 500	0,001 460	Grenzw. sign.	Sign.

LW: Leerwert; PHA: Grundstimulation mit nur PHA; SER_5: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA; SER_4: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-4}$ mol/l + PHA; SP: Stimulation mit Substanz P mit $c = 10^{-10}$ mol/l + PHA; NaCl: Lösemittel von Substanz P + PHA; SER_NaCl: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA + Lösemittel von SP; SER_SP: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA + Substanz P mit $c = 10^{-10}$ mol/l; ns: nicht signifikant, sign.: signifikant nach Korrektur für multiples Testen, grenzw. sign.: $p < 0.01$, aber vorgegebenes Signifikanzniveau für multiples Testen nicht ganz erreicht.

Für die Flächenwerte ergeben sich Veränderungen von 28,8% für Serotonin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l, 57,7% für SP und 88,7% für die Kombination aus beiden.

3.4.5.1 15 h versus 25 h Da IL-13 bei kurzen Inkubationszeiten nur schwer zu messen ist, wurde für dieses Zytokin neben der Inkubationszeit wie für die anderen Zytokine noch eine längere Inkubationszeit von 25 h durchgeführt. Die Ergebnisse der deskriptiven Statistik sind in Tabelle 3.4.5.3 dargestellt.

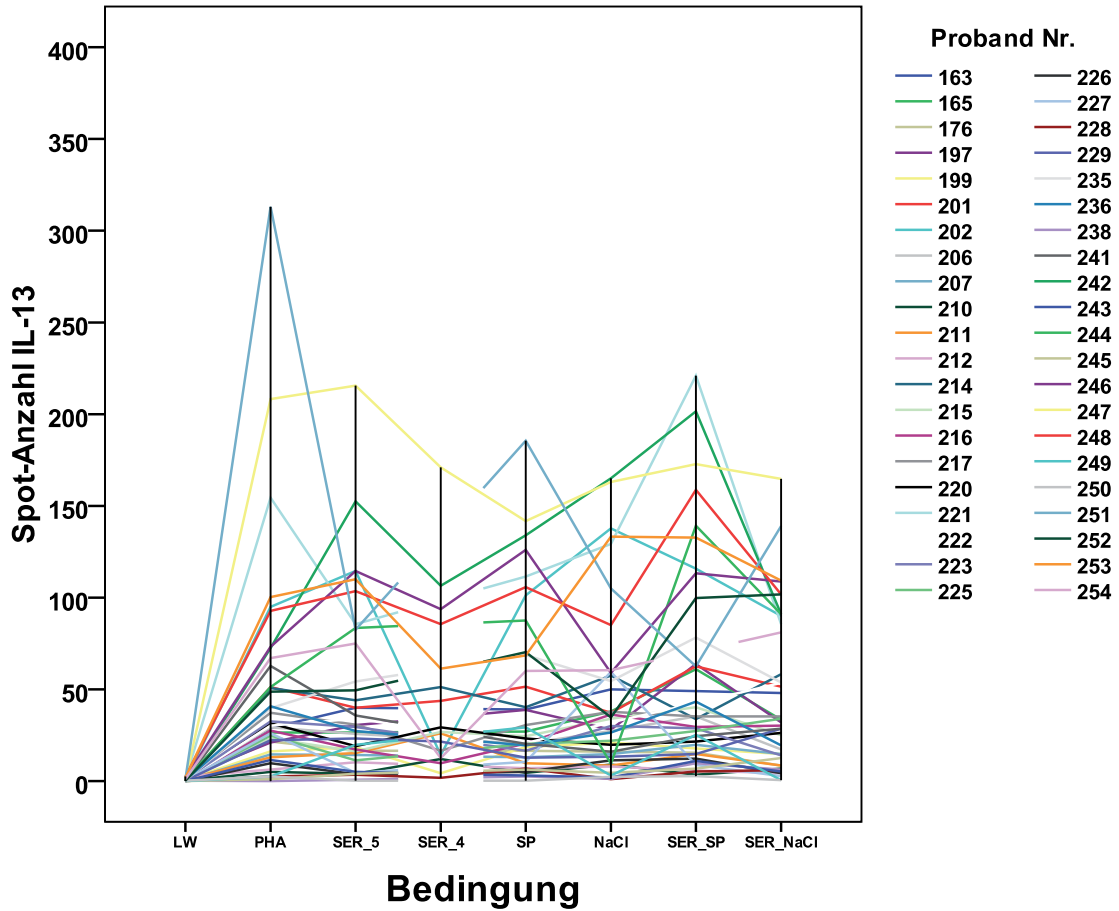
Tabelle 3.4.5.3: Deskriptive Statistik IL-13, 25 h Inkubationszeit, Spotanzahl und Flächenwerte

Variablen	N	MW		SD		Min.		Max.		
		Spots	Fläche	Spots	Fläche	Spots	Fläche	Spots	Fläche	
LW	18	18	0,5	$0,10 \times 10^5$	0,6	$0,13 \times 10^5$	0,0	0,00	2,5	$0,38 \times 10^5$
PHA	18	18	55,7	$1,23 \times 10^5$	72,5	$1,58 \times 10^5$	0,0	0,00	312,0	$6,92 \times 10^5$
SER_5	17	17	75,8	$1,64 \times 10^5$	80,4	$1,77 \times 10^5$	0,3	106,50	269,5	$6,04 \times 10^5$
SER_4	4	4	35,4	$0,87 \times 10^5$	25,5	$0,60 \times 10^5$	18,0	31 370,25	73,3	$1,72 \times 10^5$
SP	17	17	60,7	$1,32 \times 10^5$	61,1	$1,31 \times 10^5$	0,0	0,00	242,0	$5,14 \times 10^5$
NaCl	18	18	49,0	$1,09 \times 10^5$	62,6	$1,62 \times 10^5$	0,5	221,25	266,3	$7,14 \times 10^5$
SER_SP	18	18	74,3	$1,58 \times 10^5$	84,5	$1,89 \times 10^5$	0,0	0,00	342,0	$7,62 \times 10^5$
SER_NaCl	17	17	67,1	$1,44 \times 10^5$	70,5	$1,60 \times 10^5$	0,0	0,00	263,5	$6,30 \times 10^5$

N: Fallzahl; SD: Standardabweichung; LW: Leerwert; PHA: Grundstimulation mit nur PHA; SER_5: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA; SER_4: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-4}$ mol/l + PHA; SP: Stimulation mit Substanz P mit $c = 10^{-10}$ mol/l + PHA; NaCl: Lösemittel von Substanz P + PHA; SER_NaCl: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA + Lösemittel von SP; SER_SP: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA + Substanz P mit $c = 10^{-10}$ mol/l.

Bei der längeren Inkubationszeit ergibt sich ein etwas anderes Bild als für die kürzere Inkubationszeit und die anderen Zytokine. So zeigt die alleinige Stimulation mit Serotonin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l diesmal die höchsten Werte und die Kombination aus Serotonin und SP demgegenüber etwas

Abbildung 3.4.5.1: Liniendiagramm für IL-13



Unterbrochene Linien bei Bedingung SER_4 (Serotonin in einer Konzentration von 10^{-4} mol/l) sind durch eine geringere Fallzahl bei dieser Bedingung zu erklären.

Abbildung 3.4.5.2: Mittelwertverlauf für IL-13, Spotanzahl

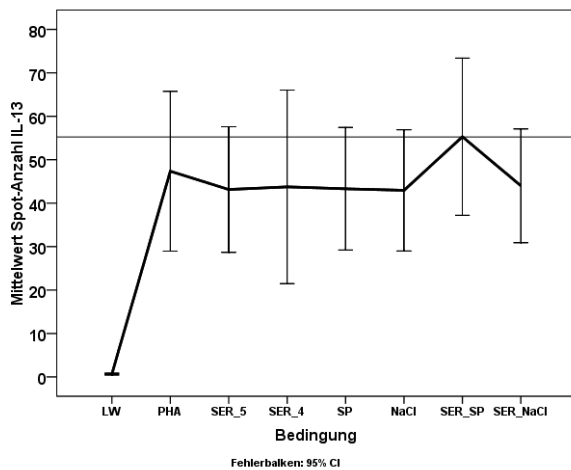
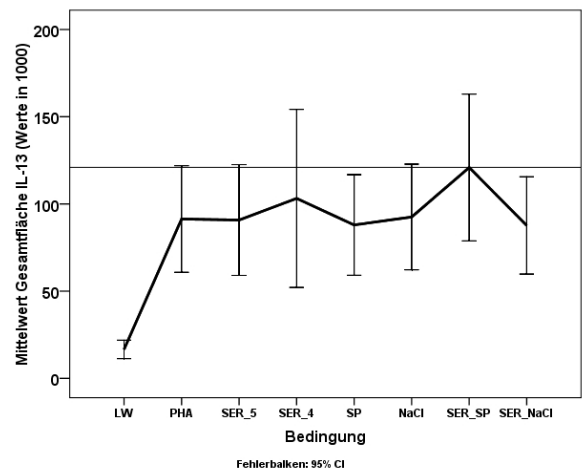


Abbildung 3.4.5.3: Mittelwertverlauf für IL-13, Flächenwerte



geringere Werte. Die Stimulation mit der höheren Serotoninkonzentration von 10^{-4} mol/l weist wieder die niedrigsten Werte auf. Die Ergebnisse der Wilcoxon-Tests sind in Tabelle 3.4.5.4 auf der nächsten Seite zu finden.

Für die Daten der längeren Inkubationszeit zeigen sich nur die Leerwerte signifikant unterschiedlich

Tabelle 3.4.5.4: Ergebnisse IL-13, 25 h Inkubationszeit

Nr.	Var. 1	Var. 2	Z-Wert		p-Wert		Aussage	
			Spots	Fläche	Spots	Fläche	Spots	Fläche
1	LW	PHA	-3,636	-3,506	0,000 276	0,000 455	Sign.	Sign.
2	PHA	SER_5	-1,894	-1,207	0,058 000	0,227 000	ns	ns
3	PHA	SER_4	-1,461	0,000	0,144 000	1,000 000	ns	ns
4	PHA	SP	-1,022	-1,189	0,307 000	0,234 000	ns	ns
5	PHA	NaCl	-0,544	-0,327	0,586 000	0,744 000	ns	ns
6	PHA	SER_SP	-2,533	-1,823	0,011 000	0,068 000	ns	ns
7	PHA	SER_NaCl	-2,224	-1,758	0,026 000	0,079 000	ns	ns
8	SER_5	SER_4	-1,461	-1,095	0,144 000	0,273 000	ns	ns
9	SER_5	SP	-1,655	-1,302	0,098 000	0,193 000	ns	ns
10	SER_5	NaCl	-1,965	-1,207	0,049 000	0,227 000	ns	ns
11	SER_5	SER_SP	-0,189	-0,734	0,850 000	0,463 000	ns	ns
12	SER_5	SER_NaCl	-0,848	-0,118	0,397 000	0,906 000	ns	ns
13	SP	NaCl	-0,118	-0,450	0,906 000	0,653 000	ns	ns
14	SP	SER_SP	-1,759	-1,189	0,079 000	0,234 000	ns	ns
15	SP	SER_NaCl	-1,108	-1,086	0,268 000	0,278 000	ns	ns
16	NaCl	SER_SP	-2,592	-2,286	0,009 540	0,022 000	Grenzw. sign.	ns
17	NaCl	SER_NaCl	-1,862	-1,254	0,063 000	0,210 000	ns	ns
18	SER_SP	SER_NaCl	-1,810	-1,448	0,070 000	0,148 000	ns	ns

LW: Leerwert; PHA: Grundstimulation mit nur PHA; SER_5: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA; SER_4: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-4}$ mol/l + PHA; SP: Stimulation mit Substanz P mit $c = 10^{-10}$ mol/l + PHA; NaCl: Lösemittel von Substanz P + PHA; SER_NaCl: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA + Lösemittel von SP; SER_SP: Stimulation mit Serotonin mit $c = 10^{-5}$ mol/l + PHA + Substanz P mit $c = 10^{-10}$ mol/l; ns: nicht signifikant, sign.: signifikant nach Korrektur für multiples Testen, grenzw. sign.: $p < 0.01$, aber vorgegebenes Signifikanzniveau für multiples Testen nicht ganz erreicht.

gegenüber der Stimulation mit PHA (Nr. 1). Alle anderen Tests sind nicht signifikant. Nur die Kombination aus Serotonin und Substanz P gegenüber der Zugabe von Kochsalz-Lösung ist grenzwertig signifikant. Dass sich keine weiteren signifikanten Unterschiede zeigen, liegt vermutlich an der sehr geringen Fallzahl von maximal 18 Probanden.

Aus dem Liniendiagramm aus Abb. 3.4.5.4 auf der nächsten Seite gehen wieder die deutlichen interindividuellen Schwankungen hervor. Man kann auch den Anstieg für die Kombination aus Serotonin und Substanz P gut erkennen. Ebenfalls zeigt sich, dass ein insgesamt höheres Spotproduktionsniveau im Vergleich zur geringeren Inkubationszeit herrscht (siehe auch Abb. 3.4.5.1 auf der vorherigen Seite).

Der Verlauf der Mittelwerte aus den Abb. 3.4.5.5 und 3.4.5.6 auf der nächsten Seite lässt vermuten, dass eine geringere Konzentration von Serotonin eher einen stimulatorischen Effekt auf die Produktion von IL-13 ausübt. Auf Grund der geringen Fallzahl sind solche Überlegungen allerdings mit Vorsicht zu interpretieren.

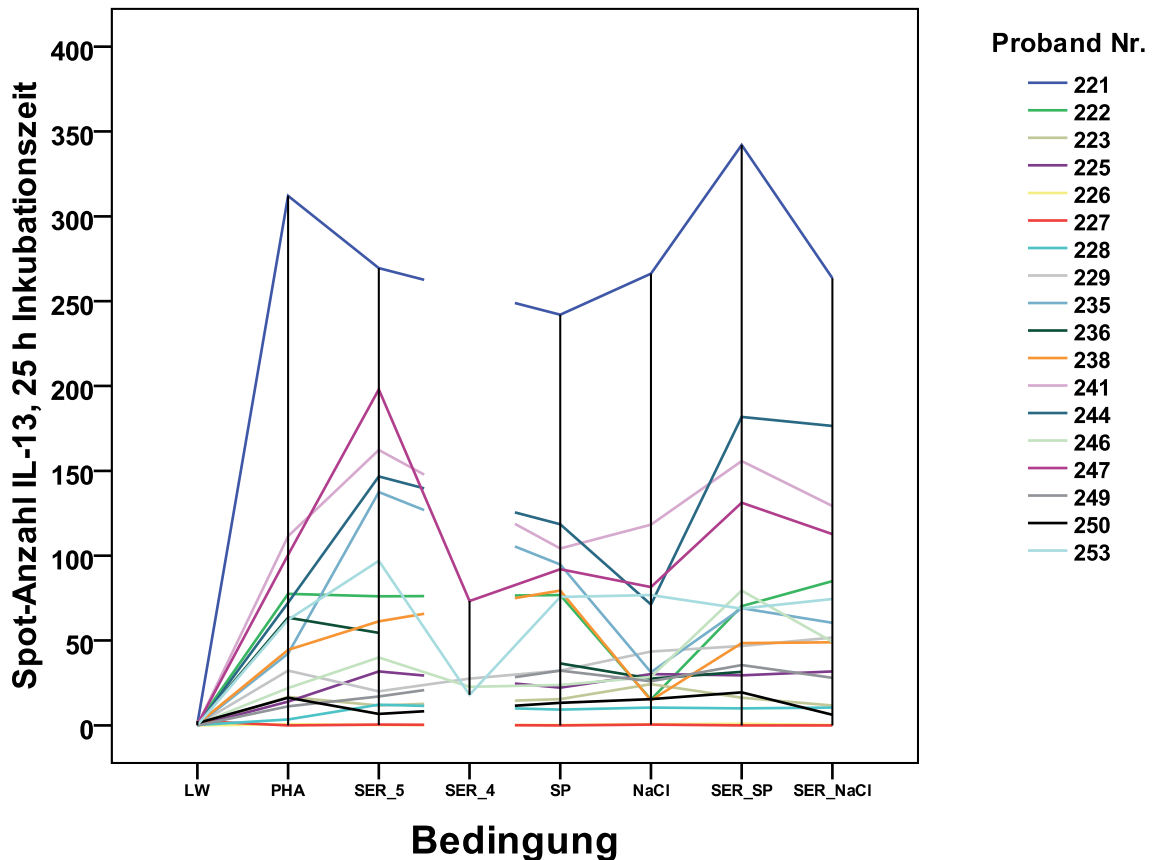
Für die längere Inkubationszeit bei IL-13 ergeben sich ähnliche prozentuale Veränderungen wie bei 15 h Inkubationszeit. Die alleinige Stimulation mit Serotonin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l steigert in diesem Fall die Spot-Produktion im Mittel um 54,1%, während Serotonin in einer Konzentration von 10^{-4} mol/l die Produktion um 27,42% vermindert. Substanz P führt zu einer Steigerung von 36,0% und die Kombination aus Serotonin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l und SP von 66,1%.

Bei den Flächenwerte ergeben sich Steigerungen von 53,8% für Serotonin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l, 59,7% für SP und 74,1% für die Kombination aus beiden.

3.5 Einfluss verschiedener Faktoren auf die interindividuellen Unterschiede

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass es erhebliche interindividuelle Unterschiede im Niveau der Zytokin-Produktion gibt. In Abb. 3.5.0.7 auf Seite 66 ist ein Beispiel abgebildet, das in den Spalten 1-6 die Spot-

Abbildung 3.4.5.4: Liniendiagramm für IL-13, 25 h Inkubationszeit



Unterbrochene Linien bei Bedingung SER_4 (Serotonin in einer Konzentration von 10^{-4} mol/l) sind durch eine geringere Fallzahl bei dieser Bedingung zu erklären.

Abbildung 3.4.5.5: Mittelwertverlauf für IL-13, Spotanzahl, 25 h Inkubationszeit

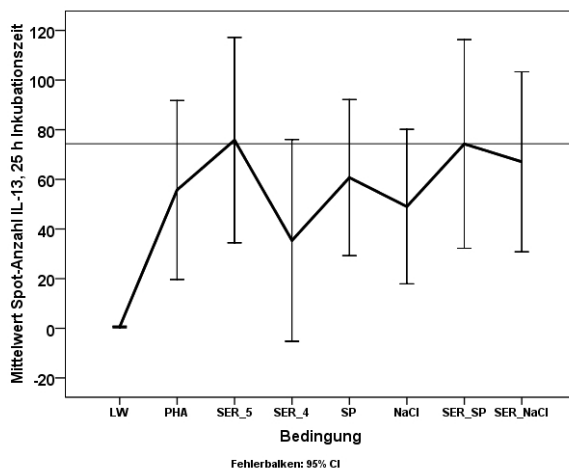
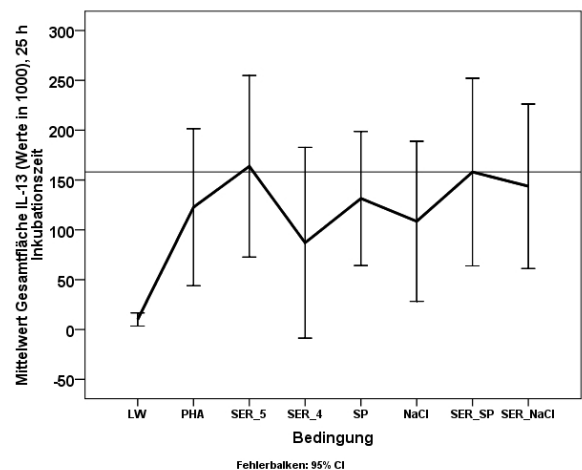


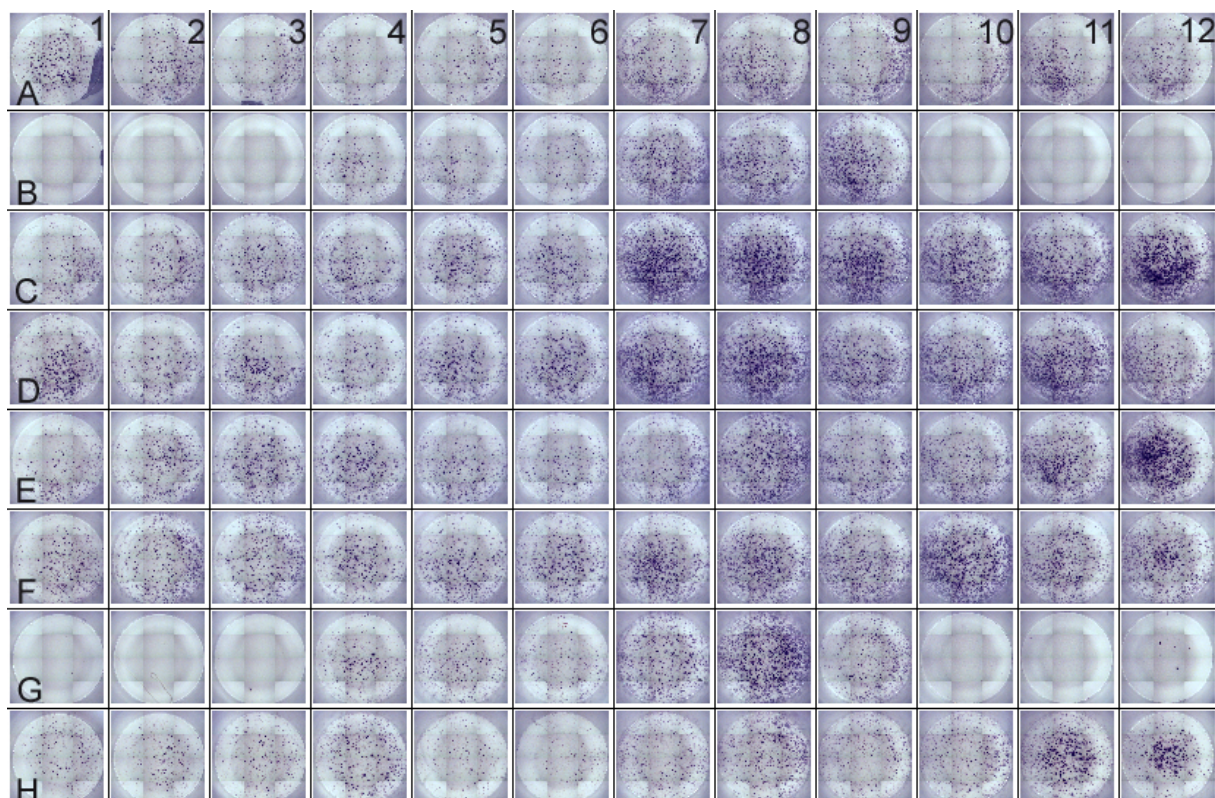
Abbildung 3.4.5.6: Mittelwertverlauf für IL-13, Flächenwerte, 25 h Inkubationszeit



Produktion von beiden Zeitpunkten (T1: Zeilen A-D und T2: Zeilen E-H) von einem Probanden und in den Spalten 7-12 eines anderen Probanden zeigt. Die Unterschiede in der Zytokinproduktion sind klar erkennbar. Man sieht auch, dass zwischen beiden Blutabnahmezeitpunkten, trotz leichter Schwankungen, eine hohe intraindividuelle Korrelation besteht.

Als mögliche Einflussfaktoren wurden soziodemographische und genetische Faktoren untersucht.

Abbildung 3.5.0.7: Beispiel-Platte für interindividuelle Unterschiede (IFN- γ)



3.5.1 Zusammenhang mit soziodemographischen Daten

Bereits aus den allgemeinen linearen Modellen aus Punkt 3.3.2 auf Seite 44 wurde ersichtlich, dass sowohl das Geschlecht als auch das Alter einen Einfluss auf die Varianz der Werte haben, vor allem bei den Interleukinen, weniger bei IFN- γ .

3.5.1.1 Zusammenhang mit Geschlecht Die Beispiel-ELISpot-Platte von Abb. 3.5.0.7 zeigt auf der rechten Seite (Spalten 7-12) die Ergebnisse der IFN- γ -Spot-Produktion für einen männlichen Probanden und auf der linken Seite (Spalte 1-6) für eine weibliche Probandin. Die Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtern lassen sich an dieser Platte beispielhaft zeigen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse nicht-parametrischer Tests (Mann-Whitney-U) sowohl für die Spotanzahl als auch die Flächenwerte für alle drei Zytokine angegeben. Für IFN- γ wurden auch T-Tests gerechnet, da prinzipiell eine Normalverteilung der Werte gegeben war.

Tabelle 3.5.1.1: IFN- γ : Deskriptive Statistik und Mann-Whitney-U-Tests

	N				MW				Mann-Whitney-U-Test			
	Spots		Fläche		Spots		Fläche		Spots		Fläche	
	m	w	m	w	m	w	m	w	Z	p	Z	p
LW	27	15	24	14	2,2	0,9	$0,02 \times 10^6$	$0,100 \times 10^6$	-0,780	0,435	-0,030	0,976
PHA	27	15	24	14	684,4	599,7	$1,49 \times 10^6$	$1,120 \times 10^6$	-1,011	0,312	-1,574	0,116
SER_5	27	15	24	14	671,4	566,8	$1,35 \times 10^6$	$0,970 \times 10^6$	-1,168	0,243	-1,785	0,074
SER_4	22	10	20	10	593,1	535,8	$1,32 \times 10^6$	$0,890 \times 10^6$	-0,772	0,440	-1,848	0,065
SP	27	15	24	14	681,2	592,8	$1,41 \times 10^6$	$1,010 \times 10^6$	-1,168	0,243	-1,725	0,085
NaCl	27	15	24	13	655,6	611,8	$1,38 \times 10^6$	$1,120 \times 10^6$	-0,591	0,555	-1,050	0,294
SER_SP	26	14	24	14	712,1	666,6	$1,47 \times 10^6$	$1,180 \times 10^6$	-0,879	0,379	-1,301	0,193
SER_NaCl	26	14	24	14	704,7	580,9	$1,40 \times 10^6$	$0,990 \times 10^6$	-1,333	0,183	-1,876	0,061

N: Fallzahl; MW: Mittelwert; m: männliche Probanden; w: weibliche Probandinnen

Aus Tabelle 3.5.1.1 auf der vorherigen Seite geht hervor, dass Männer nominell höhere Spot-Zahlen als auch höhere Flächenwerte erreichen. Die Unterschiede sind insgesamt allerdings nicht statistisch signifikant, bei den Flächenwerten für einige Bedingungen grenzwertig signifikant.

Auch bei der IL-4-Produktion erreichen Männer die höheren Werte. Die Ergebnisse bei der Spot-Produktion sind für einige Bedingungen grenzwertig signifikant, bei den Flächenwerten nicht signifikant (siehe Tabelle 3.5.1.2). Bei der IL-13-Produktion erreichen die Unterschiede zwischen Männern und Frauen für einige Bedingungen sowohl für die Spot-Zahlen als auch die Flächenwerte statistisch signifikante Ergebnisse (siehe Tabelle 3.5.1.3 auf der nächsten Seite).

Nachfolgend sind in den Abb. 3.5.1.1 und 3.5.1.2 die prinzipiellen Unterschiede zwischen den Geschlechtern durch Boxplots und den Mittelwertverlauf für die Spots anhand der IL-4-Produktion dargestellt. Man kann aus dem Mittelwertverlauf gut erkennen, dass das grundsätzliche Muster durch die einzelnen Stimulationsbedingungen erhalten bleibt und bei beiden Geschlechtern durch die Kombination aus Substanz P und Serotonin die höchsten Werte erreicht werden. Dies ist auch bei IFN- γ der Fall (Abbildungen nicht dargestellt).

Tabelle 3.5.1.2: IL-4: Deskriptive Statistik und Mann-Whitney-U-Tests

	N				MW				Mann-Whitney-U-Test			
	Spots		Fläche		Spots		Fläche		Spots		Fläche	
	m	w	m	w	m	w	m	w	Z	p	Z	p
LW	27	15	24	13	0,5	0,6	$0,14 \times 10^5$	$0,360 \times 10^5$	-0,723	0,470	-1,052	0,293
PHA	27	15	24	14	251,8	165,2	$3,88 \times 10^5$	$2,530 \times 10^5$	-1,916	0,055	-1,574	0,116
SER_5	27	15	24	14	238,0	154,3	$3,63 \times 10^5$	$2,240 \times 10^5$	-1,824	0,068	-1,543	0,123
SER_4	19	8	19	10	219,4	140,7	$3,43 \times 10^5$	$2,100 \times 10^5$	-1,275	0,202	-0,918	0,359
SP	27	15	24	14	243,8	175,3	$3,56 \times 10^5$	$2,490 \times 10^5$	-1,588	0,112	-1,574	0,116
NaCl	27	15	24	14	238,7	172,2	$3,87 \times 10^5$	$2,480 \times 10^5$	-1,194	0,232	-1,029	0,304
SER_SP	27	15	24	14	278,8	192,3	$4,34 \times 10^5$	$3,070 \times 10^5$	-1,719	0,086	-1,332	0,183
SER_NaCl	27	15	24	14	252,4	174,6	$3,73 \times 10^5$	$2,490 \times 10^5$	-1,733	0,083	-1,634	0,102

N: Fallzahl; MW: Mittelwert; m: männliche Probanden; w: weibliche Probandinnen

Abbildung 3.5.1.1: Geschlechtsdifferenzen für IL-4, Spotanzahl

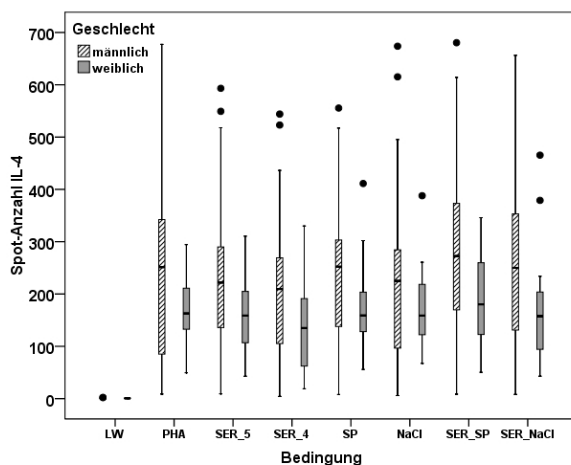
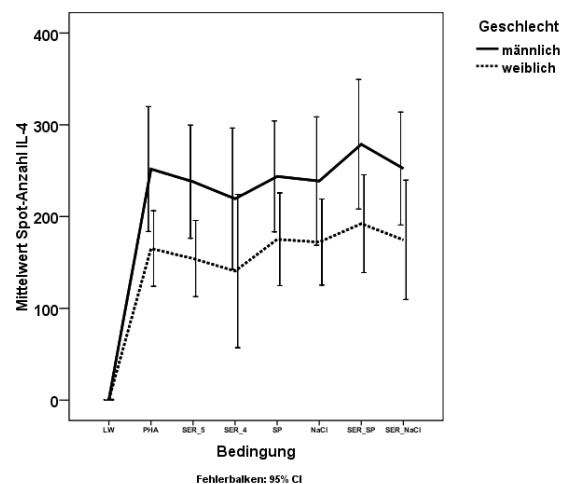


Abbildung 3.5.1.2: Geschlechtsdifferenzen für IL-4, Spotanzahl, Mittelwertverlauf



Bei der längeren Inkubationszeit von IL-13 ergaben sich zwischen den Männern und Frauen bei der Grundbedingung mit PHA (Mann-Whitney-U; $Z = -2,549$; $p = 0,011$) sowie dem Leerwert und dem Zielparame- ter SER_SP (Mann-Whitney-U; $Z = -2,018$; $p = 0,044$) signifikante Unterschiede. Die übrigen Parameter verfehlten das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ nur knapp. Bei den Flächenwerte ergaben

Tabelle 3.5.1.3: IL-13: Deskriptive Statistik und Mann-Whitney-U-Tests

	N				MW				Mann-Whitney-U-Test			
	Spots		Fläche		Spots		Fläche		Spots		Fläche	
	m	w	m	w	m	w	m	w	Z	p	Z	p
LW	27	15	24	14	0,7	0,7	$0,17 \times 10^5$	$0,160 \times 10^5$	-0,027	0,979	-0,151	0,880
PHA	27	15	24	14	53,0	37,2	$1,17 \times 10^5$	$0,480 \times 10^5$	-2,507	0,012	-2,330	0,020
SER_5	27	15	24	14	55,3	21,4	$1,15 \times 10^5$	$0,490 \times 10^5$	-2,481	0,013	-1,967	0,049
SER_4	13	5	12	6	54,2	16,6	$1,24 \times 10^5$	$0,620 \times 10^5$	-1,626	0,104	-0,749	0,454
SP	27	15	24	14	51,1	29,3	$1,12 \times 10^5$	$0,460 \times 10^5$	-1,575	0,115	-1,967	0,049
NaCl	27	15	24	14	52,5	25,7	$1,15 \times 10^5$	$0,530 \times 10^5$	-1,785	0,074	-1,604	0,109
SER_SP	26	15	24	14	71,3	27,5	$1,55 \times 10^5$	$0,620 \times 10^5$	-1,949	0,051	-1,483	0,138
SER_NaCl	27	15	24	14	54,2	25,5	$1,15 \times 10^5$	$0,410 \times 10^5$	-2,192	0,028	-2,300	0,021

N: Fallzahl; MW: Mittelwert; m: männliche Probanden; w: weibliche Probandinnen

sich für die Grundbedingung mit PHA (Mann-Whitney-U; $Z = -2,124$; $p = 0,034$) und SER_5 (Mann-Whitney-U; $Z = -2,038$; $p = 0,042$) signifikante Ergebnisse. Auch hier wurde bei den anderen Parametern das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ nur knapp verfehlt.

Bei den Flächenwerten bestehen prinzipiell die gleichen Zusammenhänge bei allen drei Zytokinen. Beispielhaft sind die Graphiken für die Flächenwerte von IL-13 bei 15 h Inkubationszeit abgebildet (siehe Abb. 3.5.1.3 und 3.5.1.4).

Abbildung 3.5.1.3: Geschlechtsdifferenzen für IL-13, Flächenwerte

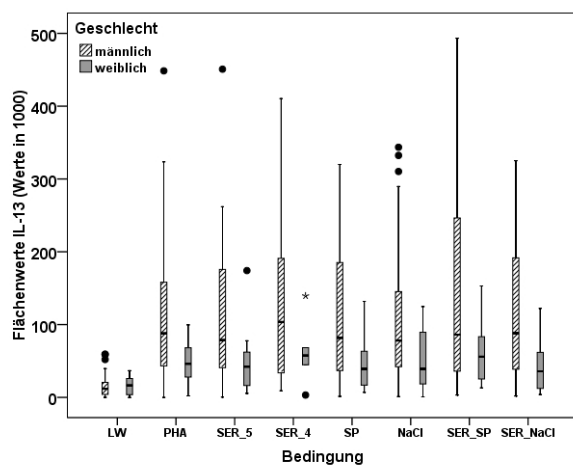
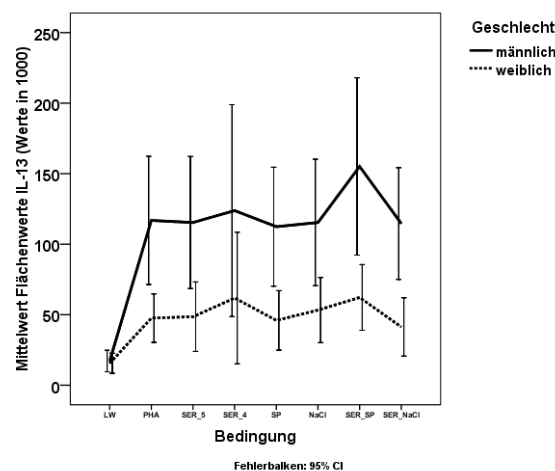


Abbildung 3.5.1.4: Geschlechtsdifferenzen für IL-13, Flächenwerte, Mittelwertverlauf



Zusammenfassend zeigte sich, dass ein Unterschied zwischen den Werten von Frauen und Männern zu bestehen scheint und das Reaktionsmuster dabei erhalten bleibt. Die statistischen Tests erreichten allerdings für die meisten Bedingungen keine signifikanten Ergebnisse, was möglicherweise durch eine nicht ausreichende Power für diese Fragestellung erklärt werden kann. Die Boxplot-Diagramme zeigen daneben, dass sich die Varianz der Werte, vor allem für die Frauen deutlich durch die Aufteilung in die Geschlechter verringert. Allerdings ist die Varianz bei den Männern weiterhin relativ groß, sodass vermutlich weitere Faktoren einen Einfluss auf die interindividuellen Unterschiede nehmen.

Um die prozentualen Unterschiede zwischen den Geschlechtern abzubilden, wurden neue Variablen gebildet. Der Mittelwert für alle Bedingungen - bis auf die Leerwerte und die Bedingung Serotonin in einer Konzentration von 10^{-4} mol/l - wurde berechnet. Für diese neuen Variablen wurden wieder nicht-parametrische Tests mit Geschlecht als Trennfaktor gerechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.5.1.4 auf der nächsten Seite zusammenfassend wiedergegeben.

Wenn man das Gesamtniveau der Spot-Produktion, ausgedrückt in den neuen Variablen, betrachtet, so

Tabelle 3.5.1.4: Zusammenfassung Geschlechtsunterschiede für neu gebildete Variablen

	MW			Abweichung vom MW			Statistik	
	gesamt	m	w	m	w	Differenz	Z	p
Sp. IFN- γ	661,48	692,03	604,74	104,6%	91,4%	13,2%	-1,163	0,245
Sp. IL-4	222,62	250,57	172,29	112,5%	77,4%	35,1%	-1,693	0,090
Sp. IL-13	45,51	55,74	27,78	122,5%	61,0%	61,5%	-2,111	0,035
Sp. IL-13, 25 h	64,32	79,39	15,37	123,4%	23,9%	99,5%	-2,038	0,042
Fl. IFN- γ	$1,30 \times 10^6$	$1,42 \times 10^6$	$1,10 \times 10^6$	108,5%	84,5%	24,0%	-1,336	0,181
Fl. IL-4	$3,36 \times 10^5$	$3,84 \times 10^5$	$2,55 \times 10^5$	114,1%	75,8%	38,3%	-1,664	0,096
Fl. IL-13	$0,95 \times 10^5$	$1,22 \times 10^5$	$0,50 \times 10^5$	127,7%	52,3%	75,4%	-2,209	0,027
Fl. IL-13, 25 h	$1,40 \times 10^5$	$1,72 \times 10^5$	$0,34 \times 10^5$	123,3%	24,4%	98,9%	-2,151	0,031

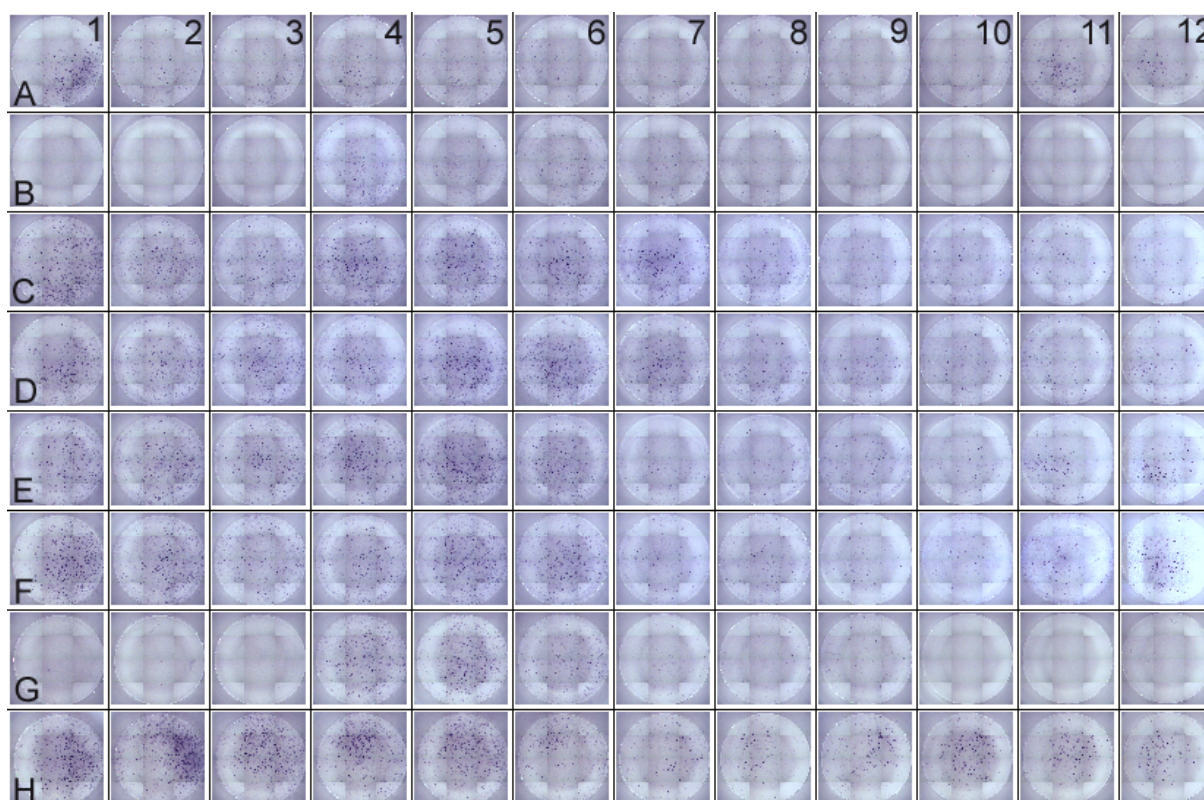
MW: Mittelwert; m: männliche Probanden; w: weibliche Probandinnen; Sp.: neue Variable "Spot-Produktionsniveau"; Fl.: neue Variable "Gesamtflächenwert"

werden für IL-13 zu beiden Inkubationszeiten die Geschlechtsunterschiede statistisch signifikant. Für IL-4 besteht eine Tendenz zur Signifikanz und für IFN- γ zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die prozentualen Abweichungen vom Mittelwert schwanken dabei stark zwischen 4,6% (IFN- γ ; Männer) bis 76,1% (IL-13, 25 h; Frauen). Die Prozentpunkte zwischen den beiden Geschlechtern streuen dabei von 13,2% bis 99,5%.

Diese Ergebnisse stehen im wesentlichen im Einklang mit den Ergebnissen aus den linearen Modellen (siehe Tabelle 3.3.2.1 auf Seite 45).

3.5.1.2 Zusammenhang mit Alter Wie aus den allgemeinen linearen Modellen hervorgeht, scheint auch ein Alterseffekt zu bestehen. Nominell zeigen Probanden mit höherem Alter eine stärkere Zytokinantwort. In Abb. 3.5.1.5 ist eine Platte zu sehen, auf deren linken Seite (Spalten 1-6) die Ergebnisse für einen 60-Jahre alten Probanden und auf der rechten Seite (Spalten 7-12) für einen 24-jährigen Probanden abgebildet sind.

Abbildung 3.5.1.5: Beispiel-Platte für Altersunterschiede (IL-4)



Man sieht, dass der ältere Proband im Vergleich zum jüngeren ein deutlich höheres Spot-Produktionsniveau besitzt. Diese Unterschiede waren für die einzelnen Bedingungen bei den jeweiligen Zytokine allerdings nicht statistisch signifikant; auch nicht für die Flächenwerte. Die Tabelle 3.5.1.5 gibt wieder einen Gesamtüberblick der neu gebildeten Variablen in Analogie zu den Geschlechtsunterschieden. Als Trennwert für das Alter wurde ein Mediansplit verwendet. Der Median des Alters lag bei 29.

Tabelle 3.5.1.5: Zusammenfassung Altersunterschiede für neu gebildete Variablen

	MW			Abweichung vom MW			Statistik	
	gesamt	>29 J.	<30 J.	>29 J.	<30 J.	Differenz	Z	p
Sp. IFN- γ	661,48	695,90	630,34	105,2%	95,3%	9,9%	-0,718	0,473
Sp. IL-4	222,62	256,43	191,87	115,2%	86,2%	29,0%	-1,158	0,247
Sp. IL-13	45,51	57,42	35,23	126,2%	77,4%	48,8%	-1,856	0,063
Sp. IL-13, 25 h	64,32	90,11	46,28	140,1%	71,9%	68,2%	-0,781	0,435
Fl. IFN- γ	$1,30 \times 10^6$	$1,29 \times 10^6$	$1,32 \times 10^6$	98,6%	101,1%	2,5%	-0,092	0,927
Fl. IL-4	$3,36 \times 10^5$	$3,89 \times 10^5$	$2,94 \times 10^5$	115,6%	87,4%	28,2%	-0,866	0,386
Fl. IL-13	$0,95 \times 10^5$	$1,09 \times 10^5$	$0,84 \times 10^5$	114,2%	88,6%	25,6%	-1,130	0,258
Fl. IL-13, 25 h	$1,40 \times 10^5$	$1,92 \times 10^5$	$1,03 \times 10^5$	137,6%	73,6%	64,0%	-0,683	0,495

MW: Mittelwert; Sp.: neue Variable "Spot-Produktionsniveau"; Fl.: neue Variable "Gesamtflächenwert"

Obleich für das Gesamtniveau der Spot-Produktion teilweise wieder deutliche Unterschiede zwischen den beiden Altersgruppen bestehen, sind diese nicht statistisch signifikant. Die prozentualen Abweichungen vom Mittelwert schwanken wieder stark zwischen 1,1% (Fläche IFN- γ ; Alter < 30 Jahre) und 40,1% (Spots IL-13, 25 h; Alter > 29 Jahre). Die Prozentpunkte zwischen den beiden Altersgruppen streuen von 2,5% bis 68,2 Prozentpunkte. Zur Veranschaulichung werden nur die Boxplot-Graphiken gezeigt (siehe Abb. 3.5.1.6 bis 3.5.1.9 auf der nächsten Seite).

Abbildung 3.5.1.6: Altersdifferenzen für IFN- γ , Spotanzahl

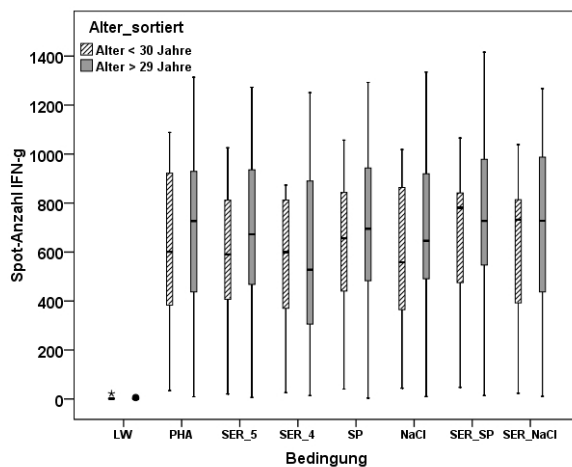
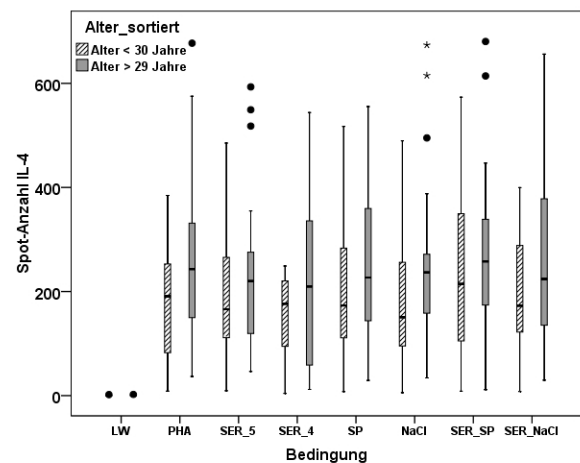


Abbildung 3.5.1.7: Altersdifferenzen für IL-4, Spotanzahl



Man sieht in den Graphiken, dass Probanden mit einem höheren Alter eine stärkere Zytokinantwort zeigen. Deutlicher ist der Unterschied bei den Interleukinen ausgeprägt. Bei der längeren Inkubationszeit für IL-13 sind die Effekte etwas geringer (Daten nicht gezeigt). Für die Flächenwerte ergeben sich insgesamt ähnliche Zusammenhänge. Berechnet man Korrelationen nach Pearson zwischen den einzelnen Zytokinproduktionsniveaus und dem Alter, so ergeben sich signifikante Zusammenhänge für die beiden Interleukine, nicht aber für IFN- γ . Die Korrelationen nach Spearman sind allerdings nur für die Spot-Werte bei IL-13 und der Inkubationszeit von 15 h signifikant (siehe Tabelle 3.5.1.6 auf der nächsten Seite).

Die stärksten Zusammenhänge zeigen die Werte für IL-13 bei einer längeren Inkubationszeit, wobei die

Abbildung 3.5.1.8: Altersdifferenzen für IL-13, Spotanzahl

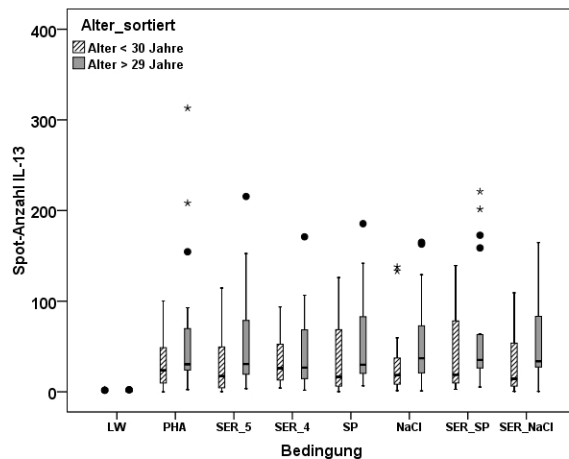


Abbildung 3.5.1.9: Altersdifferenzen für IL-4, Flächenwerte

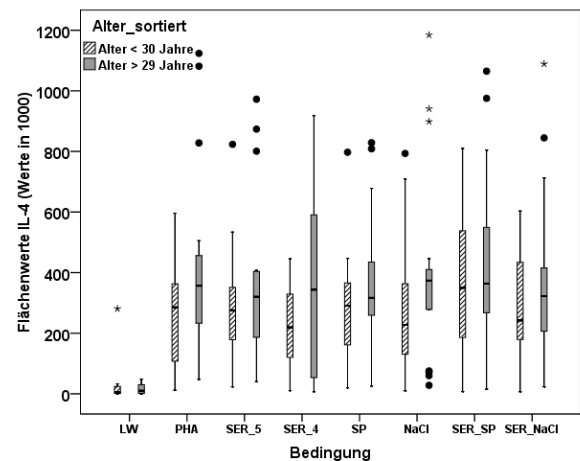


Tabelle 3.5.1.6: Korrelation zwischen Alter und Zytokinproduktion

Variable	Korrelation nach Pearson	p (Pearson)	Spearman-Rho	p (Spearman)
Spots IFN- γ	0,178	0,273	0,146	0,369
Spots IL-4	0,346	0,025	0,215	0,171
Spots IL-13	0,337	0,031	0,334	0,033
Spots IL-13, 25 h	0,761	<0,001	0,252	0,329
Fläche IFN- γ	0,096	0,572	0,074	0,663
Fläche IL-4	0,322	0,049	0,149	0,372
Fläche IL-13	0,271	0,100	0,218	0,189
Fläche IL-13, 25 h	0,772	<0,001	0,256	0,321

nicht-parametrischen Korrelationen nicht signifikant sind. Zur Veranschaulichung sind die entsprechenden Punktreudiagramme abgebildet (siehe Abb. 3.5.1.10 und 3.5.1.11). Man kann nach diesen Diagrammen vermuten, dass unter Umständen Ausreißer für die Zusammenhänge verantwortlich sein könnten oder sich ein Zusammenhang erst nach längerer Inkubationszeit abbildet.

Abbildung 3.5.1.10: Korrelation von Alter und Spotanzahl für IL-13, 15 h Inkubationszeit

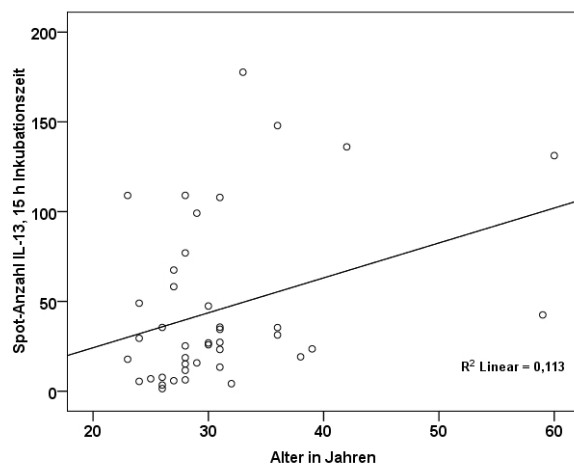
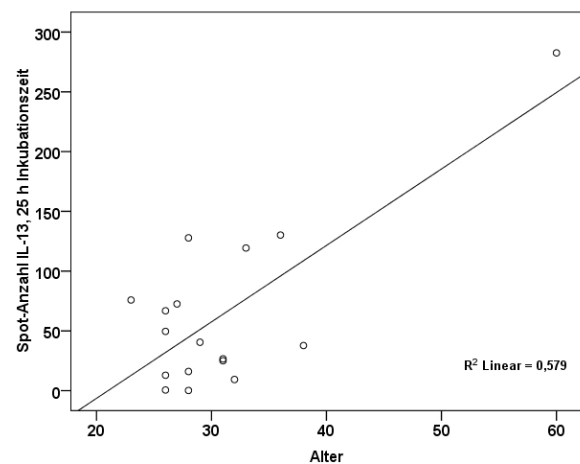


Abbildung 3.5.1.11: Korrelation von Alter und Spotanzahl für IL-13, 25 h Inkubationszeit



Insgesamt scheint also ein höheres Alter mit einer stärkeren Zytokinproduktion assoziiert zu sein. Wie bei den Geschlechtszusammenhängen bleibt das jeweilige Reaktionsmuster gleich (Graphiken nicht abgebildet). Der Einfluss des Alters zeigt sich wieder bei den Interleukinen stärker ausgeprägt.

3.5.1.3 Zusammenhang mit Raucherstatus Der Nikotinkonsum wurde von 35 der 42 Probanden erfasst. Davon waren 16 Raucher und 19 Nicht-Raucher. Mögliche Unterschiede in der Zytokinproduktion zwischen Rauchern und Nicht-Rauchern wurden mit einem Mann-Whitney-U Test für zwei unabhängige Stichproben untersucht. Als Zielvariablen wurde das Zytokinproduktionsniveau für die Spot- und die Flächenwerte verwendet. Es ergaben sich insgesamt keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen für keines der Zytokine. Ein Einfluss durch den Nikotinkonsum scheint also in dieser Stichprobe nicht zu bestehen.

3.5.2 Zusammenhang mit genetischen Faktoren

Neben den oben genannten soziodemographischen Faktoren ist es auch denkbar, dass die Zytokinproduktion durch genetische Faktoren beeinflusst wird.

3.5.2.1 IFN- γ , CA-Repeat, rs3138557

3.5.2.1.1 Allel-Frequenzen und Haplotypen-Verteilung Von 32 der 42 Probanden der endgültigen Stichprobe waren genetische Daten vorhanden, dabei waren nur die Allele 2, 3, 4 und 5 vertreten. Alle Probanden besaßen mindestens ein Allel 2 oder Allel 3. Allel 3 trat in 50% der Probanden auf und war damit das häufigste Allel. In Tabelle 3.5.2.1 sind die Allel-Frequenzen aus der Stichprobe und von ausgewählten Vergleichspopulationen angegeben. Die Fallzahlen beziehen sich auf die Gesamtzahl aller Allele.

Tabelle 3.5.2.1: Allelfrequenzen für CA-Repeat (rs3138557) der endgültigen Stichprobe

Allel	CA-Repeat	Stichprobe		Manchester ^a		Dänemark ^b		Korea ^c	
		N	%	N	%	N	%	N	%
1	11	0	0	0	0	0	0	1	0,2
2	12	25	39,1	158	48,2	310	47	76	12,2
3	13	32	50	140	42,7	281	42,6	322	51,8
4	14	2	3,1	14	4,3	45	6,8	5	0,8
5	15	5	7,8	16	4,9	24	3,6	201	32,3
6	16	0	0	0	0	0	0	9	1,4
7	17	0	0	0	0	0	0	8	1,3

^aPerrey et al. (1998) [255]; ^bPociot et al. (1997) [260]; ^cPyo et al. (2003) [266]

Dabei fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Allel-Verteilung zwischen den kaukasischen Populationen und der eigenen Stichprobe (UK-Population: $\chi^2 = 2,637$; $df = 3$; $p = 0,451$; dänische Population: $\chi^2 = 5,298$; $df = 3$; $p = 0,151$), jedoch gegenüber der asiatischen Population ($\chi^2 = 44,954$; $df = 6$; $p < 0,001$).

Die Haplotypenverteilung wurde mit den Daten der Studie von Perrey et al. verglichen (siehe Tabelle 3.5.2.2 auf der nächsten Seite), dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Populationen ($\chi^2 = 8,164$; $df = 7$; $p = 0,318$).

Die häufigsten Haplotypen waren die auch als "common haplotypes" [277] bezeichneten Haplotypen 2-2, 2-3 und 3-3. Heterozygote Träger des Allels 2 fanden sich bei 53,1% der Probanden und 34,4% besaßen kein Allel 2.

3.5.2.1.2 Einflüsse auf die IFN- γ Produktion Es wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der Anzahl an CA-Wiederholungen des Mikrosatelliten Markers (CA-Repeat) im Intron 1 (rs3138557) auf dem zweiten Allel und der IFN- γ -Produktion untersucht. Das erste Allel war entweder Allel 2 oder Allel 3. In den Abb. 3.5.2.1 und 3.5.2.2 sind die Boxplots, stratifiziert für die jeweiligen CA-Repeats des zweiten Allels und die häufigsten Haplotypen, dargestellt.

Tabelle 3.5.2.2: Haplotypenverteilung für CA-Repeat (rs3138557)

Haplotyp	Stichprobe n = 32		Perrey et al. n = 164	
	N	%	N	%
2-2	4	12,5	34	20,7
2-3	12	37,5	77	47,0
2-4	1	3,1	5	3,0
2-5	4	12,5	7	4,3
3-3	9	28,1	24	14,6
3-4	1	3,1	7	4,3
3-5	1	3,1	9	5,5
4-4	0	0,0	1	0,6

Abbildung 3.5.2.1: Genetische Unterschiede für IFN- γ , Spotanzahl, CA-repeats des 2. Allels

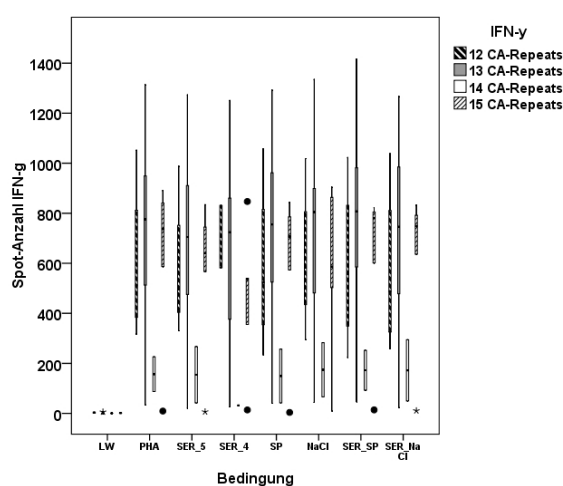
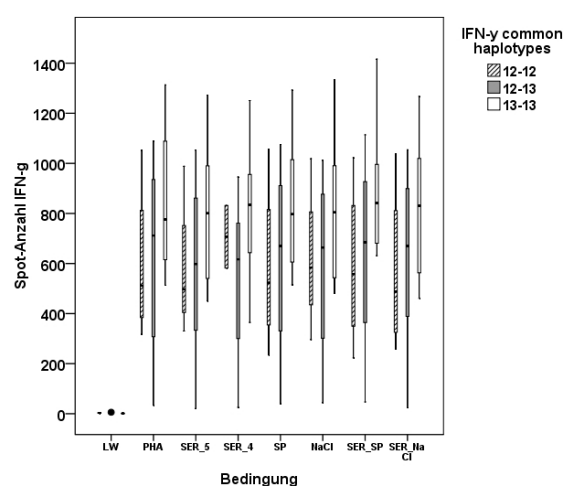


Abbildung 3.5.2.2: Genetische Unterschiede für IFN- γ , Spotanzahl, häufige Haplotypen



In Abb. 3.5.2.1 kann man erkennen, dass Probanden mit 14 CA-repeats auf dem zweiten Allel (Genotypen 2-4 und 3-4) die geringste Zytokinproduktion aufweisen und Probanden mit 13 CA-repeats (Genotypen 2-3 und 3-3) die höchsten Werte haben. Für die häufigsten Haplotypen 12-12, 12-13 und 13-13 ergibt sich ein möglicher Gen-Dosis-Effekt. Die 13-13-Homozygoten haben die höchsten Spot-Zahlen, gefolgt von den 12-13 Heterozygoten und schließlich den 12-12 Homozygoten. In Tabelle 3.5.2.3 sind die Spot-Zahlen für die einzelnen Genotypen wiedergegeben.

Tabelle 3.5.2.3: Deskriptive Statistik für IFN- γ , stratifiziert nach Genotypen

Haplotyp	MW							SD				
	2-2	2-3	2-4	2-5	3-3	3-4	3-5	2-2	2-3	2-4	2-5	3-3
LW	3	1	0	1	1,2	0,5	1,8	1,8	1,6	N/A	0,5	1,2
PHA	598	632	226	582	834,1	87,5	736,8	320,1	350,9	N/A	404,3	284,3
SER_5	578	594	267	557	798,1	42,3	566,8	284,8	340,0	N/A	375,2	273,4
SER_4	707	532	N/A	438	806,8	31,8	539,8	176,4	310,4	N/A	348,3	297,0
SP	585	617	257	585	818,3	42,3	573,8	345,3	343,9	N/A	391,4	
NaCl	596	620	N/A	570	803,6	66,0	586,5	298,1	347,9	N/A	414,8	298,4
SER_SP	591	647	252	605	889,3	93,0	601,3	335,2	347,5	N/A	394,6	248,1
SER_NaCl	568	625	294	596	810,2	50,0	636,0	340,9	324,5	N/A	391,6	276,1

Verglichen mit den Mittelwerten insgesamt (siehe Tabelle 3.4.3.1 auf Seite 55) erreichen homozygote Träger des Allel 2 durch die Grundstimulation mit PHA nur 91,4% der Spot-Zahlen und heterozygote

Träger des Allel 4 (14 CA-Repeats) sogar nur 24,0%. Träger der Genotypen 2-3 und 3-3 erreichen hingegen 109,9% des Ausgangswertes. Bei der Zielbedingung SER_SP sind es bei den homozygoten Allel 2 Trägern 84,8%, bei heterozygoten Allel 4 Trägern 24,7% und bei den Trägern der Genotypen 2-3 und 3-3 107,9%. Das Stimulationsmuster bleibt im Wesentlichen erhalten, wenn auch mit ein paar Abweichungen, die vermutlich auf die geringen Fallzahlen zurückzuführen sind. Ein Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben zeigte signifikante Unterschiede zwischen dem Zytokin-Produktionsniveau von Probanden mit 13 CA-Wiederholungen auf dem zweiten Allel (Genotypen 12-13 und 13-13) gegenüber Probanden mit 14 CA-Wiederholungen (Genotypen 12-14 und 13-14) (PHA: Mann-Whitney-U = 3,000; Z = -1,964; $p = 0,038$; SER_SP: Mann-Whitney-U = 3,000; Z = -1,964; $p = 0,050$). Zwischen den anderen Genotypen sind die Unterschiede nicht statistisch signifikant. Trotz deutlicher nomineller Unterschiede ist die IFN- γ -Produktion der häufigen Haplotypen nicht statistisch signifikant voneinander verschieden. Für die Flächenwerte ergeben sich ähnliche Zusammenhänge. Auch hier unterscheiden sich Probanden mit 13 CA-Wiederholungen von Probanden mit 14 CA-Wiederholungen auf dem zweiten Allel statistisch signifikant voneinander, nicht aber die anderen Genotypen (Daten nicht dargestellt).

Um den Ergebnissen von Pravica et al. nachzugehen, die zeigten, dass Probanden mit 12 CA-Wiederholungen die höchste IFN- γ -Produktion erreichen, wurden die Probanden in Bezug auf das Allel 2 in homozygote 2-2 Träger, heterozygote 2-X Träger und Träger ohne Allel 2 unterschieden. Dabei fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

3.5.2.2 IL-4, C589T, rs2243250

3.5.2.2.1 Allel-Frequenzen und Haplotypen-Verteilung Von 33 Probanden waren genetische Daten zum IL-4 C589T Polymorphismus vorhanden. In Tabelle 3.5.2.4 sind die Genotypen und Allelfrequenzen im Vergleich zu publizierten Daten aus anderen Studien und kaukasischen Vergleichspopulationen der SNP-Datenbank des NIH abgebildet. Im Gegensatz zu diesen beiden Populationen war in der eigenen Stichprobe der C/T-Genotyp der häufigste. Die Genotypverteilung unterschied sich im Vergleich zum Kollektiv des PGA-European-Panels nicht signifikant, jedoch gegenüber allen anderen untersuchten Populationen. Dennoch wich die Allelverteilung der eigenen Studienpopulation nicht vom Hardy-Weinberg-Equilibrium ab ($\chi^2 = 2,1701$; $df = 1$; $p = 0,067$; bei 1000 Iterationen).

Tabelle 3.5.2.4: Genotypen und Allelfrequenzen für IL-4 C589T in verschiedenen Populationen

Referenz	n	Genotypen						Statistik		Allelfrequenz	
		C/C		C/T		T/T		Chi-Quadrat		C	T
		N	%	N	%	N	%	χ^2	p		%
Stichprobe	33	15	45,5	17	51,5	1	3,0	jeweils	$df = 2$	71,2	28,8
HapMap-CEU ^a	116	82	70,7	30	25,9	4	3,4	7,886	0,019	83,6	16,4
PGA-European ^a	46	30	65,2	16	34,8	0	0	3,999	0,135	82,6	17,4
Holland ^b	645	472	73,2	160	24,8	13	2,0	12,094	0,002	85,6	14,4
Spanien ^b	310	206	66,5	93	30,0	11	3,5	6,369	0,041	81,5	18,5
USA ^c	135	96	71	26	19	13	10	14,807	0,001	80,7	19,3

^adbSNP-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) [?]; ^bPaffen et al. (2008) (zwei Populationen) [249]; ^cOlson et al. (2007) (nur kaukasische Kontrollen) [246]

3.5.2.2.2 Einflüsse auf die IL-4 Produktion Da nur ein Proband homozygot für den T/T-Genotyp war, wurden die T-Allel-Träger und die C/C-Homozygoten miteinander verglichen. In den Abb. 3.5.2.3 und 3.5.2.4 auf der nächsten Seite sind die möglichen Unterschiede zwischen den Wildtyp- und den Polymorphismusträgern durch Boxplots dargestellt.

Wie man den Diagrammen entnehmen kann, sind die Unterschiede zwischen den beiden Genotypen

Abbildung 3.5.2.3: Genetische Unterschiede für IL-4, C589T Polymorphismus, Spotanzahl

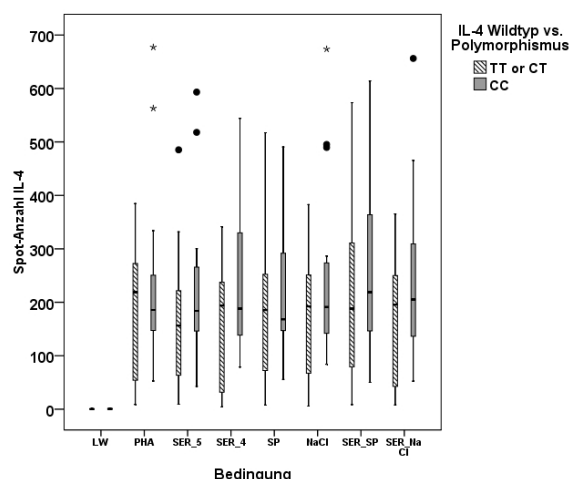
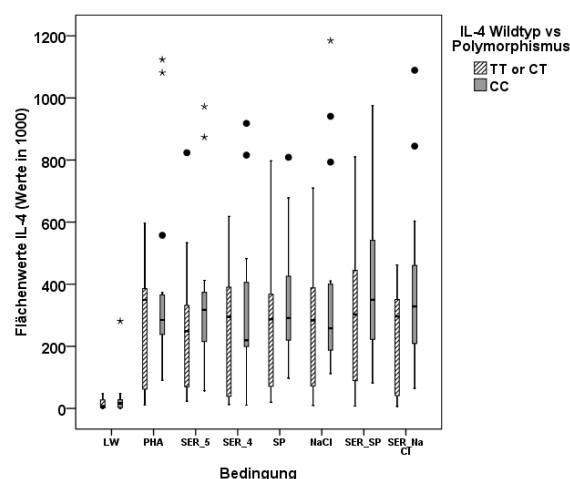


Abbildung 3.5.2.4: Genetische Unterschiede für IL-4, C589T Polymorphismus, Flächenwerte



nicht stark ausgeprägt. Ein Mann-Whitney-U-Test zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen.

3.5.2.3 IL-13, A4257G, Gln (Q) zu Arg (R), rs20541

3.5.2.3.1 Allel-Frequenzen und Haplotypen-Verteilung Die genetischen Daten des IL-13 A4257G Polymorphismus lagen von 33 Probanden vor. Der häufigste Genotyp war die G/G homozygote Variante. Die Verteilung der Genotypen und Allelfrequenzen unterschied sich nicht im Vergleich mit publizierten Daten aus anderen Studien und den kaukasischen Vergleichspopulationen der SNP-Datenbank des NIH (siehe Tabelle 3.5.2.5). Ebenso lag die Genotypverteilung im Hardy-Weinberg-Equilibrium ($\chi^2 = 0,6274$; $df = 1$; $p = 0,542$; bei 1000 Iterationen).

Tabelle 3.5.2.5: Genotypen und Allelfrequenzen für IL-13 Q130R in verschiedenen Populationen

Referenz	n	Genotypen						Statistik		Allelfrequenz	
		A/A		A/G		G/G		Chi-Quadrat	p	A	G
		N	%	N	%	N	%	χ^2		%	%
Stichprobe	33	2	6,1	9	27,3	22	66,7	jeweils	df = 2	19,7	80,3
HapMap-CEU ^a	120	6	5,0	44	36,7	70	58,3	1,014	0,602	23,3	76,7
PGA-European ^a	48	4	8,3	14	29,2	30	62,5	0,214	0,899	22,9	77,1
UK ^b	906	32	3,5	291	32,1	583	64,4	0,823	0,663	19,6	80,4
Frankreich ^c	112	3	3	28	25	81	72	1,012	0,603	15,2	84,8

^adbSNP-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) [?]; ^bSadeghnejad et al. (2008) [279]; ^cGranel et al. (2006) [106]

3.5.2.3.2 Einflüsse auf die IL-13 Produktion Genetische Unterschiede in Bezug auf die IL-13-Produktion wurden anhand des A4257G-Polymorphismus (Q130R) untersucht. Da nur zwei Probanden homozygot für den A/A-Genotyp waren, wurden wieder die A-Allel-Träger und die G/G-Homozygoten miteinander verglichen. Die Abb. 3.5.2.5 und 3.5.2.6 auf der nächsten Seite zeigen die möglichen Unterschiede wieder durch Boxplots.

Für IL-13 lassen die Diagramme einen Zusammenhang vermuten. So weisen die G/G-Homozygoten wesentlich höhere Flächenwerte und Spot-Zahlen als die A-Allel-Träger auf. In Tabelle 3.5.2.6 sind die Werte für die jeweiligen Genotypen sowie die Ergebnisse der nicht-parametrischen Tests wiedergegeben.

Für die einzelnen Bedingungen sind die Unterschiede nicht statistisch signifikant. Auch wenn man

Abbildung 3.5.2.5: Genetische Unterschiede für IL-13, A4257G Polymorphismus, Spotanzahl

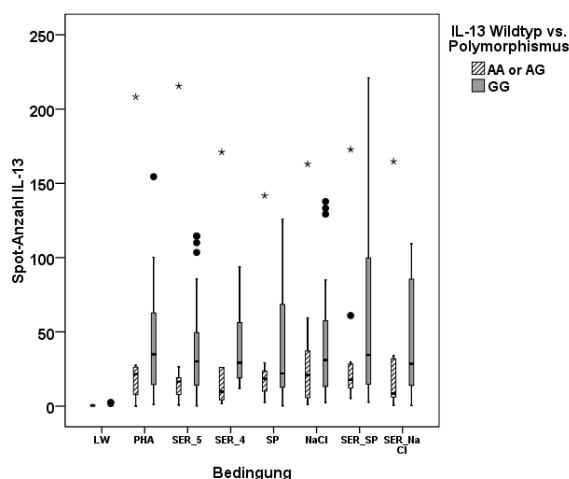


Abbildung 3.5.2.6: Genetische Unterschiede für IL-13, A4257G Polymorphismus, Flächenwerte

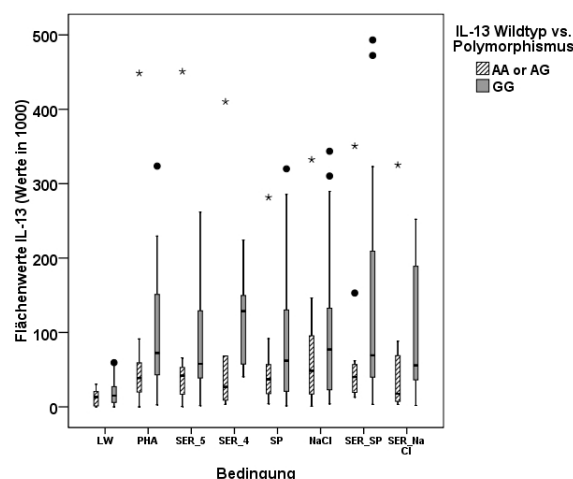


Tabelle 3.5.2.6: Deskriptive Statistik für IL-13, stratifiziert nach Genotypen

	MW				SD				Mann-Whitney-U-Test			
	Spots		Fläche		Spots		Fläche		Spots		Fläche	
	AA/AG	GG	AA/AG	GG	AA/AG	GG	AA/AG	GG	Z	p	Z	p
LW	0,4	0,8	$0,13 \times 10^5$	$0,12 \times 10^5$	0,3	0,7	$0,11 \times 10^5$	$0,18 \times 10^5$	-1,266	0,205	-0,649	0,516
PHA	33,5	44,8	$0,75 \times 10^5$	$1,01 \times 10^5$	58,9	38,8	$1,27 \times 10^5$	$0,85 \times 10^5$	-1,796	0,073	-1,680	0,093
SER_5	31,8	41,5	$0,71 \times 10^5$	$0,93 \times 10^5$	61,4	38,4	$1,28 \times 10^5$	$0,93 \times 10^5$	-1,681	0,093	-1,337	0,181
SER_4	42,6	41,4	$1,04 \times 10^5$	$1,17 \times 10^5$	72,4	28,6	$1,73 \times 10^5$	$0,67 \times 10^5$	-1,416	0,157	-1,416	0,157
SP	27,6	40,0	$0,60 \times 10^5$	$0,94 \times 10^5$	38,8	39,4	$0,78 \times 10^5$	$0,95 \times 10^5$	-0,879	0,380	-1,031	0,302
NaCl	33,6	42,4	$0,78 \times 10^5$	$1,01 \times 10^5$	46,6	42,0	$0,96 \times 10^5$	$1,00 \times 10^5$	-0,821	0,412	-0,802	0,423
SER_SP	35,2	56,3	$0,73 \times 10^5$	$1,31 \times 10^5$	48,1	58,7	$1,00 \times 10^5$	$1,42 \times 10^5$	-1,127	0,260	-1,757	0,079
SER_NaCl	28,2	44,6	$0,57 \times 10^5$	$0,98 \times 10^5$	47,0	38,0	$0,94 \times 10^5$	$0,85 \times 10^5$	-1,567	0,117	-1,795	0,073

das Produktionsniveau für IL-13 als neue Variable zusammenfasst, ergeben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede, weder für die Spot-Zahlen noch für die Flächenwerte. Allerdings wird bei einigen Bedingungen, wie beispielsweise der Grundstimulation mit PHA das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ nur knapp verfehlt. Auch bei der längeren Inkubationszeit von 25 h ergaben sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge.

3.5.3 Interaktionen genetischer und soziodemographischer Einflussfaktoren

In den bisherigen Abschnitten zeigte sich, dass Alter, Geschlecht und genetische Faktoren einen Einfluss auf die Zytokinproduktion nehmen können und diese Faktoren bei den jeweiligen Zytokinen einen unterschiedlich starken Einfluss haben. In den allgemeinen linearen Modellen aus Punkt 3.3.2 auf Seite 44 zeigten sich Alter und Geschlecht als mögliche Einflussfaktoren für die Produktion von IL-4 und IL-13. Die nicht-parametrischen Tests aus Punkt 3.5.1.1 auf Seite 66 zeigten signifikante Unterschiede auf das Zytokin-Produktionsniveau für die Spot- und Flächenwerte für IL-13. In Bezug auf das Alter zeigten Probanden mit einem höheren Alter eine stärkere Zytokin-Produktion. Allerdings waren die nicht-parametrischen Tests aus Punkt 3.5.1.2 auf Seite 69 wieder nur für IL-13 signifikant. Die Korrelationen zwischen der Zytokin-Produktion und dem Alter wiesen ebenfalls nur für IL-13 signifikante Zusammenhänge auf. Für IFN- γ zeigten die Träger von 13 CA-Repeats (Genotypen 2-3 und 3-3) gegenüber den Trägern von 14 CA-Repeats (Genotypen 2-4 und 3-4) eine statistisch signifikant höhere Zytokin-Produktion. Bei den anderen Genotypen, auch der anderen Zytokine, zeigten die nicht-parametrischen Tests keine statistisch signifikanten Zusammenhänge, obgleich sich nominell durchaus Unterschiede ergaben.

Um mögliche Interaktionen zwischen den soziodemographischen und den genetischen Einflussfaktoren zu untersuchen, wurde in einem letzten Schritt nochmals ein allgemeines lineares Modell gerechnet mit dem Zytokin-Produktionsniveau, welches durch den Mittelwert aus den Bedingungen "PHA", "SER_5", "SP", "NaCl", "SER_SP" und "SER_NaCl" bestimmt wird, als abhängige Variable und Alter, Geschlecht und Genotyp als feste Faktoren.

Im folgenden werden nur die signifikanten Werte detaillierter dargestellt. Für IFN- γ und IL-13 zeigten sich keine neuen Zusammenhänge oder Interaktionen und die allgemeinen linearen Modelle waren insgesamt sowohl für die Spot- als auch die Flächenwerte nicht signifikant.

Für IL-4 war das Modell jedoch sowohl für die Spot- als auch die Flächenwerte statistisch signifikant. In Tabelle 3.5.3.1 sind die Zwischensubjektfaktoren des Modells zusammengefasst und in Tabelle 3.5.3.2 die Werte der deskriptiven Statistik.

Tabelle 3.5.3.1: Zwischensubjektfaktoren des allgemeinen linearen Modells

		IL-4	
		Wertelabel	N
Geschlecht	1	männlich	21
	2	weiblich	12
Alter	1	< 30 Jahre	20
	2	> 29 Jahre	13
IL-Genotyp	1	TT oder CT	18
	2	CC	15

Tabelle 3.5.3.2: Deskriptive Statistik des allgemeinen linearen Modells für IL-4

			IL-4		
Geschlecht	Alter	Genotyp	MW	SD	N
männlich	< 30	TT/CT	219,73	156,52	8
		CC	232,67	92,43	6
		Gesamt	225,28	128,54	14
	> 29	TT/CT	156,09	98,44	5
		CC	553,00	91,28	2
		Gesamt	269,49	212,97	7
	Gesamt	TT/CT	195,25	136,23	13
		CC	312,76	171,11	8
		Gesamt	240,02	157,49	21
weiblich	< 30	TT/TC	154,17		1
		CC	136,68	50,39	5
		Gesamt	139,60	45,63	6
	> 29	TT/CT	136,92	83,96	4
		CC	202,52	72,86	2
		Gesamt	158,78	80,24	6
	Gesamt	TT/CT	140,37	73,12	5
		CC	155,49	60,08	7
		Gesamt	149,19	63,04	12
Gesamt	< 30	TT/CT	212,44	148,03	9
		CC	189,04	88,32	11
		Gesamt	199,57	116,08	20
	> 29	TT/CT	147,57	87,13	9
		CC	377,76	213,29	4
		Gesamt	218,40	169,30	13
	Gesamt	TT/CT	180,01	122,47	18
		CC	239,37	150,94	15
		Gesamt	206,99	137,24	33

Die Aussagekraft dieses Modells ist insgesamt etwas eingeschränkt, da der Levene-Test auf Gleichheit der Varianzen signifikant und damit die Grundvoraussetzung einer Normalverteilung der Werte verletzt ist (F: 2,549; df1: 7; df2: 25; $p = 0,040$). Die Ergebnisse der Zwischensubjektffaktoren sind in Tabelle 3.5.3.3 abgebildet.

Tabelle 3.5.3.3: Tests der Zwischensubjektffekte für IL-4; Interaktionen

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz	Partielles Eta-Quadrat
Korrigiertes Modell	304 841,70 ^a	7	43 548,81	3,65	0,008	0,506
Konstanter Term	1 091 382,17	1	1 091 382,17	91,59	0,000	0,786
Geschlecht	95 925,49	1	95 925,49	8,05	0,009	0,244
Alter ^b	31 680,57	1	31 680,57	2,66	0,116	0,096
Genotyp ^c	71 299,66	1	71 299,66	5,98	0,022	0,193
Geschlecht*Alter	14 721,65	1	14 721,65	1,24	0,277	0,047
Geschlecht*Genotyp	44 481,59	1	44 481,59	3,73	0,065	0,130
Alter*Genotyp	74 154,22	1	74 154,22	6,22	0,020	0,199
Geschlecht*Alter*Genotyp	30 773,92	1	30 773,92	2,58	0,121	0,094
Fehler	297 915,40	25	11 916,62			
Gesamt	2 016 618,85	33				
Korrigierte Gesamtvariation	602 757,10	32				

^aR-Quadrat = ,506 (korrigiertes R-Quadrat = ,367)

Das Gesamtmodell sowie die Faktoren Geschlecht, Genotyp und die Interaktion Alter*Genotyp sind signifikant. Das Gesamtmodell erklärt etwa 51% der Varianz und die einzelnen Faktoren zwischen 19 und 24%.

In den Abb. 3.5.3.1 und 3.5.3.2 sind die Graphiken der geschätzten Randmittel dargestellt, in denen man die Interaktionen zwischen den drei Einflussfaktoren gut erkennen kann.

Abbildung 3.5.3.1: Geschätztes Randmittel für IL-4, Altersgruppe < 30 Jahre

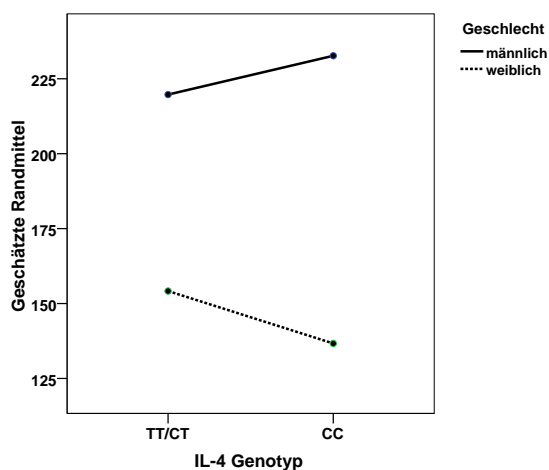
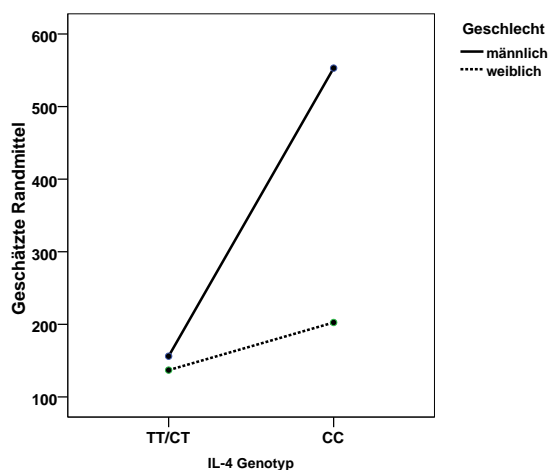


Abbildung 3.5.3.2: Geschätztes Randmittel für IL-4, Altersgruppe > 29 Jahre



In der Altersgruppe > 29 Jahre besteht ein deutlicher Unterschied in der Zytokin-Produktion zwischen den beiden Genotypen für die Männer, aber nicht für die Frauen. Bei den jüngeren Probanden zeigen sich Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtern, in Bezug auf die Genotypen sind die Differenzen allerdings nicht sonderlich ausgeprägt.

3.6 Th2/Th1-Verhältnis

Die bisherigen Untersuchungen zielten darauf ab, Veränderungen der Zytokinproduktion durch die einzelnen Bedingungen und mögliche Einflussfaktoren auf interindividuelle Unterschiede ausfindig zu machen. In diesem letzten Abschnitt sollen die Verhältnisse der Th2 und Th1 Zytokine genauer beleuchtet werden. Sowohl optisch, als auch nach den deskriptiven Daten geht klar hervor, dass die Zytokinproduktion für IFN- γ im Mittel am höchsten war, gefolgt von IL-4 und schließlich IL-13. Dabei zeigte sich prinzipiell ein ähnliches Muster für die einzelnen Stimulationen über die Mittelwerte hinweg bei allen drei Zytokinen. Hierdurch kann aber noch nicht primär gefolgert werden, ob auch das Th2/Th1-Verhältnis auf einer individuellen Basis für die jeweiligen Bedingungen gleich bleibt.

Die deskriptive Statistik für die drei Zytokine und die Häufigkeitstabellen für die einzelnen Verhältnisse zeigten, dass es einen starken Ausreißer bei allen drei Zytokinen gab. Dieser wurde bei den weiteren Darstellungen und Berechnungen ausgeschlossen. Da es von primärem Interesse war, ob sich das Th2/Th1-Verhältnis durch eine Stimulation mit Serotonin, Substanz P oder deren Kombination gegenüber einer alleinigen Stimulation mit PHA verändert, sind in Folge nur die Ergebnisse für diese vier Bedingungen dargestellt. Dabei bedeuten größere Werte generell eine Verschiebung des Th2/Th1-Gleichgewichts zugunsten der Th2-Zytokine und kleinere Werte zugunsten der Th1-Zytokine. Beim Verhältnis von IL-13/IL-4 bedeuten größere Werte eine Verschiebung in Richtung IL-13.

Tabelle 3.6.0.4 gibt die deskriptiven Daten der Verhältnisse der Spot-Produktion und Tabelle 3.6.0.5 die Daten der Flächenwerte wider.

Tabelle 3.6.0.4: Deskriptive Statistik für das Th2/Th1-Verhältnis der Spot-Produktion

Verhältnis	Bedingung	MW	SD	Min.	Max.	N
IL-4/IFN- γ	PHA	0,396	0,293	0,020	1,600	41
	SER_5	0,396	0,307	0,020	1,500	41
	SP	0,410	0,328	0,010	2,010	41
	SER_SP	0,385	0,224	0,010	1,020	39
IL-13/IFN- γ	PHA	0,077	0,108	0,000	0,660	41
	SER_5	0,067	0,066	0,000	0,380	41
	SP	0,068	0,063	0,000	0,280	41
	SER_SP	0,078	0,068	0,010	0,290	38
IL-13/IL-4	PHA	0,224	0,301	0,000	1,710	41
	SER_5	0,196	0,155	0,010	0,770	41
	SP	0,188	0,147	0,010	0,690	41
	SER_SP	0,277	0,358	0,020	2,130	40

Tabelle 3.6.0.5: Deskriptive Statistik für das Th2/Th1-Verhältnis der Flächenwerte

Verhältnis	Bedingung	MW	SD	Min.	Max.	N
IL-4/IFN- γ	PHA	0,314	0,238	0,010	1,160	37
	SER_5	0,335	0,331	0,020	1,990	37
	SP	0,410	0,328	0,010	2,010	37
	SER_SP	0,324	0,200	0,010	0,890	37
IL-13/IFN- γ	PHA	0,071	0,054	0,000	0,210	37
	SER_5	0,076	0,063	0,000	0,330	37
	SP	0,075	0,060	0,000	0,210	37
	SER_SP	0,092	0,076	0,010	0,310	37
IL-13/IL-4	PHA	0,301	0,336	0,000	1,790	37
	SER_5	0,295	0,240	0,010	0,980	37
	SP	0,268	0,206	0,030	0,830	37
	SER_SP	0,386	0,452	0,030	2,170	37

Man kann der deskriptiven Statistik entnehmen, dass sich insgesamt keine großen Verschiebungen durch die jeweiligen Stimulationen ergeben. Interessanterweise bewegt sich durch die Kombination aus Serotonin und Substanz P das Gleichgewicht für das Verhältnis von IL-13/IFN- γ und für das Verhältnis von IL-13/IL-4 wieder in Richtung der ursprünglichen Ausgangslage nur unter PHA. Die alleinige Stimulation mit Serotonin oder Substanz P zeigt hingegen eher eine Verschiebung in die andere Richtung, also zugunsten IFN- γ bzw. IL-4. Das ist bei den Flächenwerten prinzipiell ähnlich gegeben. In Tabelle 3.6.0.6 sind die Ergebnisse der nicht-parametrischen Tests für die möglichen Kombinationen dargestellt.

Tabelle 3.6.0.6: Wilcoxon-Tests für Th2/Th1-Verhältnis

Verhältnis	Var. 1	Var. 2	Z-Wert		p -Wert	
			Spots	Fläche	Spots	Fläche
IL-4/IFN- γ	PHA	SER_5	-0,356	-0,400	0,722	0,689
	PHA	SP	-0,330	-0,008	0,741	0,994
	PHA	SER_SP	-0,781	-1,184	0,435	0,236
	SER_5	SER_SP	-1,186	-1,109	0,236	0,267
	SP	SER_SP	-1,088	-0,928	0,276	0,354
IL-13/IFN- γ	PHA	SER_5	-0,149	-0,536	0,882	0,592
	PHA	SP	-0,927	-0,008	0,354	0,994
	PHA	SER_SP	-2,777	-1,954	0,005	0,051
	SER_5	SER_SP	-2,415	-1,456	0,016	0,145
	SP	SER_SP	-3,038	-2,240	0,002	0,025
IL-13/IL-4	PHA	SER_5	-0,369	-0,173	0,712	0,862
	PHA	SP	-0,590	-0,339	0,555	0,734
	PHA	SER_SP	-2,003	-1,154	0,045	0,248
	SER_5	SER_SP	-1,438	-0,852	0,150	0,394
	SP	SER_SP	-2,487	-1,682	0,013	0,093

Es zeigt sich, dass sich für das Verhältnis von IL-13/IFN- γ die Kombination aus Serotonin und Substanz P signifikant von der alleinigen Stimulation mit PHA, Serotonin oder Substanz P bei den Spot-Zahlen abhebt. Bei den Flächenwerten ist die Tendenz ähnlich, allerdings ist nur der Unterschied aus der Kombination von Serotonin und SP gegenüber Substanz P allein signifikant. Gegenüber der Grundstimulation mit PHA wird nur knapp das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ verfehlt. Außerdem verschiebt sich das Verhältnis von IL-13/IL-4 bei den Spot-Zahlen signifikant zugunsten IL-13 durch die Kombination aus Substanz P und Serotonin im Vergleich zur Grundstimulation mit PHA oder Substanz P allein, nicht jedoch gegenüber Serotonin allein. Bei den Flächenwerten ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Wenn man wieder nach Bonferroni korrigieren und das Signifikanzniveau durch die Anzahl der statistischen Tests teilen würde, so ergäbe sich als neues Signifikanzniveau ein Wert von $p = 0,00333$. Beim Verhältnis von IL-13/IFN- γ bliebe also die Kombination aus Serotonin und SP gegenüber SP allein signifikant unterschiedlich.

Graphisch sind in den Abb. 3.6.0.3 und 3.6.0.4 auf der nächsten Seite die Boxplots für die Spot-Werte der Verhältnisse von IL-4/IFN- γ und IL-13/IL-4 wiedergegeben. In den Abb. 3.6.0.5 und 3.6.0.6 sind sowohl die Spot- als auch die Flächenwerte des IL-13/IFN- γ Verhältnisses durch Boxplots dargestellt.

Abbildung 3.6.0.3: IL-4/IFN- γ -Verhältnisse bei vier verschiedenen Bedingungen, Spot-Werte

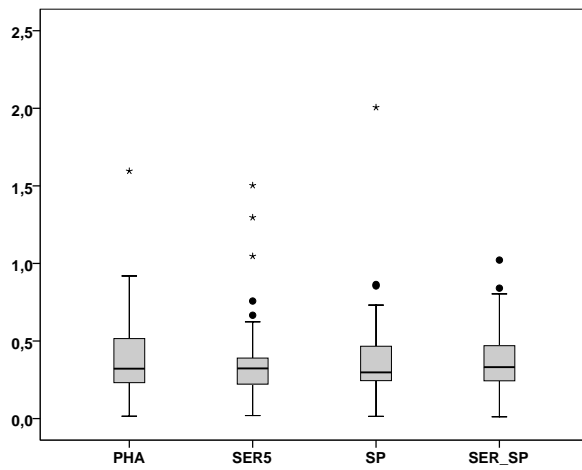


Abbildung 3.6.0.4: IL-13/IL-4-Verhältnisse bei vier verschiedenen Bedingungen, Spot-Werte

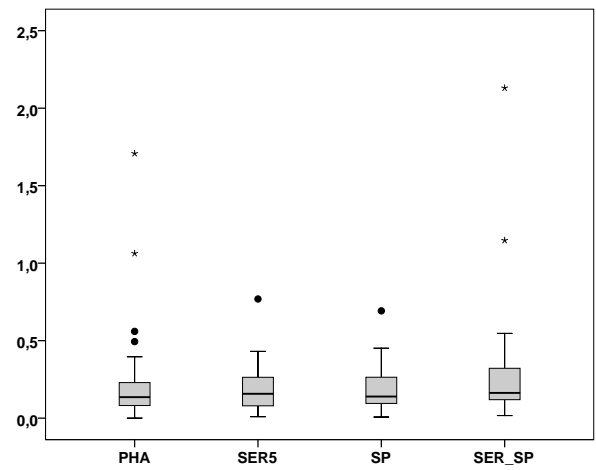


Abbildung 3.6.0.5: IL-13/IFN- γ -Verhältnisse bei vier verschiedenen Bedingungen, Spot-Werte

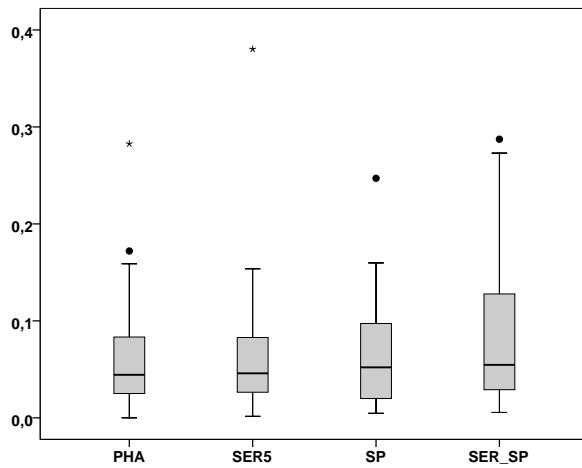
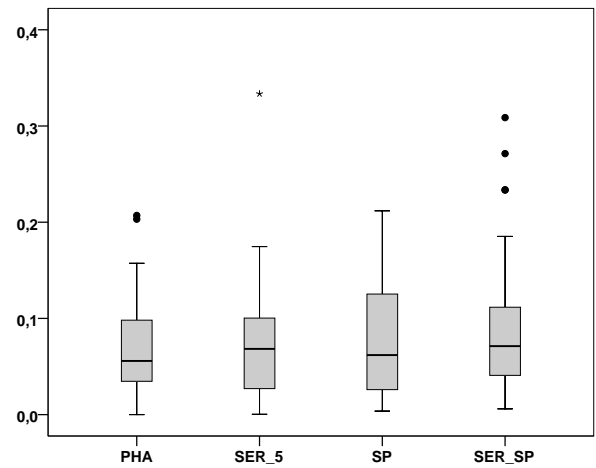


Abbildung 3.6.0.6: IL-13/IFN- γ -Verhältnisse bei vier verschiedenen Bedingungen, Flächenwerte



4 Diskussion

Die wechselseitige Beeinflussung des Nervensystems und des Immunsystems konnte in den letzten Jahrzehnten durch umfassende Untersuchungen aufgedeckt werden. Hierbei zeigte es sich, dass sowohl Zytokine, die zentral und auch peripher produziert werden, die Funktionsweise von Nervenzellen beeinflussen können, als auch Neurotransmitter einen modulatorischen Effekt auf die Wirkweise von Immunzellen besitzen. Immunzellen, insbesondere T-Lymphozyten weisen dabei Rezeptoren für Neurotransmitter auf ihrer Zellmembran auf. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit die beiden Neurotransmitter Serotonin und Substanz P die Produktion von Zytokinen beeinflusst. In der Literatur sind bereits Ergebnisse zu beiden Zytokinen einzeln vorbeschrieben, ein möglicher wechselseitiger Effekt wurde bisher nicht untersucht. Im zentralen Nervensystem zeigt Substanz P eine modulatorische Wirkung auf die serotonerge Reizweiterleitung. Insofern war es naheliegend auch in peripheren Systemen einen modulatorischen Effekt von Substanz P auf die Wirkung von Serotonin anzunehmen.

T-Lymphozyten gliedern sich in mehrere Subpopulationen. Dabei dienen sowohl Oberflächenmarker als auch jeweils spezifische Zytokine zur genaueren Charakterisierung der einzelnen Subpopulationen. Zur Untersuchung von Th1-Zellen wurde IFN- γ bestimmt und die Funktion von Th2-Zellen wurde durch die Bestimmung von IL-4 und IL-13 untersucht. Mit der ELISpot-Methode wurde dabei der Frage nachgegangen, inwieweit Serotonin und Substanz P einzeln und zusammen die Produktion dieser drei Zytokine beeinflussen. Bisherige Arbeiten haben ähnliche Fragestellungen hauptsächlich an gepoolten Zellen aus Buffy Coats, bestimmten Zelllinien oder aus PBMC weniger Probanden untersucht. Hierbei können interindividuelle Unterschiede, die prinzipiell ebenfalls in der Literatur beschrieben sind, jedoch nicht berücksichtigt werden. Um diesem wichtigen Aspekt Rechnung zu tragen, wurde die Fragestellung an einem größeren Kollektiv gesunder Probanden untersucht, um hierdurch mögliche Einflüsse von Alter, Geschlecht, Nikotinkonsum oder genetischer Polymorphismen herausarbeiten zu können.

Die ELISpot-Methode ist eine sehr sensitive Methode zur quantitativen Bestimmung einzelner Zytokine. Um reliable Ergebnisse zu erzielen und diese automatisiert erfassen zu können, sind verschiedene methodische Fallstricke zu beachten. Der Erarbeitung einer einheitlichen Methodik und der Untersuchung möglicher Einflussfaktoren methodischer Variationen galt daher ein weiteres Hauptaugenmerk dieser Arbeit.

In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Ergebnisse diskutiert. Im ersten Abschnitt (siehe 4.1) stehen die Ergebnisse der Hauptfragestellung im Fokus, im zweiten Abschnitt (siehe 4.2 auf Seite 87) werden die möglichen Einflussfaktoren auf interindividuelle Unterschiede in den Mittelpunkt gerückt und im dritten Abschnitt (siehe 4.3) werden die Variationen der verwendeten Methodik abschließend diskutiert.

4.1 Hauptfragestellung

In einer Übersichtsarbeit stellte Mia Levite heraus, dass die Effekte, die Neurotransmitter auf T-Zellen ausüben sehr unterschiedlicher Natur sein können. Es kommt dabei auf viele Kontextfaktoren an. Eine Frage ist, ob Neurotransmitter mit naiven oder Antigen/Mitogen-aktivierten T-Zellen in Verbindung treten, ob niedrige/optimale Dosen oder eher hohe Dosierungen verwendet werden, welcher Subtyp von T-Zellen beobachtet wird (Th1 vs. Th2, Teff vs. Treg, CD4+ vs. CD8+), ob weitere Neurotransmitter gleichzeitig verwendet werden und welche Zytokine im umgebenden Milieu vorhanden sind (zur Übersicht [184]). Widersprüchliche Ergebnisse zu Angaben in der Literatur sind also vorprogrammiert, wenn der Kontext nicht genau berücksichtigt wird.

4.1.1 Wirkung von Substanz P

In den Vorversuchsreihen zeigte sich, dass SP ohne Mitogen-Stimulation der Zellen keine Zytokinproduktion hervorruft. Auch bei höheren Dosierungen war dies nicht der Fall. Dies wird auch in der Literatur

so beschrieben [159, 338, 188]. Allerdings konnte Levite zeigen, dass Substanz P zu einer Produktion von Zytokinen ohne anderweitige Stimulation führen kann und dass durch eine Stimulation mit Neuropeptiden Th1-Zellen auch Th2-Zytokine wie IL-4 produzieren und umgekehrt, was durch eine klassische Aktivierung dieser Zellen durch Antigene bisher nicht beobachtet werden konnte [182].

Eine Dosis-Wirkungsbeziehung zeigte sich in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nicht. Nordlind et al. zeigten hingegen einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Proliferationsrate [239].

Bei der endgültigen Versuchsreihe zeigte sich keine Veränderung der Zytokinproduktion durch Hinzugabe von SP im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit PHA. Nominell nahmen sowohl die Anzahl von SFC als auch die Flächenwerte in Bezug auf die Produktion von IFN- γ ab. Hingegen steigerte Substanz P prozentual die Anzahl von SFC und die Flächenwerte für beide Interleukine. Bei IL-13 war dies bei beiden Inkubationszeiten gleich. Die Veränderungen der Produktion waren jedoch alle nicht statistisch signifikant. Hingegen fanden Wagner et al., dass Substanz P die IFN- γ Produktion von mit PWM-stimulierten Zellen steigern konnte. Dieser Effekt lag bei etwa 6-18% und zeigte sein Maximum bei einer SP Konzentration von 10^{-8} mol/l [338].

Insgesamt scheint SP spezifische Effekte auf verschiedene Zytokine zu zeigen. Kim et al. fanden keinen Einfluss von SP auf die IL-4- und IFN- γ -Produktion bei Gesunden oder Patienten mit atopischer Dermatitis, sehr wohl aber auf die Produktion von IL-10 und TNF- α [159]. Diese Ergebnisse stehen jedoch in Widerspruch mit den Daten von Gordon et al., die zeigen konnten, dass SP einen verstärkenden Effekt auf die IL-4- und IFN- γ -Produktion bei Patienten mit atopischer Dermatitis in physiologischen Konzentrationen hatte, jedoch nicht über die gesamte Verdünnungsreihe hinweg [103]. Auf Mastzellen und Monozyten konnte ein verstärkender Effekt durch SP auf die Produktion von IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- α gezeigt werden [132, 174, 176, 197, 160]. Dabei scheint es mitentscheidend zu sein, wie stark die Zellen bereits mit Mitogenen/Antigenen stimuliert wurden, da SP die Produktion von IL-1 auch vermindern konnte, wenn bereits maximal mit LPS stimuliert wurde [174].

4.1.2 Wirkung von Serotonin

Ähnlich wie SP konnte auch Serotonin in den Vorversuchen keine nennenswerte Zytokinproduktion ohne eine Stimulation mit PHA induzieren, was in Einklang mit der Literatur steht [147].

Im Gegensatz zu SP ergab sich für die Wirkung von Serotonin ein klarer konzentrationsabhängiger Effekt in den Vorversuchen. So zeigte sich eine deutliche Abnahme der Anzahl von SFC für alle drei Zytokine bei einer Serotonin-Konzentration von 10^{-3} mol/l. Bei niedrigeren Serotonin-Konzentrationen war dieser Effekt bei den Vorversuchen je nach Zytokin unterschiedlich, teilweise ergaben sich sogar stimulierende Effekte, vor allem auf die Produktion von IL-13.

Auch bei der endgültigen Versuchsreihe zeigten sich Unterschiede sowohl in Bezug auf eine Dosisabhängigkeit, als auch die Richtung der Wirkung von Serotonin auf die Produktion der drei untersuchten Zytokine. Auf die Anzahl von IFN- γ -SFC wirkten beide Konzentrationen hemmend. Signifikant waren aber nur die Ergebnisse für die höhere Serotonin-Konzentration (SER_4 (10^{-4} mol/l)). Einschränkend muss allerdings erwähnt werden, dass, wie bereits weiter oben angemerkt, alle Wells für die Bedingung SER_4 am Rand lagen und diese Ergebnisse damit höheren Schwankungen unterlagen. Die Wirkung von Serotonin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l zeigte sich nicht unterschiedlich zu einer Wirkung von SP alleine. Die prozentualen Veränderungen der Anzahl von SFC war dabei für die höhere Serotonin-Konzentration mit -18,4% durchaus beachtlich.

Die Ergebnisse für die beiden Interleukine unterschieden sich gegenüber der Wirkung von Serotonin auf die IFN- γ -Produktion. So veränderte die niedrigere Serotonin-Konzentration die Anzahl von IL-4-SFC nicht und die höhere Konzentration nur grenzwertig. Für die Flächenwerte waren die Unterschiede nicht mehr signifikant. Eine statistisch signifikant unterschiedliche Wirkung zwischen den beiden Konzentrationen ergab sich ebenfalls nicht. Auch gegenüber einer Stimulation mit SP allein zeigte sich kein Unterschied. Interessanterweise wirkte Serotonin in geringerer Konzentration sogar steigend, sowohl auf

die SFC-Anzahl als auch die Zytokinproduktion selbst, wenn man die prozentualen Veränderungen betrachtet. Hingegen führte die höhere Konzentration doch zu einer deutlichen Abnahme.

Dieser Unterschied zwischen den beiden Serotoninkonzentrationen ergab sich qualitativ gleichsinnig auch in Bezug auf die IL-13-Produktion, wobei die Steigerung für die geringere Serotoninkonzentration noch deutlicher war als bei IL-4. Diese Ergebnisse ließen sich auch bei der längeren Inkubationszeit von 25 h replizieren, die Ergebnisse waren jedoch nicht statistisch signifikant.

Andere Arbeiten zeigten ebenfalls einen supprimierenden Effekt von Serotonin auf die Proliferationsrate von PHA-aktivierten Lymphozyten und eine Minderung der IFN- γ -Produktion [13, 26, 157, 301]. Eine inhibitorische Wirkung auf die Proliferationsrate nach Stimulation mit HgCl konnte bis zu einer Serotonin-Konzentration von 10^{-7} mol/l nachgewiesen werden. Die stärkste Wirkung zeigte sich dabei unter 10^{-4} mol/l [240]. In der eigenen Arbeit wurden noch stärkere Wirkungen bei einer Konzentration von 10^{-3} mol/l festgestellt. Das prinzipielle Reaktionsmuster ist aber bei allen Arbeiten übereinstimmend.

Hingegen zeigten Aune et al. an murinen Milzzellen, dass die Zugabe von Serotonin auf Mitogenstimulierte Lymphozyten eine Zunahme von mRNA für IFN- γ und IL-2 bewirkt [15]. Inwieweit, die mRNA-Produktion aber auch in eine Zytokinproduktion umgesetzt wurde, blieb offen.

4.1.3 Wirkung von Substanz P und Serotonin

Die primäre Hypothese dieser Arbeit war, dass die simultane Stimulation von Lymphozyten durch Substanz P und Serotonin kostimulatorische Effekte hervorruft. Die Vorversuche zeigten in diesem Zusammenhang wiederum, dass die Gabe beider Neurotransmitter ohne eine Grundstimulation mit PHA zu keiner erhöhten Anzahl von SFC führt.

Hingegen steigerte die gleichzeitige Gabe von Serotonin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l und SP in einer Konzentration von 10^{-10} mol/l die Produktion aller drei Zytokine in PHA-aktivierten Lymphozyten.

Für IFN- γ waren diese Ergebnisse sowohl gegenüber der alleinigen Gabe von Serotonin als auch der alleinigen Gabe von Substanz P statistisch signifikant. Gegenüber der Kontrollbedingung (SER_NaCl) der gemeinsamen Stimulation (SER_SP) aus Serotonin (10^{-5} mol/l) und SP (10^{-10} mol/l), also Serotonin (10^{-5} mol/l) zusammen mit dem Trägermittel von SP (NaCl in einer "Konzentration" von 10^{-10} mol/l), waren die Ergebnisse für die Flächenwerte signifikant, für die Spot-Zahl nur grenzwertig signifikant.

Für IL-4 waren die Ergebnisse einer gemeinsamen Stimulation gegenüber der alleinigen Gabe von Serotonin ebenfalls statistisch signifikant, gegenüber der alleinigen Gabe von SP nur für die Flächenwerte signifikant. Gegenüber der Kontrollbedingung war der Unterschied ebenfalls nur für die Flächenwerte grenzwertig signifikant.

Für IL-13 war die gemeinsame Stimulation vor allem gegenüber der alleinigen Gabe von Substanz P statistisch signifikant. Gegenüber der alleinigen Gabe von Serotonin waren die Ergebnisse nur für die Spot-Zahlen statistisch signifikant und gegenüber der Kontrollgruppe nur für die Flächenwerte. Für den jeweiligen anderen Vergleich waren die Ergebnisse grenzwertig signifikant.

Bei der längeren Inkubationszeit von IL-13 ergab sich nur für die Flächenwerte beim Vergleich zwischen der gemeinsamen Gabe gegenüber der Kontrollgruppe (SER_NaCl), also Serotonin (10^{-5} mol/l) zusammen mit dem Trägermittel von SP (NaCl in einer "Konzentration" von 10^{-10} mol/l), ein signifikantes Ergebnis.

Absolut gesehen und auch in Bezug auf die prozentualen Veränderungen bleibt zusammenfassend festzuhalten, dass die gleichzeitige Gabe von Serotonin und Substanz P bei allen drei Zytokinen gegenüber allen anderen Bedingungen die höchsten Werte für die Spot-Zahlen und die Flächenwerte erreichte. Was die Anzahl von SFC betrifft, könnte es sich hierbei möglicherweise um eine Steigerung der Proliferationsraten handeln. Wenn man die Flächenwerte betrachtet, so scheint eher die Zytokinproduktion selbst betroffen zu sein.

Es bleibt noch zu diskutieren, ob die beobachteten Unterschiede in ihrer Stärke auch tatsächlich

von Relevanz sein können. Insgesamt steigerte die gleichzeitige Gabe von Serotonin und SP die IFN- γ -Produktion um etwa 10% gegenüber der jeweiligen alleinigen Gabe, die IL-4-Produktion zwischen 13 (SP) und 18% (5-HT) und die IL-13-Produktion zwischen 30 (SP) und 45% (5-HT). Ob dies für die IFN- γ -Produktion von physiologischer Bedeutung ist, kann zunächst nur spekuliert werden. Für die beiden Interleukine ist der Unterschied deutlicher und eine physiologische Bedeutung kann klarer vermutet werden.

Die simultane Wirkung von Serotonin und Substanz P auf die Zytokinproduktion von PBMC wurde bisher in der Literatur nicht untersucht. Es finden sich aber in anderen Zusammenhängen Hinweise darauf, dass die Gabe von Substanz P modulierende und verstärkende Effekte auf die Wirkungen anderer Neurotransmitter hat. Diese Effekte sind allerdings oftmals stark kontextabhängig.

So zeigten McCluskey et al. dass die Injektion von SP die MHC II-Expression von Mikrogliazellen im Hirnstamm von Ratten nach Gabe von IFN- γ erhöht. Diese Wirkung scheint für die untersuchten Hirnareale spezifisch zu sein, da eine ähnliche Wirkung nicht im Hippocampus beobachtet werden konnte [211].

Auch bei der rheumatoiden Arthritis wird ein kombinierter Effekt von Substanz P mit einem weiteren Neurotransmitter, in diesem Falle Noradrenalin vermutet [216]. Bei dieser Erkrankung wird eine Dysbalance von Substanz P, welches pro-inflammatorische Wirkungen zeigen soll und dem eher anti-inflammatorisch wirkenden Noradrenalin vermutet. Das Zusammenspiel wird durch Substanz P-Ausschüttung aus afferenten sensorischen Nervenendigungen und Noradrenalin-Ausschüttung aus efferenten sympathischen Nervenendigungen ermöglicht. In der Modulation von Entzündungen wird Noradrenalin durch seinen Ko-Transmitter Neuropeptid Y unterstützt [231].

Mögliche widersprüchliche Befunde zu anderen Ergebnissen in der Literatur sind bei dieser Art von *in vitro* Versuchen vorprogrammiert, da die Wirkung z.B. von Katecholaminen auf die Zytokinproduktion sehr davon abhängt, welche Zytokine untersucht werden, welcher Zelltyp und wie die experimentellen Bedingungen aussehen. So konnte gezeigt werden, dass Katecholamine Th2-Zytokine je nach Kontext leicht vermindern, erhöhen oder gar nicht verändern können [282].

4.1.4 Spezifität der beobachteten Wirkung

Um sichere Aussagen treffen zu können, ob die beobachteten Effekte tatsächlich auf eine Wirkung von Substanz P oder Serotonin zurückzuführen sind, bzw. welche Rezeptoren hierbei eine Rolle spielen, sind Versuche mit Rezeptoragonisten und -antagonisten notwendig. Allerdings muss hier erwähnt werden, dass es sich bei komplexen zellulären Systemen oft um einen Nettoeffekt handelt, der durch die möglicherweise gleichzeitig stattfindenden stimulierenden und inhibitorischen Effekte in einem System verursacht wurde. Die Aussagen durch Versuche mit Rezeptoragonisten bleiben daher dennoch eingeschränkt.

Da die zu untersuchende Zellzahl begrenzt war, stammen die Aussagen über die Spezifität der beobachteten Wirkung aus den Vorversuchsreihen und unterliegen daher noch methodischen Unsicherheiten.

Bei den Vorversuchen zeigte sich jedoch recht eindeutig, dass die Effekte, die durch Serotonin hervorgerufen wurden, auch durch die Hinzugabe des 5-HT_{1A}-Rezeptoragonisten 8-OH-DPAT erreicht werden konnten. So hemmten sowohl höhere Konzentrationen von Serotonin und 8-OH-DPAT die Zytokinproduktion aller drei Zytokine nahezu vollständig, während geringe Konzentrationen Serotonin oder 8-OH-DPAT die Produktion eher steigerten. Diese Effekte ließen sich durch niedrige Konzentrationen des 5-HT_{1A}-Rezeptorantagonisten S-WAY 100135 nicht aufheben, durch etwas höhere Konzentrationen aber verändern. In der höchsten eingesetzten Konzentration von S-Way 100135 (10^{-3} mol/l) ließ sich die Anzahl von SFC interessanterweise wieder stark vermindern. Insgesamt legen diese Ergebnisse nahe, dass zumindest ein Teil der beobachteten Serotonin-Wirkung über den 5-HT_{1A}-Rezeptor vermittelt wird.

In der Literatur werden diese Beobachtungen bestätigt. So konnte gezeigt werden, dass eine selektive Hemmung des 5-HT_{1A}-Rezeptors mit spezifischen Antagonisten die T-Zell-Proliferation hemmt. Diese Hemmung wird durch den selektiven 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten OH-DPAT oder durch Serotonin auf-

gehoben [82]. Auch die Proliferationsrate aktivierter B-Lymphozyten scheint zum Teil über den 5-HT_{1A} -Rezeptor gesteuert zu sein [147]. Abdouh et al. beschreiben einen konzentrationsabhängigen Effekt von 5-HT_{1A} -Rezeptoragonisten auf die Proliferationsrate PHA-aktivierter T-Lymphozyten. Die optimalen Dosen lagen dabei zwischen 10^{-4} und 5×10^{-5} mol/l [4].

Die Vorversuche mit NK-1-Rezeptoragonisten zeigten hingegen nicht so klare Ergebnisse. Allerdings konnte auch für Substanz P allein kein konzentrationsabhängiger Zusammenhang gefunden werden. Aus den Ergebnissen kann allenfalls vermutet werden, dass die Hinzugabe eines NK-1-Rezeptoragonisten zu Serotonin in geringerer Konzentration (10^{-5} mol/l) einen kostimulatorischen Effekt auf die Produktion von IL-4 hat. Interessanterweise führte die Kombination aus dem NK-1-Rezeptoragonisten und Serotonin in hohen Konzentrationen (10^{-3} mol/l) noch zu einer gewissen Spot-Produktion bei der Detektion von IFN- γ , was durch die Gabe von SP nicht erreicht werden konnte.

4.1.5 Verhältnis von Th1 und Th2 Zytokinen

Um zu beurteilen, ob sich durch eine Stimulation der Lymphozyten mit Substanz P, Serotonin oder deren Kombination eine Veränderung des Th2/Th1-Verhältnisses gegenüber einer alleinigen Stimulation mit PHA ergibt, wurden nur diese vier Bedingungen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass sich insgesamt keine deutlichen Veränderungen ergaben. Von Interesse ist jedoch, dass sich durch die Kombination aus Serotonin und Substanz P das Gleichgewicht für zwei Verhältnisse, nämlich IL-13/IFN- γ und IL-13/IL-4 in eine gegensätzliche Richtung verschiebt, als dies bei der jeweiligen alleinigen Stimulation der Fall ist. Möglicherweise kann der Körper durch die Ausschüttung beider Neurotransmitter also ein zunächst verändertes Gleichgewicht wieder einregulieren. Für das Verhältnis von IL-13/IFN- γ waren diese Veränderungen für die Spot-Zahlen auch statistisch signifikant, für die Flächenwerte zeigten sich grenzwertig signifikante Ergebnisse. Für die Kombination aus Serotonin und SP gegenüber Substanz P allein zeigten sich signifikante Werte. Für das Verhältnis von IL-4/IFN- γ ergaben sich keine signifikanten Ergebnisse.

Die Übertragungsmöglichkeit solcher *in vitro* Ergebnisse sind recht eingeschränkt und ein Nutzen von *in vitro* Studien wird von manchen Autoren generell angezweifelt, da diese immer die eigentlichen physiologischen Vorgänge unterschätzen und vereinfachen würden [72]. So konnte gezeigt werden, dass Zellpopulationen, die *in vitro* als anti-inflammatorische Th2-Zellen klassifiziert wurden, in Tierversuchen im Sinne einer Th1-Antwort sogar eine experimentelle Autoimmunencephalitis auslösen können [158, 170]. Allerdings werden Ergebnisse in Bezug auf das Verhältnis von Th1- zu Th2-Zellen aus ELISpot-Versuchen als stabiler angesehen im Vergleich zu Messungen der einzelnen Zytokine, da beispielsweise die Konzentration an IL-4 in Zellüberständen durch einen Verbrauch an IL-4 durch kultivierte Zellen beeinflusst wird [83].

Generell wird Substanz P aufgrund seiner Bedeutung bei der Entwicklung neurogener Schmerzen und Inflammation eher eine pro-inflammatorische Wirkung zugeschrieben [286, 165]. Ein Shift in Richtung Th1 wäre also unter Stimulation mit Substanz P zu erwarten gewesen. Dies zeigte sich in der vorliegenden Arbeit nicht. Allerdings könnte dies in einem anderen Kontext, wie beispielweise bei einer bereits ablaufenden Entzündung, ganz anders aussehen. Bei Untersuchungen solcher Art sind die jeweiligen Zytokin-Umgebungen von entscheidender Bedeutung. Auch sind pro-inflammatorische Effekte bei Tierversuchen nicht mit *in vitro* Versuchen am Menschen vergleichbar. Insgesamt unterstützen jedoch die vorliegenden Ergebnisse, dass Substanz P im Zusammenspiel mit anderen Neurotransmittern eine Veränderung des Th2/Th1-Verhältnisses bewirken kann. Da IL-13 bei der Genese allergischer Erkrankungen eine große Rolle spielt, könnte ein modulierender Einfluss von Substanz P auf die Serotonin-Wirkung, wie er in dieser Arbeit gezeigt wurde, möglicherweise eine pathophysiologische Rolle spielen. Diese Hypothese müsste aber bei einem Kollektiv Betroffener überprüft werden.

4.2 Individuelle Unterschiede

Eines der deutlichsten und interessantesten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind die individuellen Unterschiede. Über alle Versuchsreihen hinweg zeigte sich, dass die Zytokinproduktion der einzelnen Individuen zwischen den gemessenen Blutabnahmezeitpunkten, die im Abstand von vier Wochen auseinander lagen, hoch miteinander korrelierten. Dennoch ergaben sich auch intraindividuelle Unterschiede. Um für diese Unterschiede kontrollieren zu können, wurden die Ergebnisse der endgültigen Versuchsreihe als Mittelwerte der Ergebnisse der beiden Blutabnahmezeitpunkte dargestellt.

Auch bei anderen Arbeiten zeigte sich, dass die Werte einzelner Probanden sich zwischen zwei Abnahmezeitpunkten nur gering unterscheiden [174, 274]. Die gleichen und andere Autoren beschreiben aber auch eine hohe interindividuelle Varianz [274]. Als Ursachen werden dabei sowohl genetische als auch umweltbedingte Faktoren diskutiert (zur Übersicht [303]).

Die gefundenen intraindividuellen Unterschiede waren insgesamt deutlich geringer als die interindividuellen Unterschiede, die in Bezug auf mögliche Einflüsse näher untersucht wurden.

4.2.1 Interindividuelle Unterschiede

Eine starke interindividuelle Varianz in der Zytokinproduktion, die insbesondere aus den Liniendiagrammen für die einzelnen Zytokine klar ersichtlich wird, wurde auch in der Literatur beschrieben [18, 338, 350]. Die Unterschiede schwankten dabei teilweise vom doppelten bis zum 50fachen der einzelnen Werte [103]. In einer Studie von Kim et al. lag die Streubeite der IFN- γ -Produktion bei Patienten mit atopischer Dermatitis zwischen 0 und knapp 700 pg/ml im verwendeten ELISA-Assay [159].

Die eigenen Ergebnisse zeigten ebenfalls eine hohe Spannbreite zwischen den minimalen und maximalen Spot- oder Flächenwerten, die absolut für IFN- γ am stärksten ausfielen. Es scheint einige Probanden zu geben, bei denen praktisch keine Zytokin-Produktion durch die Mitogenstimulation angeregt wurde. Wenn man von diesen wenigen Probanden und den Ausreißern nach Oben absieht, so schwankten die Werte für IFN- γ etwa zwischen 200 und 1200 Spots, lagen also um das 6fache auseinander. Für IL-4 lagen die Werte in etwa zwischen 50 und 500 Spots und für IL-13 in etwa zwischen 10 und 150 Spots, lagen also um das 10- bzw. 15fache auseinander. Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Literaturangaben überein.

Die hohe Fallzahl der vorliegenden Arbeit ließ eine Stratifikation von Untergruppen zu und hebt sich hierdurch positiv von einigen anderen methodischen Arbeiten ab, da die meisten dieser Arbeiten Ergebnisse von nur sehr wenigen Probanden zeigen, hierbei aber zum Teil ebenfalls erhebliche interindividuelle Schwankungen fanden [62, 274, 18, 338].

Insgesamt blieb das Reaktionsmuster über das Mittel der Probanden hinweg ähnlich, sodass sich auch statistisch signifikante Ergebnisse in Bezug auf die primäre Fragestellung ergaben. Allerdings reagierten auch nicht alle Probanden exakt in der gleichen Weise. Eine geringe Anzahl klarer Reaktionsmuster konnte jedoch nicht gefunden werden und wurde auch nicht mit besonderem Augenmerk untersucht. Auch in anderen Arbeiten wurden unterschiedliche Reaktionsmuster bei der Wirkung von Serotonin auf die Proliferationsrate von PWM-aktivierten Lymphozyten gefunden [82]. Dies zeigt, dass es interindividuelle Unterschiede in Bezug auf die jeweilige Antwort nach einer Kostimulation von Mitogen und Serotonin an gesunden Personen geben kann.

4.2.2 Methodische Einflussfaktoren

Verschiedene methodische Einflussfaktoren können sich auf die interindividuelle Streubreite auswirken, wurden jedoch in dieser Arbeit nicht systematisch untersucht. Zu diskutieren sind auch beispielsweise Unterschiede in der NK-1- Rezeptorexpression. So zeigten Guo et al., dass nur bei einigen der Probanden Substanz P die Sekretion des Makrophagen-inflammatorischen-Proteins 1beta (MIP-1beta) augmentierte. Dies führten die Autoren auf Unterschiede in der Expression des NK-1-Rezeptors zurück und fanden bei zwei der sieben Probanden, die nicht respondierten, keine NK-1-Rezeptorexpression [110].

Insgesamt kann natürlich auch nicht ausgeschlossen werden, dass allein Veränderungen bei der Isolation der PBMCs, Unterschiede in der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hervorgerufen werden. So haben de Groot et al. darauf hingewiesen, dass die Ergebnisse von Versuchen mit PBMCs generell relativ schlecht reproduzierbar seien [108].

4.2.3 Demographische Einflussfaktoren

Eingehender wurden der mögliche Einfluss durch das Geschlecht, das Alter und den Nikotinkonsum untersucht.

4.2.3.1 Geschlecht Nominell zeigte sich, dass bei allen drei Zytokinen Männer sowohl eine höhere Anzahl von SFC als auch eine höhere Zytokin-Produktion im Vergleich zu Frauen aufwiesen. Die Ergebnisse erreichten allerdings nur für einige Bedingungen bei der Bestimmung von IL-13 statistische Signifikanz. Auch bei der längeren Inkubationszeit von IL-13 blieben diese signifikanten Unterschiede bestehen. Dies ist umso bemerkenswerter, als hier die Fallzahl insgesamt deutlich kleiner war und damit eher weniger signifikante Ergebnisse zu erwarten gewesen wären. Allerdings können sich bei kleineren Fallzahlen auch durch Ausreißer falsch positive Befunde ergeben. Es zeigte sich auch, dass das Reaktionsmuster durch die Stimulation mit den einzelnen Neurotransmittern zwischen den beiden Geschlechtern bestehen blieb, Frauen also nicht grundsätzlich eine andere Reaktion als Männer auf die Wirkung von Serotonin, Substanz P oder die Kombination zeigten. Dies scheint insbesondere für IFN- γ und IL-4 zu gelten. Bei IL-13 könnte man Unterschiede in Bezug auf die Wirkung von Serotonin vermuten. So zeigten die Frauen eher eine Verminderung der Anzahl von SFC unter Serotonin, während sich bei den Männern kaum Veränderungen ergaben. Bei den Flächenwerten, also der Zytokin-Produktion selbst, verliefen die Linien der Mittelwertverläufe aber wieder sehr parallel, was darauf hinweist, dass die Menge an produziertem Zytokin nicht unterschiedlich ist. Ob es sich dabei um einen echten Effekt handelt, also bei Frauen weniger Zellen mehr Zytokine produzieren, oder ob die Unterschiede in der Anzahl der SFC im Rahmen der allgemeinen Varianz zu sehen sind, bleibt zunächst offen und müsste in einer Folgestudie genauer untersucht werden.

Auch die aus mehreren Bedingungen neu gebildeten Variablen zur Erfassung der generellen prozentualen Unterschiede, erbrachte statistisch signifikante Ergebnisse zwischen den Geschlechtern bei der Bestimmung von IL-13 zu beiden Inkubationszeiten sowohl für die SFC-Anzahl als auch für die Flächenwerte.

Dass die statistischen Tests für die meisten Bedingungen bei der Bestimmung von IFN- γ und IL-4 keine signifikanten Ergebnisse ergaben, kann möglicherweise auch durch eine nicht ausreichende Power für diese Fragestellung erklärt werden. Die Box-Plot-Diagramme zeigten daneben, dass sich die Varianz der Werte, vor allem für die Frauen deutlich durch die Aufteilung in die Geschlechter verringerte und somit ein Teil der Gesamtvarianz vermutlich tatsächlich durch Geschlechtsunterschiede zu erklären ist. Auch bei den linearen Modellen verblieb das Geschlecht, korrigiert auf das Alter und methodische Einflussfaktoren, als signifikanter Parameter bei der Bestimmung der IL-4- und IL-13-Produktion bestehen. Allerdings blieb die Varianz bei den Männern weiterhin relativ groß, sodass vermutlich weitere Faktoren einen Einfluss haben.

Auch in der Literatur finden sich vermehrt Hinweise für eine geschlechtsspezifische Zytokin-Produktion. Verthelyi et al. konnten in einer Studie nachweisen, dass die Anzahl an Zytokin-produzierenden Zellen von PBMC in ELISpot-Tests direkt mit der Konzentration von Geschlechtshormonen korrelieren. Die Autoren untersuchten dabei prä- und postmenopausale Frauen sowie Männer und fanden, dass prämenopausale Frauen mehr IL-4-sezernierende Zellen nach PHA-Stimulation hatten als post-menopausale Frauen, obgleich diese Ergebnisse nur tendenziell signifikant waren. Eine Regressionsanalyse mit Alter als Covariate zeigte keinen Zusammenhang mit dem Alter der Frauen, sodass die Autoren eher einen Zusammenhang mit der Hormonproduktion sahen. Außerdem fanden die Autoren, dass die Serumkonzentrationen von DHEA-S (Dehydroepiandrosteron-sulfat) signifikant mit der Anzahl spontan IFN- γ -produzierender Zel-

len und die Serumkonzentrationen von 17β -Östradiol mit der Anzahl IL-4-produzierender Zellen nach PHA-Stimulation bei prämenopausalen Frauen korrelierte. Bei post-menopausalen Frauen fanden die Autoren keine Korrelation. Die Anzahl IL-4-produzierender Zellen korrelierte auch signifikant mit der Zyklusphase. Bei Männern korrelierte die Serumkonzentration von DHEA-S mit der Anzahl spontan IFN- γ -sezernierender Zellen, nicht aber nach PHA-Stimulation [334].

Ein Geschlechtsunterschied zwischen Männern und Frauen konnte auch bei intrazellulärer Messung von IFN- γ in Patienten mit Multipler Sklerose festgestellt werden. Dabei zeigten Frauen eine Korrelation zwischen der Zytokinproduktion und dem Schweregrad der Erkrankung, nicht aber die Männer [232].

Pietschmann et al. fanden nur bei Frauen einen Anstieg der intrazellulären IFN- γ -Konzentration im Alter und vermuteten einen Zusammenhang mit dem Rückgang von Östrogenen [258]. Matejuk et al. konnten zeigen, dass Östradiol die Produktion von IFN- γ in murinen Lymphozytenkulturen vermindert [208]. Diese Beobachtungen passen gut zu den eigenen Ergebnisse, nach denen Frauen in jüngerem Alter, also hormonaktiv, eine verminderte Zytokinproduktion zeigen. Andererseits fanden Karpuzoglu-Sahin et al., dass bestimmte Lymphozytenfraktionen Östrogen-behandelter Mäuse nach Stimulation mit Con A eine erhöhte IFN- γ -Produktion zeigen [154]. Dabei wurde argumentiert, dass Unterschiede zwischen einzelnen Studien auch aufgrund der unterschiedlichen Protokolle, Inkubationszeiten und Stimulationsarten entstehen können [258]. Liva et al. konnten in einem Mausmodell zeigen, dass Testosteron direkt über Androgenrezeptoren auf CD4+-Zellen die Produktion von Th2-Zytokinen in männlichen Mäusen steigert, während es die IL-12-Produktion hemmt und damit eher einen Shift von Th1 zu Th2 induziert. Die Unterschiede in der IFN- γ -Produktion zeigten sich nicht signifikant [194]. Auch diese Ergebnisse würden mit den eigenen Beobachtungen übereinstimmen, nachdem vor allem signifikante Ergebnisse für IL-13-sezernierende Zellen gefunden wurden und nicht für IFN- γ -produzierende Zellen.

4.2.3.2 Alter Mögliche Unterschiede in Bezug auf das Alter wurden anhand eines Mediansplits untersucht, der bei 29 Jahren lag. Es zeigte sich generell, dass Probanden mit einem höheren Alter mehr Spots aufwiesen als jüngere Probanden. Die einzige Ausnahme waren die Flächenwerte für IFN- γ , bei denen die Jüngeren die höheren Werte hatten. Keines der Ergebnisse war jedoch statistisch signifikant, sodass insgesamt davon ausgegangen werden muss, dass keine Altersunterschiede bestehen. Die Schwankungen um den Mittelwert waren dabei insgesamt geringer als bei den möglichen Geschlechtsunterschieden. Wiederum blieb das Reaktionsmuster auf die einzelnen Bedingungen erhalten.

Auch bei diesen Ergebnissen stellt sich die Frage, ob die Power zur Beantwortung dieser Fragestellung ausreichend und ob die Altersstruktur geeignet war. Der Mediansplit lag relativ niedrig und die Altersverteilung lag zwischen 23 und 60 Jahren, d.h. die Hälfte der Probanden war zwischen 23 und 29 Jahre alt. Möglicherweise hätten sich deutlichere Altersunterschiede gezeigt, wenn mehr ältere Personen an der Untersuchung teilgenommen hätten. Die Geschlechtsunterschiede lassen ja möglicherweise einen Einfluss von Sexualhormonen vermuten, sodass es auch interessant gewesen wäre, Frauen vor und nach der Menopause zu untersuchen. Dies war jedoch aufgrund der geringen Fallzahl nicht weiter möglich.

Die Korrelationen zwischen Alter und Spot-Anzahl oder den Flächenwerten ergaben ebenfalls keine signifikanten Zusammenhänge. Die stärkste Korrelation ergab sich noch für die Bestimmung von IL-13 bei einer Inkubationszeit von 25 h. Möglicherweise bilden sich interindividuelle Unterschiede also auch erst nach einer längeren Inkubationszeit heraus und die erste Zytokin-Antwort bleibt noch relativ unabhängig vom Alter. Die Werteverteilung lässt aber auch vermuten, dass Ausreißer zu falsch positiven Befunden geführt haben.

In einer Untersuchung von Wahle et al. zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen Alter und der Zytokin-Antwort von Lymphozyten auf eine Stimulation mit Adrenalin. Das durchschnittliche Alter der gesunden Probanden lag in dieser Untersuchung bei $53 \pm 4,2$ Jahren und die Zellen wurden über 48 h inkubiert. Eine Alterskorrelation zeigte sich wohl nur unter Stimulation auf Adrenalin in höheren Konzentrationen und noch nicht durch Aktivierung mit Mitogenen [339]. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass sich bei älteren Probanden und längerer Inkubationszeit Altersunterschiede deutlicher zeigen. Altersun-

terschiede könnten aber auch mit Hormonveränderungen zusammenhängen, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass nicht das Alter direkt der entscheidende Einflussfaktor ist [334]. Auch Pietschmann et al. vermuten einen Einfluss durch unterschiedliche Konzentrationen an Sexualhormonen und nicht per se durch das Alter bei einer Untersuchung, die zeigen konnte, dass ältere Menschen eine veränderte Immunsituation zeigen als jüngere. Ältere Frauen hatten einen höheren prozentualen Anteil für IL-4-, IL-13- und IFN- γ -positive Zellen. Bei den älteren Männern war dies nur für IL-4 und IL-13 der Fall, nicht aber für IFN- γ . Geschlechtsspezifische Unterschiede zeigten sich auch für andere Zytokine [258]. Das Durchschnittsalter der älteren Probanden lag bei dieser Untersuchung bei den Frauen bei 85 Jahren und bei den Männern bei 82 Jahren, sodass zu vermuten ist, dass bei der eigenen Untersuchung die Altersunterschiede deshalb nicht signifikant waren, da die älteren Probanden nicht "alt" genug waren. Den Anstieg der IL-4-Produktion führten Pietschmann et al. auf den Rückgang der Androgenkonzentration zurück, nachdem gezeigt werden konnte, dass bei Patienten mit Hypogonadismus die IL-4-Serumkonzentrationen erhöht sind und durch eine Testosterongabe wieder sinken [358, 163].

4.2.3.3 Nikotinkonsum Ein Zusammenhang zwischen der Zytokin-Produktion und dem Nikotinkonsum der Probanden zeigte sich in dieser Arbeit nicht. In der Literatur sind vielfach Wirkungen von Nikotin auf die Zytokin-Produktion beschrieben, dabei untersuchten die einzelnen Arbeitsgruppen zu meist spezifisch den Effekt von Nikotin auf einzelne Zelltypen des Immunsystems. Einige Arbeiten fanden pro-inflammatorische Wirkungen von Nikotin auf die Zytokin-Produktion, beispielsweise durch eine Minderung der IL-10-Produktion [200, 257, 333], andere Arbeiten auch unspezifische Effekte sowohl auf Th1- als auch Th2-Zytokine. Teilweise waren diese Effekte allerdings erst nach längeren Inkubationszeiten zu beobachten [256]. Daneben gibt es auch Studien, die zeigen, dass Nikotin keinen Effekt auf die IL-4- oder IFN- γ -Produktion von PBMCs hat [37, 134] oder sogar einen inhibierenden Effekt auf die IFN- γ - oder IL-12-Produktion [248, 318, 317] und eher in einem Shift in Richtung Th2 resultiert [237]. Die eigenen Daten widersprechen also der heterogenen Datenlage nicht. Die Unterschiede erklären sich möglicherweise durch die verwendeten methodischen Ansätze oder verschiedenen Modelle.

4.2.4 Genetische Einflussfaktoren

Als weitere mögliche Einflussfaktoren für die Höhe der Zytokin-Antwort wurden Polymorphismen innerhalb der Zytokin-Gene untersucht, die bereits in der Literatur funktionell mit einer unterschiedlich starken Zytokin-Produktion assoziiert waren.

4.2.4.1 IFN- γ -Produktion und CA-Repeat-Polymorphismus, rs3138557 Die Allelverteilung der 32 untersuchten Probanden unterschied sich nicht von der anderer kaukasischer Populationen. Es waren, wie auch in der Literatur beschrieben, nur die Allele 2, 3, 4 und 5 vertreten. In einer asiatischen Vergleichspopulation waren hingegen auch die Allele 1, 6 und 7 vorhanden [266]. Die Allele 2 und 3, die auch in der untersuchten Population am häufigsten vertreten waren, machten insgesamt 89,1% der Allele aus. Allerdings war das Allel 3 in der eigenen Population das häufigste, während Allel 2 bei den Vergleichspopulationen am häufigsten vertreten war. Dies könnte entweder auf Unterschiede innerhalb der kaukasischen Populationen zurück zu führen sein, nachdem die beiden anderen Populationen aus den UK und Dänemark stammen und sich damit von einer süddeutschen Population unterscheiden könnten oder die eigene eher geringe Fallzahl verzerrt das Bild und es handelt sich nur um einen Artefakt. Die Haplotypenverteilung unterschied sich nicht signifikant von einer Vergleichspopulation.

In Bezug auf die IFN- γ -Produktion zeigte sich, dass Träger des Allel 4 die geringste Spot-Produktion aufwiesen und die Werte im Vergleich zu den allgemeinen Mittelwerten bis auf 24% zurückgingen. Probanden, die Allel 3 besitzen, zeigten hingegen eine Steigerung der Spotzahlen. Die Unterschiede zwischen diesen beiden Allel-Trägern waren auch statistisch signifikant. Im Unterschied zu den eigenen Befunden zeigten Pravica et al. an den Überständen von PBMCs von 30 Probanden, dass homozygote Träger

des häufigsten Allels, Allel 2, signifikant mehr IFN- γ produzieren, als die anderen Genotypen [263]. Die Allel 2 Träger der eigenen Stichprobe wiesen ebenfalls eine hohe Spot-Produktion auf, die homozygoten Allel 2-2-Träger zeigten jedoch geringere SFC-Zahlen als die heterozygoten 2-3-Allel-Träger oder die homozygoten 3-3-Träger, die die höchsten Werte aufwiesen. In einer Untersuchung von Warle et al. fanden die Autoren, dass gesunde homozygote TT-Träger des IFNG A874T-Polymorphismus eine höhere IFN- γ -Produktion aufwiesen als die anderen beiden Genotypen, was mit den Ergebnissen von Pravica et al. übereinstimmen würde, da hier das T-Allel mit dem Allel 2 des CA-Mikrosatelliten korreliert werden konnte. Bei Patienten nach einer Lebertransplantation verhielt es sich umgekehrt, obgleich alle Ergebnisse nicht statistisch signifikant waren [343]. In ihrer Arbeit gaben die Autoren auch einen Überblick über die Literatur bis 2003 bezüglich der *in vitro* Zytokin-Produktion von gesunden Probanden oder Patienten im Zusammenhang mit dem A874T-Polymorphismus und dem damit korrelierenden CA-Mikrosatelliten. Signifikante Ergebnisse zeigten sich dabei nur für einen Zusammenhang zwischen erhöhter IFN- γ -Produktion und den homozygoten TT-Allel-Trägern beziehungsweise Allel 2-Trägern. Dies zeigte sich auch bei einem türkischen Patientenkollektiv [281]. Allerdings zeigten bei anderen Studien gesunde Probanden des 3-3-Genotyps die höchsten Zytokin-Konzentrationen [44], teilweise auch die heterozygoten 2-3-Träger [44, 137]. Diese Ergebnisse waren aber jeweils nicht statistisch signifikant. Untersucht wurden jeweils PBMC, die mit PHA, ConA oder Antikörpern gegen CD2/CD3+CD28 stimuliert wurden. Die Inkubationszeiten lagen zwischen 18 und 96 h. Die Fallzahlen waren in der Regel recht klein und unterhalb der Fallzahl der vorliegenden Studie.

Die heterogenen Ergebnisse legen nahe, dass möglicherweise noch andere Faktoren eine Rolle spielen, als nur dieser Genotyp. Als mögliche Erklärung diskutieren Warle et al. Unterschiede zwischen gesunden Probanden und Patienten und der Art der Stimulation [343]. Interessant ist noch zu erwähnen, dass sich das Niveau der Zytokin-Produktion teilweise um den Faktor 1000 unterschied, was auch in der eigenen Untersuchung beobachtet werden konnte.

Eine Interaktion zwischen Genotyp und Alter oder Geschlecht konnte in der eigenen Untersuchung in Bezug auf die Höhe der IFN- γ -Produktion nicht gefunden werden. Eine Studie von Raitala et al. an 309 gesunden Probanden untersuchte einen möglichen Zusammenhang zwischen dem A874G-Polymorphismus und der Aktivität der Indolamin-Dioxygenase (IDO), welche durch IFN- γ induziert wird. Die Autoren fanden einen Zusammenhang nur bei den weiblichen Probanden, was für einen Gen*Geschlecht Effekt spräche [268].

In Bezug auf die Reaktion auf eine Stimulation mit Serotonin, Substanz P oder die Kombination der beiden ergaben sich zwischen den einzelnen Genotypen Unterschiede. Diese wurden nicht näher statistisch aufgrund der geringen Fallzahlen untersucht. Möglicherweise gibt es aber bestimmte Genotypen, die auf eine Stimulation mit beispielsweise Serotonin eher mit einer Erhöhung der IFN- γ -Produktion reagieren, während dies bei anderen eher zu einer Hemmung führt. Dies müsste als eigene Hypothese an einer sehr hohen Fallzahl untersucht werden, um statistisch signifikante Befunde zu erhalten.

4.2.4.2 IL-4-Produktion und C589T-Polymorphismus, rs2243250 Im Gegensatz zum untersuchten Polymorphismus im IFN- γ -Gen unterschied sich die Allel- und Genotypverteilung des C589T-Polymorphismus im IL-4-Gen von anderen kaukasischen Vergleichspopulationen. In der eigenen Stichprobe war der heterozygote C/T-Genotyp am häufigsten vertreten, während ansonsten immer der homozygote C/C-Genotyp am häufigsten vorlag [249, 246, 1]. Eine Ausnahme bildet nur das Kollektiv des PGA-European-Panels, von dem sich die Verteilung zumindest nicht statistisch signifikant unterschied. Die Allelverteilung der eigenen Studienpopulation lag dennoch im Hardy-Weinberg-Equilibrium. Mögliche Erklärungen für die gefundenen Unterschiede können wiederum in der eigenen kleinen Fallzahl liegen. Auch die Fallzahl des PGA-European-Panels war mit 46 Probanden für genetische Untersuchungen sehr klein. Aber auch unterschiedliche Genotyp-Verteilungen innerhalb kaukasischer Populationen könnten eine Erklärung sein, wie dies für einige Polymorphismen von Zytokin-Genen nachgewiesen werden konnte [41].

In Bezug auf die Stärke der IL-4-Produktion ergaben sich interessante Ergebnisse. Während sich kein Unterschied in der Anzahl von SFC oder der Flächenwerte, also der Zytokin-Produktion zwischen den T-Allel-Trägern und den homozygoten C/C-Allel-Trägern ergab, zeigten sich Interaktionen zwischen dem Genotyp sowie Alter und Geschlecht. In einem allgemeinen linearen Modell, das insgesamt 51% der Varianz erklärt, waren sowohl die Faktoren Geschlecht, Genotyp als auch die Interaktion von Alter*Genotyp statistisch signifikant. Konkret zeigte sich, dass bei den älteren männlichen Probanden die jeweiligen Genotypen eine unterschiedlich starke Zytokin-Produktion aufwiesen, während dies bei den Frauen nicht der Fall war. Bei den jüngeren Probanden wiederum waren die Geschlechtsunterschiede größer, die einzelnen Genotypen unterschieden sich jedoch nicht wesentlich voneinander. Im Gegensatz hierzu zeigten Paffen et al., dass sich die Genotypen in Bezug auf das Risiko eines myokardialen Infarktes vor allem in jüngeren Jahren (< 50 Jahre) unterscheiden, während dies bei den älteren Probanden (> 50 Jahre) nicht der Fall war [249]. Diese Unterschiede könnten möglicherweise auf die Genotyp- und Altersverteilung in der Studie von Paffen et al. im Gegensatz zur Verteilung der vorliegenden Arbeit zurückzuführen sein. Dennoch unterstützen diese Daten die beobachtete Gen*Alter-Interaktionen prinzipiell. Ein Gen*Geschlecht Effekt wurde in einem weiteren spanischen Kollektiv nicht gefunden [249]. Insgesamt zeigte sich bei den beobachteten Interaktionen der vorliegenden Studie, dass das T-Allel eher zu einer verminderten IL-4-Produktion führt. Dies steht im Gegensatz zu einigen bisher publizierten Daten, die das minore T-Allel eher mit einer erhöhten IL-4-Produktion assoziieren konnten und damit zu einer verstärkten Th2-Antwort und allergischen Reaktionen. Allerdings konnten viele dieser Studien einen Zusammenhang nur bei bestimmten Subgruppen beobachten [193, 149]. Einige Studien fanden auch gar keinen Zusammenhang zwischen dem C589T-Polymorphismus und IgE-Konzentrationen [70, 267, 234, 341, 136]. In einer Studie von Olson et al. zeigten die T-Allel-Träger wiederum ein geringeres Risiko für Allergien, was eher für eine verminderte IL-4-Produktion spräche [246]. Im direkten Vergleich zeigten sich keine Unterschiede zwischen den T-Allel-Trägern und den C/C-Homozygoten in der eigenen Arbeit. Wie das in einem größeren Kollektiv ausgesehen hätte, kann nicht sicher vorhergesagt werden. In nicht-kaukasischen Populationen findet sich das T-Allel in bis zu 70% der Bevölkerung. Rockman et al. postulierten in diesem Zusammenhang, dass die starke Diversität in den Allel-Frequenzen auf unterschiedliche Adaptionsmechanismen gegenüber Umweltpathogenen zurückgeführt werden könne [272].

Die Aussagekraft des linearen Modells muss insgesamt als eingeschränkt angesehen werden, da keine Normalverteilung vorlag, dennoch könnten die eigenen Befunde eine interessante Grundlage für weitere Replikationen sein.

4.2.4.3 IL-13-Produktion und A4257G-Polymorphismus, Gln (Q) zu Arg (R), rs20541

Beim untersuchten A4257G Polymorphismus im IL-13 Gen stimmten sowohl die Allel- als auch Genotyp-Verteilung sehr gut mit der publizierten Literatur überein. Die Verteilung wich ebenfalls nicht vom Hardy-Weinberg-Equilibrium ab.

In Bezug auf die Stärke der IL-13-Produktion zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen, trotz nomineller Unterschiede. Die höchsten Werte wiesen die G/G-Homozygoten, also die Träger der Arginin-Arginin-Variante auf. Auch bei der längeren Inkubationszeit zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. In der Literatur wird dieser Polymorphismus mit erhöhten IgE-Spiegeln, erhöhten Eosinophilenzahlen, atopischer Dermatitis, Asthma und anderen Erkrankungen in Verbindung gebracht [22, 47, 342, 146, 107, 123, 192]. Das A-Allel wurde außerdem mit erhöhten IL-13-Konzentrationen bei Patienten mit Asthma assoziiert [336, 11]. Dies steht in Kontrast zu den hier vorliegenden Ergebnissen, wonach die homozygoten G-Allel-Träger höhere Spot-Zahlen aufwiesen. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied könnte sein, dass sich dieser funktionelle Polymorphismus bei Patientenkollektiven anders auswirkt als dies bei gesunden Probanden der Fall ist. Diese These wird von Befunden von Wiemels et al. unterstützt, die eine inverse Korrelation des Q130R-Polymorphismus und IgE-Spiegeln bei den Kontrollpersonen fanden. Während Patienten mit der A-Allel-Variante erhöhte IgE-Spiegel aufwiesen, lagen die IgE-Spiegel bei den Gesunden am höchsten für die G-Allel-Träger

[348]. Generell führen Einzelbefunde genetischer Polymorphismen oftmals zu widersprüchlichen Ergebnissen, da auch Wechselwirkungen mehrerer Polymorphismen berücksichtigt werden müssen. So findet sich eine Wechselwirkung mit dem G2044A-Polymorphismus [303]. Weitere Erklärungen für unterschiedliche Ergebnisse in der Literatur können auch in unterschiedlichen Fallzahlen, verschiedenen Ethnizitäten oder methodischen Unterschieden begründet liegen. So fanden viele Studien auch keine Assoziation des Q130R-Polymorphismus mit erhöhten IgE-Werten [123, 144, 45].

Eine Interaktion zwischen Genotyp sowie Alter und Geschlecht konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gefunden werden. Andere Arbeitsgruppen konnten bei Patienten mit Psoriasis eine Gen*Umwelt-Interaktion zwischen dem Q130R-Polymorphismus und dem Raucherstatus zeigen [73].

4.3 Methodik

4.3.1 Zellkulturarbeiten mit PBMC

Die Isolation von PBMC aus Blut ist ein gängiges Verfahren, für das sich in der Literatur viele leichte Abwandlungen finden. Die in dieser Arbeit durchgeführten Schritte entsprechen dabei im Wesentlichen den in der Literatur beschriebenen Protokollen und sollen daher nicht näher diskutiert werden.

Die Verwendung von PBMC im Gegensatz zu Assays in Vollblut oder mit angereicherten Zellpopulationen, Buffy Coats oder Zelllinien bedarf jedoch einer kurzen Diskussion, bevor die einzelnen methodischen Versuchsanordnungen des ELISpot-Verfahrens diskutiert werden.

Whole-Blood-Assays haben den prinzipiellen Vorteil, die Bedingungen *in vivo* näher widerzuspiegeln, als dies durch die Isolierung von PBMC möglich ist, allerdings sind Effekte von Neurotransmittern auf einzelne Zelltypen schlechter abzugrenzen und die Zellzahlen sind weniger gut kontrollierbar. Als weiterer Nachteil erweist sich bei Whole-Blood-Assays die Tatsache, dass Zytokinpiegel oftmals sehr niedrig ausfallen und teilweise nicht mehr nachweisbar sind [357]. Andere Arbeitsgruppen konnten jedoch zeigen, dass die Ergebnisse von Versuchen mit PBMC generell relativ schlecht reproduzierbar und Techniken, die Whole Blood verwenden, unterlegen seien, da der Erhalt des Plasmas sich positiv auf das Überleben der Zellen auswirken soll [108]. Maes et al. haben in einem Whole-Blood-Assay die Effekte verschiedener Antidepressiva auf die Zytokinproduktion gemessen und verweisen ebenfalls auf den Vorteil der Whole-Blood-Assays in Bezug auf die erhöhte Reproduzierbarkeit [201]. Kramer et al. wiesen auf die hohen Varianzen in Versuchen mit mehreren gesunden Probanden zur Etablierung eines Protokolls für Whole-Blood-Assays hin [169]. Auch kann sich das Monozyten-Lymphozyten-Verhältnis durch eine Isolation von PBMC verändern. Es muss daher einschränkend angemerkt werden, dass bei Untersuchungen an PBMC vor allem die Auswirkungen auf Lymphozyten und nur in geringeren Mengen auf Monozyten untersucht werden (siehe auch 3.2.1.3 auf Seite 38).

Die Verwendung von Buffy Coats zeigt den prinzipiellen Nachteil, dass inter- und intraindividuelle Unterschiede nicht untersucht werden können. Das Arbeiten mit Zellen aus bestimmten Zelllinien bringt den Vorteil, dass die Zellen gleichmäßiger auf eine Stimulation reagieren und somit die allgemeine Varianz von Mehrfachbestimmungen sinkt. Allerdings lassen sich die erhaltenen Ergebnisse nicht einfach auf die Gegebenheiten *in vivo* bei gesunden Probanden übertragen und interindividuelle Unterschiede können nicht berücksichtigt werden.

Die Anreicherung einzelner Zellpopulationen mittels FACS-Analysen oder magnetischer Zellsortierung bietet den Vorteil, klare Aussagen über das Verhalten ganz bestimmter Zelltypen machen zu können, allerdings sind die Ergebnisse ebenfalls nur bedingt auf die Bedingungen *in vivo* übertragbar, da ein Zusammenspiel verschiedener Zelltypen nicht mehr möglich ist.

Insofern stellt die Untersuchung von PBMC einen Kompromiss zwischen den am stärksten verallgemeinerbaren Ergebnissen aus Whole-Blood-Assays und spezifischeren Aussagen in Bezug auf einzelne Zelltypen dar. Außerdem sind bei Arbeiten mit PBMC die Isolierverfahren gut etabliert, die Zellzahlen kontrollierbar und die Produktion von Zytokinen in der Regel ausreichend hoch.

4.3.2 Methodenentwicklung

In Tabelle 2.2.15.1 auf Seite 25 sind die Variationen der Methodik, die in dieser Arbeit Anwendung fanden, dargestellt.

Die durchgeführten Veränderungen dienten dem Erhalt gleichmäßiger Ergebnisse und einer Verringerung der Varianz. Dabei sollten die Spots sowohl quantitativ bei allen Probanden auszuwerten sein, als auch qualitativ so vom Hintergrund der Nitrozellulosemembran abzugrenzen sein, dass eine Auswertung mit dem ELISpot-Reader durchgehend möglich war [151].

Wie aus den Abbildungen 7.11.1.1 und 7.11.1.2 auf Seite 138 ersichtlich, konnte durch die Methodoptimierungen ein scharfer Kontrast zwischen den Spots und der Membran erzielt werden, sodass die automatisierte Erfassung der Spots durchgehend möglich war. In einzelnen Fällen musste die ELISpot-Software so angepasst werden, dass alle Spots erfasst wurden.

Weitere mögliche Gründe für eine Anfärbung der Nitrozellulosemembran können zu lange Inkubationszeiten bei der Farbreaktion, ein fehlender Blockierschritt oder die Art und Weise der Waschvorgänge sein. Es wurde daher empfohlen, die Farbreaktion zu überwachen, um eine zu starke Färbung beobachten zu können [62], was durchgehend erfolgte.

Die Waschschriffe wurden mit PBS durchgeführt, was so auch in der Literatur Anwendung findet, teilweise mit einem Zusatz von 0.05% Tween [62, 79, 290, 297, 332]. In der vorliegenden Arbeit erwies es sich außerdem von Vorteil, die Platten nach fünf Waschdurchgängen nochmals mit einer Spritzflasche auszuwaschen. Die Farbreaktion selbst wurde, wie auch in der Literatur beschrieben, mit a.d. gestoppt [18, 85, 151, 182].

Ein Blockierschritt zur Sättigung der freien Proteinbindungsstellen der Nitrozellulosemembran wurde durch das Abwaschen des 1. Antikörpers mit Lösung II und Inkubation der Platten mit Medium für 30 min gewährleistet. In der Literatur wurde hierfür teilweise ebenfalls mit RPMI-1640 Medium mit FCS-Zusatz gearbeitet [62, 151, 182] und Zeiten zwischen 20 min [62, 332, 151] und 120 min angegeben [85]. Die meisten Arbeiten führten jedoch einen separaten Blockierschritt durch und wuschen den 1. Ak mit PBS ab [62, 61, 290], teilweise angereichert mit fetalem Kälberserum [332] oder 0.05% Tween [79].

Ein weiteres Ziel war es, bei keinem der Leerwert-Wells Spots zu erhalten, was auf eine unspezifische Stimulation hingedeutet hätte. Dies war nur möglich durch die Verwendung von Antibiotika, wie aus den linearen Modellen von Punkt 3.3.1.1 auf Seite 38 klar hervorgeht. Bei den Versuchen ohne Antibiotikaverwendung fanden sich durchschnittlich noch 22,5 Spots bei der Bestimmung von IFN- γ gegenüber 3,76 Spots unter Verwendung von Antibiotika, bzw. 9,72 Spot und 0,64 Spots für IL-4 sowie 32,18 bzw. 0,94 Spots für IL-13 (siehe Tabelle 3.3.1.2 auf Seite 39). Diesbezüglich ist es von Interesse, dass Arbeiten, die ohne die Verwendung von Antibiotika auskamen, in der Literatur in diesem Bereich nicht gefunden werden konnten.

Auch die Reinheit der Lösung zeigte sich als möglicher Einflussfaktor auf die Varianz der Ergebnisse. Um für diesen Faktor kontrollieren zu können, wurden alle Zellsuspensionen sowohl vor Beginn der Versuchsreihen als auch am Ende der Inkubation auf den Platten mikroskopisch bewertet. Es zeigte sich dabei, dass Lösungen, die zu Beginn die Wertung "kontaminiert" oder "verdächtige Strukturen" erhielten, relativ mehr Spots bei den Leerwerten zeigten (siehe 3.3.2 auf Seite 44), sodass diese Proben für die Endauswertung ausgeschlossen wurden. Bei der endgültigen Stichprobe kamen durch die Verwendung von Antibiotika kontaminierte Proben nicht mehr vor und die Zellsuspensionen wiesen durchgehend einen sehr hohen Reinheitsgrad auf (siehe Tabelle 3.4.1.1 auf Seite 51, 3.4.1.2 auf Seite 52 und 3.4.1.3 auf Seite 52).

Die noch verbliebene durchschnittliche Spot-Entwicklung bei der Bestimmung von IFN- γ in den Leerwerten geht möglicherweise auf eine Spontanstimulation zurück. So konnte gezeigt werden, dass sich im Blut gesunder Probanden etwa 1-3 IFN- γ -produzierende Zellen/1000 MNC befinden, ohne *in vitro* Kultivierung oder Stimulation. Diese Anzahl ist bei Neugeborenen etwas höher [206, 250]. Hierdurch kann es durch eine bereits *in vivo* erfolgte Stimulation zur Produktion von IFN- γ in Versuchsreihen kommen, sodass geringe Spotzahlen in den Leerwerten durchaus üblich sind. Favre et al. beschreiben etwa 49-55

Spot-forming Cells (SFC)/Mausmilz als Hintergrundaktivität [85]. In einer Arbeit von Ronnelid et al. fanden sich sogar bis zu 100 SFC/10⁵ PBMC in nicht-stimulierten Zellen als Spontanproduktion von IFN- γ bereits nach 2-4 h Inkubation [274]. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Anzahl im Hinblick auf diese Angaben sehr minimiert werden. Kritisch muss außerdem bei einigen Arbeiten der Literatur angemerkt werden, dass die verwendete Kontrolle oftmals zellfreies Kulturmedium umfasst und nicht eine Zellsuspension ohne Hinzugabe von Mitogenen oder anderen Antigenen. Hierdurch kann für eine mögliche Spontanproduktion nicht kontrolliert werden [18].

4.3.2.1 Inkubationszeiten und -bedingungen Der erste Antikörper wurde wie vom Hersteller empfohlen über Nacht inkubiert [3]. Die mittlere Inkubationszeit war dabei 21.08 Std. mit einer Standardabweichung von 1.39 Std. für die endgültige Stichprobe, wobei diese Inkubationszeit auch bei den ersten Versuchsreihen in einem sehr ähnlichen Zeitraum lag.

Eine einheitliche Inkubationszeit für die Stimulation der Zellen zu entwickeln erwies sich als schwieriger. Zum einen wurden verschiedene Vorinkubationsvariationen ausgetestet, wobei sich letztendlich eine native Vorinkubation der Zellen ohne Stimulation als am günstigsten erwies, um keine Agglutination der Zellen hervorzurufen. Die durchschnittliche Vorinkubationszeit lag am Ende bei 2.45 Std. (SD 0.30 Std.).

Die ersten Vorversuche zeigten, dass für eine Produktion von IFN- γ relativ kurze Inkubationszeiten der Zellen in den Platten ausreichend waren. Für die Detektion von IL-4 genügten ebenfalls Zeiten von etwa 15 h. Bei der endgültigen Stichprobe lag die durchschnittliche Inkubationszeit für IFN- γ bei 16.11 Std. (SD 0.46 Std.) und für die Interleukine bei 15.39 Std. (SD 0.48 Std.). Für IL-13 musste diese Zeit allerdings verlängert werden und es wurden parallel auch Platten mit durchschnittlich 25.50 Std. (SD 0.56 Std.) inkubiert. Allerdings wurde dies erst zu einem späteren Zeitpunkt eingeführt, sodass die Fallzahl für diese Inkubationszeit deutlich geringer ausfiel.

In der Literatur finden sich sehr unterschiedliche Inkubationszeiten. Czerkinsky et al. inkubierten über 20 h bei 37 °C und gaben an, dass maximale Spotzahlen bereits nach 12-14 h erhältlich waren und diese über die nächsten 10-12 h konstant blieben [61]. In anderen Arbeiten wurden Inkubationszeiten zwischen 3-5 h [62] und bis zu 3 Tagen verwendet [297]. Wagner et al., die die Wirkung von Substanz P auf die IFN- γ Produktion untersuchten, inkubierten zwischen 24 und 48 h [338], ebenso ElGhazali [79]. Ronnelid et al. zeigten, dass die Detektion von IL-4 im Vergleich zu IFN- γ längere Inkubationszeiten erforderlich mache [274, 350]. Dies war in der vorliegenden Arbeit nicht der Fall, obgleich die Anzahl an SFC zwischen IFN- γ und IL-4 bei der Inkubationszeit von 15 h deutlich unterschiedlich hoch lag.

Die Inkubation des zweiten Antikörpers wurde zuletzt über Nacht bei 4 °C durchgeführt, aufgrund von Hinweisen, dass dies zu einem geringeren Auftreten von Randeffekten führen soll [290]. Andere Arbeiten bevorzugten eine Inkubation bei Raumtemperatur [61, 79, 85, 332, 297]. In zwei Arbeiten von Czerkinsky et al. werden beide Methoden als wohl eher gleichwertig angegeben und die Methode angewandt, die aus Zeitgründen einfacher anzuwenden war [63, 62]. Nachdem die genaue Zeit für die Ergebnisse anscheinend von untergeordneter Rolle zu sein scheint, wurde aus Gründen der Vereinfachung die Platten mit einer Inkubationszeit von 15 h mit durchschnittlich 22.51 Std. (SD 2.00 Std.) inkubiert und die zweite Platte für IL-13 mit 13.05 Std. (SD 0.51 Std.), um alle vier Platten gemeinsam weiterverarbeiten zu können.

Die Einzymreaktion erfolgte relativ streng über 2.02 Std. (SD 0.12 Std.) und die Farbreaktion benötigte durchschnittlich 2.03 Std. (SD 0.18 Std.).

4.3.2.2 Plattenaufteilung Um für mögliche Randeffekte kontrollieren zu können, wurden die Platten in der vorliegenden Arbeit so aufgeteilt, dass für alle Bedingungen jeweils nur ein Well am Rand lag. Außerdem wurde mit Dreifachwerten gearbeitet, um im Falle eines Einflusses des Well-Ortes noch mit Doppelwerten arbeiten zu können. Die meisten Arbeitsgruppen verwendeten Doppelwerte, manche auch Dreifachwerte [18, 61, 62]. Allerdings lagen die Wells zur Bestimmung des erst später eingeführten Parameters Serotonin in einer Konzentration von 10⁻⁴ mol/l (SER_4) aus methodischen Gründen nur am Rand.

Ein vermuteter Einfluss des Well-Ortes konnte in den allgemeinen linearen Modellen klar gezeigt werden. Um die Inter-Well-Variabilität zu vermindern, führten Kalyuzhny et al. die Verwendung von Alufolie ein, welche um die Platten gewickelt wurde, um mögliche unterschiedliche Inkubationsbedingungen im Brutschrank am Rand zu vermindern [151]. Das Hauptaugenmerk lag bei dieser Methodenvariation auf der Verminderung dunkler Hintergründe der Plattenmembranen. Da dieses methodische Problem in der vorliegenden Arbeit auch ohne die Verwendung von Alufolie verhindert werden konnte, wurde auf Alufolie verzichtet. Ob der dennoch nachgewiesene Randeffect durch die Verwendung von Alufolie hätte verhindert werden können, bleibt nachträglich unklar und könnte Gegenstand weiterer methodischer Untersuchungen sein. Ein mathematisches Modell, was den Einfluss des Well-Ortes belegt, wurde bisher in den Arbeiten der Literatur nicht angewandt, sodass es offen bleibt, ob nicht bei entsprechender Fallzahl auch bei den Arbeiten anderer Autoren Randeffecte bestehen blieben.

Insgesamt zeigte sich, dass bei den Wells am Rand andere Spot-Zahlen gefunden wurde oder die Varianz zwischen den beiden Zeitpunkten höher war.

4.3.2.3 Gesamtvolumen im Well Das Gesamtvolumen im Well wurde in der Literatur unterschiedlich hoch angegeben und lag zwischen $100\ \mu\text{l}$ [79, 18, 62, 151, 61], $150\ \mu\text{l}$ [297] und $200\ \mu\text{l}$ [61, 332]. Die eigenen Vorversuchsreihen zeigten einen Vorteil für höhere Volumina, da hierbei der pH-Wert des Mediums während der Inkubationszeiten konstanter blieb und die Varianz der Werte insgesamt abnahm.

4.3.3 Konzentrationsbereiche

4.3.3.1 Antikörper Die Konzentrationsangaben für den 1. Antikörper variieren in der Literatur zwischen $4\ \mu\text{g/ml}$ [85] und $15\ \mu\text{g/ml}$ [61]. In der vorliegenden Arbeit war eine Konzentration von $7,5\ \mu\text{g/ml}$ für alle drei Zytokine ausreichend. Unterschiede zu höheren Konzentrationen fanden sich bei den Vorversuchen keine.

Der zweite Antikörper wurde nach den Angaben des Herstellers in einer Konzentration von $1,0\ \mu\text{g/ml}$ eingesetzt [3], wie sich das auch in der Literatur findet [61, 274, 297, 78].

4.3.3.2 PHA Zur Grundstimulation der Zellen wurde in dieser Arbeit PHA verwendet. Die Vorversuchsreihen zeigten, dass ohne eine Stimulation mit PHA keine Zytokinproduktion durch die Hinzugabe von Serotonin oder Substanz P auftrat. Bei den Leerwerten lag die Spontanrate von IFN- γ -sezernierenden Zellen unterhalb der Spontanraten in anderen Arbeiten [334, 116]. Außerdem zeigte sich eine deutliche Dosis-Wirkungskurve unter der Stimulation mit PHA für alle drei Zytokine. In der Literatur wurde ebenfalls oft mit PHA gearbeitet, die verwendeten Konzentrationsbereiche lagen zwischen $0,25\ \mu\text{g/ml}$ und $10\ \mu\text{g/ml}$ [79, 297, 61, 338, 18]. Die zuletzt eingesetzten Konzentrationen von $1,0\ \mu\text{g/ml}$ für die Bestimmung von IFN- γ und $3,0\ \mu\text{g/ml}$ für die Bestimmung der beiden Interleukine ergaben sich aus den Vorversuchsreihen und stellten die optimalen Konzentrationen dar, um bei allen Probanden eine zur Quantifizierung ausreichende, aber nicht zu hohe Spotzahl zu erzielen.

4.3.3.3 Zellkonzentration Auch bei der eingesetzten Zellkonzentration war es das Ziel bei allen Probanden eine ausreichende, aber nicht zu hohe Spotzahl zu erhalten. In einer Untersuchung von Bailey et al., die bei acht Probanden und drei verschiedenen Zellkonzentrationen (5×10^6 , 5×10^5 und 5×10^4 Zellen/ml) die Zytokinproduktion (u.a. von IL-4, IL-13 und IFN- γ) bestimmten, zeigte sich, dass für jeden Probanden ein stark unterschiedliches Niveau an Zytokinproduktion existiert. Für einen Probanden konnte also eine bestimmte Zellkonzentration zur Quantifizierung der Spots optimal sein, während die selbe Konzentration bei anderen Probanden entweder zu zu vielen oder zu wenigen Spots führte. Die Autoren schlossen, dass zur optimalen Quantifizierung vorab die jeweilige Zellkonzentration für den jeweiligen Probanden gefunden werden sollte [18]. Da in der vorliegenden Arbeit gerade die interindividuellen Unterschiede einen Hauptschwerpunkt der Ergebnisse bilden, wäre ein solches Vorgehen jedoch nicht zielführend gewesen. Vielmehr musste lediglich eine Zellkonzentration gefunden werden, die in den allermeisten Fällen

den eingangs genannten Kriterien entsprach. Für eine Detektion von IFN- γ zeigte sich eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml und für die beiden Interleukine von 2×10^6 Zellen/ml als optimal. In der Literatur finden sich Konzentrationsbereiche zwischen 10^3 bis 10^6 Zellen/Well [85, 332, 151, 61, 62, 79].

4.3.3.4 Konzentration und Lösen von Substanz P Erste Vorversuchsreihen mit verschiedenen Konzentrationen von Substanz P (10^{-6} mol/l bis 10^{-12} mol/l) dienten der Bestimmung einer optimalen Konzentration zur Klärung der Hauptfragestellung. Dabei konnte in der vorliegenden Arbeit keine konzentrationsabhängige Wirkung von Substanz P festgestellt werden. Die eingesetzte Konzentration sollte jedoch einer physiologischen Konzentration möglichst nahe kommen. Wie hoch diese ausfallen darf, ließ sich der Literatur jedoch nicht zweifelsfrei entnehmen.

Frühe Arbeiten zeigten SP-Konzentrationen zwischen 3×10^{-11} und 5×10^{-10} mol/l im Blut [235, 300, 354]. In der humanen Darmmukosa wurden auch Konzentrationen bis 10^{-7} mol/l gemessen [34, 175]. Die Arbeitsgruppen, die eine Wirkung von Substanz P untersuchten, verwendeten Konzentrationen zwischen 10^{-6} bis 10^{-7} mol/l [174], 10^{-8} mol/l [182], Konzentrationsreihen zwischen 10^{-9} und 10^{-11} mol/l [159] oder zwischen 10^{-6} und 10^{-12} mol/l [338] und beriefen sich dabei jeweils auf andere Literaturstellen, die diese Konzentrationen als weitgehend physiologisch ansahen [159, 236, 360]. Gordon et al. testeten im Konzentrationsbereich von 10^{-4} bis 10^{-16} mol/l und fanden ebenfalls keinen klaren konzentrationsabhängigen Effekt [103]. Insgesamt lag also die verwendete Konzentration von 10^{-10} mol/l in einem mittleren Bereich, der in keinem Widerspruch zu möglichen physiologischen Konzentrationen steht.

Zum Löseverfahren von Substanz P fanden sich keine einheitlichen Angaben. Verwendet wurden PBS mit und ohne Zusatz von 0,5% Albumin [182, 338, 211], steriles Wasser [103], Tyrods-Puffer oder Salzsäure. Dabei muss kritisch angemerkt werden, dass in den meisten Publikationen nicht erwähnt wird, ob das verwendete Trägermittel einen Einfluss hatte oder ob Kontrollen mitliefen. In einigen Arbeiten wurde das Trägermittel auch gar nicht benannt [174].

In der eigenen Arbeit wurden in Vorversuchen mögliche Löseverfahren für Substanz P untersucht und die Konzentrationsreihen durch ELISA-Bestimmungen kontrolliert. Insgesamt erwies sich eine auf 37°C vorgewärmte, physiologische und sterile NaCl-Lösung als bestes Lösemittel ohne einen eigenen Einfluss in den Kontrollen zu zeigen. Bei keinem der drei Zytokine zeigte sich bei der endgültigen Stichprobe durch den Zusatz von NaCl eine signifikante Veränderung gegenüber der alleinigen Stimulation mit PHA oder Serotonin.

Allerdings ist einschränkend zu erwähnen, dass sich bei den Vergleichen einer Stimulation von SER_SP gegenüber einer Stimulation mit SER_NaCl teilweise leicht abweichende Ergebnisse gegenüber den Vergleichen von SER_SP gegenüber SER_5 zeigten. Hierbei ist anzumerken, dass die absoluten Unterschiede nur sehr gering waren, sodass bei kleinen Schwankungen der Spot-Zahlen zwischen den Bedingungen SER_5 und SER_NaCl, welche prinzipiell nicht statistisch unterschiedlich waren, sich dennoch andere Ergebnisse im Vergleich mit der dritten Bedingung SER_SP ergeben können. Dies ist aber vermutlich eher auf die allgemeine Varianz der Versuchsreihen zurückzuführen und spricht noch nicht für einen Einfluss von NaCl. Dies zeigt aber die grundsätzliche methodische Schwierigkeit beim Nachweis kleiner Effekte in einer Gruppe von Probanden, die sowohl intra- als auch interindividuelle Unterschiede zeigen.

4.3.3.5 Konzentration von Serotonin Analog wie bei SP musste auch für Serotonin eine Konzentration bestimmt werden, die zur Klärung der Hauptfragestellung verwendet werden sollte. Dabei zeigte sich bei den Vorversuchsreihen, dass für Serotonin ein Dosis-Wirkungszusammenhang besteht. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen wurden bei der endgültigen Versuchsreihe zwei Konzentrationen von Serotonin untersucht: 10^{-4} und 10^{-5} mol/l. Die Ergebnisse hierzu werden unter Punkt 4.1.2 auf Seite 83 genauer diskutiert.

In der Literatur wurde Serotonin in Konzentrationen von 10^{-3} mol/l [301], 10^{-4} mol/l [147, 126] oder in Konzentrationsreihen zwischen 10^{-4} und 10^{-7} mol/l [240, 241] eingesetzt. Teilweise wurde dabei allerdings an Tiermodellen gearbeitet [147]. Vor allem bei höheren Konzentrationen stellt sich die Frage, ob

sich eine toxische Wirkung der eingesetzten Substanz ergeben könnte. Slauson et al. zeigten diesbezüglich eine inhibierende Wirkung von Serotonin auf die Lymphozyten-Proliferation bei Konzentrationen von 10^{-3} mol/l und konnten nachweisen, dass Serotonin auch in diesem Konzentrationsbereich nicht toxisch wirksam ist [301]. In der vorliegenden Arbeit wurden zu Beginn und am Ende der Versuchsreihen Vitalitätsbestimmungen mit einer Trypanblau-Färbung durchgeführt und die Zellzahlen nach Inkubation auf den ELISpot-Platten stichprobenartig bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass auch am Ende der Versuchsreihen noch eine ausreichende Anzahl vitaler Zellen vorhanden war. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch höhere Mengen Serotonin vor allem die Proliferationsrate der Lymphozyten gemindert wurde und nicht so sehr die Produktion an Zytokinen. Ein interessanter Ansatz wäre gewesen, zusätzlich eine mögliche Apoptose-Induktion durch Serotonin zu messen, wie dies eine Arbeitsgruppe bei der Wirkung von Katecholaminen auf die Zytokinproduktion getan hatte [339].

4.4 Limitationen

In diesem letzten Abschnitt sollen noch einige Limitationen und Stärken der Studie diskutiert werden.

Eine Stärke der Untersuchung war sicherlich, die für Arbeiten auf diesem Gebiet hohe Fallzahl. Die Fallzahl war jedoch nicht ausreichend groß, um interindividuelle Unterschiede, vor allem im Bezug auf das Alter oder bestimmte genetische Polymorphismen einwandfrei zu bestätigen oder auszuschließen. Da die Untersuchung möglicher interindividueller Unterschiede nicht die primäre Fragestellung war, wurde keine Power-Analyse *a priori* durchgeführt. In Bezug auf die Hauptfragestellung ist die Datenlage bisher so ungenügend, dass ebenfalls keine Power-Analyse über Angaben der Literatur möglich war.

Einige methodische Einschränkungen, die allgemeiner Natur sind, gelten auch für diese Studie. So sind gewonnene Daten aus Versuchen mit PBMCs oft recht schlecht reproduzierbar. Die allgemeine Varianz der Ergebnisse war beträchtlich, sodass statistisch signifikante Ergebnisse nur schwer zu erhalten waren. Hierauf wurde mit einer sehr strengen statistischen Korrektur reagiert. Des Weiteren wurde versucht durch mathematische Modelle einige methodische Einflussfaktoren auszuschließen, um nicht zu viele Artefakte einzubeziehen. Auch dies ist sicherlich als Stärke der Studie zu bewerten.

Interindividuelle Unterschiede in der Zytokinproduktion können durch vielfältige Mechanismen bedingt sein. Hierunter fallen neben Alters-, Geschlechts- und Geneffekten auch Unterschiede in der Stabilität der Stimulation, Translation in Polypeptide, Zytokinfaltung, post-translationale Modifikationen, die intrazelluläre Stabilität der Proteine, deren Transport und Exozytose. All diese Faktoren wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht und könnten aber unter Umständen auch die interindividuelle Varianz erklären.

In der vorliegenden Arbeit wurden auch keine Hormonkonzentrationen oder die Zyklusphase erfasst, sodass keine Aussage getroffen werden konnte, ob die interindividuellen Unterschiede in Bezug auf mögliche Geschlechts- und Alterseinflüsse durch diese Einflussfaktoren hervorgerufen wurden. In zukünftigen Untersuchungen sollten diese wichtigen Einflussgrößen erfasst werden.

Trotz all dieser Limitationen konnte in der vorliegenden Untersuchung gezeigt werden, dass eine kombinierte Stimulation peripherer Blutlymphozyten mit Substanz P und Serotonin zu einer gesteigerten Zytokinproduktion gegenüber der jeweiligen alleinigen Stimulation führt und soziodemographische und genetische Faktoren für die interindividuellen Unterschiede mitverantwortlich sind.

5 Zusammenfassung

Das Immunsystem gliedert sich in verschiedene funktionelle Zellsysteme. Die T-Helfer-Zellen spielen bei der Organisation des Immunsystems eine herausragende Funktion. Um Abwehrfunktionen und andere immunologische Prozesse zu regulieren, bedienen sich die Th-Zellen unterschiedlicher Zytokine. Neben Rezeptoren für Zytokine tragen Lymphozyten auf ihrer Zelloberfläche auch Rezeptoren für Neurotransmitter und Neuropeptide. Über solche Rezeptoren kann das Nervensystem eine regulierende Wirkung auf die Zellbestandteile des Abwehrsystems ausüben. Dabei können periphere Nervenendigungen an Blutgefäßen, in Lymphknoten oder Organen, die mit lymphatischem Gewebe ausgestattet sind, wie Darm oder Lunge, durch Ausschüttung ihrer Botenstoffe die Lymphozyten erreichen. Aber auch Zytokine, die von Abwehrzellen, welche die Blut-Hirn-Schranke passieren, von Mikrogliazellen im ZNS oder auch peripher produziert werden, können die Funktion von Nervenzellen beeinflussen. Die Untersuchung dieser wechselseitigen Beziehungen zwischen Abwehrzellen und Nervensystem stellt einen wichtigen Beitrag zum tieferen Verständnis physiologischer und pathophysiologischer Mechanismen dar.

Serotonin und Substanz P sind zwei Neurotransmitter, die sowohl im ZNS als auch im peripheren Nervensystem eine wichtige Rolle als Überträgerstoffe spielen. Beide können darüberhinaus die Funktion von Lymphozyten über spezifische Rezeptoren beeinflussen. Im ZNS wirkt das Neuropeptid Substanz P als Modulator der serotonergen Neurotransmission. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit Substanz P auch an peripheren monozytären Zellen die Wirkung von Serotonin modulieren kann. Diese Frage wurde an einem Kollektiv von 42 gesunden Probanden untersucht. Dabei wurden PBMCs zu zwei verschiedenen Zeitpunkten aus dem Blut isoliert und auf ELISpot-Platten mit dem Mitogen PHA sowie Serotonin, Substanz P oder deren Kombination stimuliert. Gemessen wurden die Zytokine IFN- γ als charakteristisches Zytokin der Th1-Zellen sowie IL-4 und IL-13 als typische Vertreter der Th2-Lymphozyten.

Die ELISpot-Methode ist ein sehr sensitives Verfahren zum quantitativen Nachweis von Zytokinen. Dabei können sowohl Aussagen über die Anzahl Zytokin-produzierender Zellen als auch über die Menge an produziertem Zytokin gemacht werden. Die Ausarbeitung der Methodik zeigte, dass mehrere Faktoren einen erheblichen Einfluss auf die Varianz der Mehrfachwerte ausüben. Insbesondere waren die Verwendung von Antibiotika in den Zellkulturen, die Reinheit der Lösungen und die Lage der Plattenvertiefungen wichtige Einflussfaktoren.

Nach Ausschluss methodischer Artefakte konnte an dem Probandenkollektiv gezeigt werden, dass Serotonin allein in einer konzentrationsabhängigen Weise die Produktion von Zytokinen nach Stimulation mit PHA beeinflusst. Diese Wirkung wird höchstwahrscheinlich zum Teil über den 5-HT_{1A}-Rezeptor vermittelt. Hingegen veränderte eine Stimulation mit Substanz P allein die Zytokin-Produktion nicht. Beide Neurotransmitter zusammen erhöhten jedoch die Zytokin-Produktion signifikant gegenüber der jeweiligen alleinigen Stimulation. Diese Reaktionsweise war qualitativ bei allen drei Zytokinen gleichsinnig, unterschied sich jedoch im Ausmaß und der statistischen Signifikanz.

Neben dieser interessanten Beobachtung zeigte sich, dass erhebliche interindividuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Probanden bestehen. Diese Unterschiede konnten zum Teil durch soziodemographische Faktoren wie Alter und Geschlecht erklärt werden. Sie wurden aber auch durch genetische Polymorphismen beeinflusst. Dabei wurden funktionelle Polymorphismen in den drei Zytokin-Genen untersucht (IFN- γ : Mikrosatelliten Marker im Intron 1 (CA-Repeat), rs3138557; IL-4: C589T-Polymorphismus in der Promoterregion, rs2243250; IL-13: A4257G in Exon 4 Position 130, Gln (Q) zu Arg (R), rs20541). Dabei zeigte sich auch eine Gen*Alter-Interaktion bei der Produktion von IL-4.

Die Zytokin-Produktion der einzelnen Probanden korrelierte hoch signifikant zwischen den beiden Blutentnahmezeitpunkten, sodass einzelne Probanden entweder mit einer hohen oder einer niedrigen Zytokinantwort auf die verschiedenen Stimulationsbedingungen reagierten. Das grundsätzliche Reaktionsmuster blieb dabei im Wesentlichen erhalten, zeigte aber auch interindividuelle Unterschiede.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen also, dass Substanz P auch an peripheren Lymphozyten einen modulierenden Einfluss auf die Wirkung von Serotonin hat und zwischen der Stärke der jeweiligen

Zytokin-Antwort erhebliche interindividuelle Unterschiede bestehen. Inwieweit der modulierende Einfluss von Substanz P auf die Wirkung von Serotonin bei pathologischen Zuständen bedeutend ist, müsste in Kollektiven von Patienten in der Zukunft untersucht werden. Da in Bezug auf das Th2/Th1-Verhältnis die eindeutigsten Veränderungen für das IL-13/IFN- γ -Verhältnis gefunden wurden, könnte diese kostimulatorische Wirkung vor allem bei atopischen Patienten, bei denen IL-13 eine entscheidende Rolle spielt, von Bedeutung sein. Aber auch bei der Verarbeitung peripherer Schmerzreize oder bei psychiatrischen Erkrankungen unter dem Einsatz psychopharmakologischer Medikation mit Wirkung auf die 5-HT_{1A}-Rezeptoren, könnten diese Ergebnisse wichtig sein. Dies zu klären bleibt Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeiten. Insgesamt zeigte sich jedoch, wie wichtig es ist, auch bei *in vitro* Arbeiten Zellen größerer Kollektive zu untersuchen, um die interindividuellen Unterschiede berücksichtigen zu können. Untersuchungen an Zellen lediglich einzelner Probanden können mitunter zu sehr verzerrten Ergebnissen führen.

6 Literaturverzeichnis

Literatur

- [1] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>.
- [2] 8947: Substance p. In Maryadele J.O'Neil, Ann Smith, and Patricia E.Heckelman, editors, *The Merck Index*, volume 13th edition, pages 1578–1579. Merck Research Laboratories, Divison of Merck & Co., INC., Whitehouse Station , NJ, 2001.
- [3] Mabtech AB. Elispot for human interferon-gamma, 2001.
- [4] M. Abdouh, J.M. Storrng, M. Riad, Y. Paquette, P.R. Albert, E. Drobetsky, and E. Kouassi. Transcriptional mechanisms for induction of 5-ht1a receptor mrna and protein in activated b and t lymphocytes. *J.Biol.Chem.*, 276(6):4382–4388, February 2001.
- [5] M. Akaiwa, B. Yu, R. Umeshita-Suyama, N. Terada, H. Suto, T. Koga, K. Arima, S. Matsushita, H. Saito, H. Ogawa, M. Furue, N. Hamasaki, K. Ohshima, and K. Izuhara. Localization of human interleukin 13 receptor in non-haematopoietic cells. *Cytokine*, 13(2):75–84, January 2001.
- [6] S.M. Akbar, K. Inaba, and M. Onji. Upregulation of mhc class ii antigen on dendritic cells from hepatitis b virus transgenic mice by interferon-gamma: abrogation of immune response defect to a t-cell-dependent antigen. *Immunology*, 87(4):519–527, April 1996.
- [7] J. Aliakbari, S.P. Sreedharan, C.W. Turck, and E.J. Goetzl. Selective localization of vasoactive intestinal peptide and substance p in human eosinophils. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 148(3):1440–1445, November 1987.
- [8] M.J. Aman, N. Tayebi, N.I. Obiri, R.K. Puri, W.S. Modi, and W.J. Leonard. cdna cloning and characterization of the human interleukin 13 receptor alpha chain. *J.Biol.Chem.*, 271(46):29265–29270, November 1996.
- [9] J.C. Ameisen, R. Meade, and P.W. Askenase. A new interpretation of the involvement of serotonin in delayed-type hypersensitivity. serotonin-2 receptor antagonists inhibit contact sensitivity by an effect on t cells. *J.Immunol.*, 142(9):3171–3179, May 1989.
- [10] N. Arai, D. Nomura, D. Villaret, R. DeWaal Malefijt, M. Seiki, M. Yoshida, S. Minoshima, R. Fukuyama, M. Maekawa, and J. Kudoh. Complete nucleotide sequence of the chromosomal gene for human il-4 and its expression. *J Immunol*, 142(1):274–282, Jan 1989.
- [11] Kazuhiko Arima, Ritsuko Umeshita-Suyama, Yasuhisa Sakata, Mina Akaiwa, Xiao-Quan Mao, Tadao Enomoto, Yoshio Dake, Shin ichiro Shimazu, Tetsuji Yamashita, Naoto Sugawara, Scott Brodeur, Raif Geha, Raj K Puri, Mohamad H Sayegh, Chaker N Adra, Naotaka Hamasaki, Julian M Hopkin, Taro Shirakawa, and Kenji Izuhara. Upregulation of il-13 concentration in vivo by the il13 variant associated with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 109(6):980–987, Jun 2002.
- [12] E. Arzt, M. Costas, S. Finkielman, and V.E. Nahmod. Serotonin inhibition of tumor necrosis factor-alpha synthesis by human monocytes. *Life Sci.*, 48(26):2557–2562, 1991.
- [13] E.S. Arzt, S. Fernandez-Castelo, L.M. Finocchiaro, M.E. Criscuolo, A. Diaz, S. Finkielman, and V.E. Nahmod. Immunomodulation by indoleamines: serotonin and melatonin action on dna and interferon-gamma synthesis by human peripheral blood mononuclear cells. *J.Clin.Immunol.*, 8(6):513–520, November 1988.

- [14] A. Asderakis, D. Sankaran, P. Dyer, R. W. Johnson, V. Pravica, P. J. Sinnott, I. Roberts, and I. V. Hutchinson. Association of polymorphisms in the human interferon-gamma and interleukin-10 gene with acute and chronic kidney transplant outcome: the cytokine effect on transplantation. *Transplantation*, 71(5):674–677, Mar 2001.
- [15] T.M. Aune, H.W. Golden, and K.M. McGrath. Inhibitors of serotonin synthesis and antagonists of serotonin 1a receptors inhibit t lymphocyte function in vitro and cell-mediated immunity in vivo. *J.Immunol.*, 153(2):489–498, July 1994.
- [16] T.M. Aune, K.M. McGrath, T. Sarr, M.P. Bombara, and K.A. Kelley. Expression of 5ht1a receptors on activated human t cells. regulation of cyclic amp levels and t cell proliferation by 5-hydroxytryptamine. *J.Immunol.*, 151(3):1175–1183, August 1993.
- [17] Turner-D.M. Sinnot P.J. & Hutchinson I.V. Awad, M.R. Polymorphism in the tgf-beta1 gene. *European Journal of Immunogenetics*, 24:45, 1997.
- [18] T. Bailey, S. Stark, A. Grant, C. Hartnett, M. Tsang, and A. Kalyuzhny. A multidonor elispot study of il-1 beta, il-2, il-4, il-6, il-13, ifn-gamma and tnf-alpha release by cryopreserved human peripheral blood mononuclear cells. *J.Immunol.Methods*, 270(2):171–182, December 2002.
- [19] K. G. Baker, G. M. Halliday, J. P. Hornung, L. B. Geffen, R. G. Cotton, and I. Törk. Distribution, morphology and number of monoamine-synthesizing and substance p-containing neurons in the human dorsal raphe nucleus. *Neuroscience*, 42(3):757–775, 1991.
- [20] Z. Bar-Shavit, R. Goldman, Y. Stabinsky, P. Gottlieb, M. Fridkin, V.I. Teichberg, and S. Blumberg. Enhancement of phagocytosis - a newly found activity of substance p residing in its n-terminal tetrapeptide sequence. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 94(4):1445–1451, June 1980.
- [21] Monica J Basehore, Timothy D Howard, Leslie A Lange, Wendy C Moore, Gregory A Hawkins, Patricia L Marshik, Michelle S Harkins, Deborah A Meyers, and Eugene R Blecker. A comprehensive evaluation of il4 variants in ethnically diverse populations: association of total serum ige levels and asthma in white subjects. *J Allergy Clin Immunol*, 114(1):80–87, Jul 2004.
- [22] B. Beghé, I. P. Hall, S. G. Parker, M. F. Moffatt, A. Wardlaw, M. J. Connolly, L. M. Fabbri, C. Ruse, and I. Sayers. Polymorphisms in il13 pathway genes in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Allergy*, 65(4):474–481, Apr 2010.
- [23] J. Bienenstock, K. Croitoru, P.B. Ernst, R.H. Stead, and A. Stanisiz. Neuroendocrine regulation of mucosal immunity. *Immunol.Invest*, 18(1-4):69–76, January 1989.
- [24] A. Billiau and P. Matthys. Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 20(2):97–113, April 2009.
- [25] L. Bondesson, K. Nordlind, S. Liden, and E. Sundstrom. Inhibiting effects of serotonin and serotonin antagonists on the migration of mononuclear leucocytes. *Immunopharmacol.Immunotoxicol.*, 15(2-3):243–250, March 1993.
- [26] M. Bonnet, G. Lespinats, and C. Burtin. Histamine and serotonin suppression of lymphocyte response to phytohemagglutinin and allogeneic cells. *Cell Immunol.*, 83(2):280–291, February 1984.
- [27] M. Bonnet, G. Lespinats, and C. Burtin. Evidence for serotonin (5ht) binding sites on murine lymphocytes. *Int.J.Immunopharmacol.*, 9(5):551–558, 1987.
- [28] K.L. Bost, S.A. Breeding, and D.W. Pascual. Modulation of the mrnas encoding substance p and its receptor in rat macrophages by lps. *Reg Immunol.*, 4(2):105–112, March 1992.

- [29] K.L. Bost and D.W. Pascual. Substance p: a late-acting b lymphocyte differentiation cofactor. *Am.J.Physiol*, 262(3 Pt 1):C537–C545, March 1992.
- [30] A. Boyum. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. introduction. *Scand.J.Clin.Lab Invest Suppl*, 97:7–, 1968.
- [31] J. H. Bream, A. Ping, X. Zhang, C. Winkler, and H. A. Young. A single nucleotide polymorphism in the proximal ifn-gamma promoter alters control of gene transcription. *Genes Immun*, 3(3):165–169, May 2002.
- [32] R.M. Broad, T.J. McDonald, and M.A. Cook. Adenosine and 5-ht inhibit substance p release from nerve endings in myenteric ganglia by distinct mechanisms. *Am.J.Physiol*, 264(3 Pt 1):G454–G461, March 1993.
- [33] B. B. BRODIE, A. PLETSCHER, and P. A. SHORE. Evidence that serotonin has a role in brain function. *Science*, 122(3177):968, Nov 1955.
- [34] E. Brodin, K. Sjolund, R. Hakanson, and F. Sundler. Substance p-containing nerve fibers are numerous in human but not in feline intestinal mucosa. *Gastroenterology*, 85(3):557–564, September 1983.
- [35] K.D. Brown, S.M. Zurawski, T.R. Mosmann, and G. Zurawski. A family of small inducible proteins secreted by leukocytes are members of a new superfamily that includes leukocyte and fibroblast-derived inflammatory agents, growth factors, and indicators of various activation processes. *J.Immunol.*, 142(2):679–687, January 1989.
- [36] M. A. Brown and J. Hural. Functions of il-4 and control of its expression. *Crit Rev Immunol*, 17(1):1–32, 1997.
- [37] L. Le Cam, B. Lagier, J. Bousquet, and J. Pène. Nicotine does not modulate il-4 and interferon-gamma release from peripheral blood mononuclear cells and t cell clones activated by phorbol myristate acetate and calcium ionophore. *Int Arch Allergy Immunol*, 111(4):372–375, Dec 1996.
- [38] Lisa Cameron, Robin B Webster, Jannine M Stempel, Patricia Kiesler, Michael Kabesch, Hari-krishnan Ramachandran, Lizhi Yu, Debra A Stern, Penelope E Graves, I. Carla Lohman, Anne L Wright, Marilyn Halonen, Walter T Klimecki, and Donata Vercelli. Th2 cell-selective enhancement of human il13 transcription by il13-1112c>t, a polymorphism associated with allergic inflammation. *J Immunol*, 177(12):8633–8642, Dec 2006.
- [39] P.A. Campbell, B.P. Canono, and J.L. Cook. Mouse macrophages stimulated by recombinant gamma interferon to kill tumor cells are not bactericidal for the facultative intracellular bacterium *listeria monocytogenes*. *Infect.Immun.*, 56(5):1371–1375, May 1988.
- [40] A. Cantagrel, F. Navaux, P. Loubet-Lescoulié, F. Nourhashemi, G. Enault, M. Abbal, A. Constantin, M. Laroche, and B. Mazières. Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 42(6):1093–1100, Jun 1999.
- [41] Cristiano Capurso, Vincenzo Solfrizzi, Alessia D’Introno, Anna M Colacicco, Sabrina A Capurso, Antonio Capurso, and Francesco Panza. Interleukin 6-174 g/c promoter gene polymorphism and sporadic alzheimer’s disease: geographic allele and genotype variations in europe. *Exp Gerontol*, 39(10):1567–1573, Oct 2004.
- [42] D. Caput, P. Laurent, M. Kaghad, J.M. Lelias, S. Lefort, N. Vita, and P. Ferrara. Cloning and characterization of a specific interleukin (il)-13 binding protein structurally related to the il-5 receptor alpha chain. *J.Biol.Chem.*, 271(28):16921–16926, July 1996.

- [43] Gonzalo A Carrasco and Louis D Van de Kar. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol*, 463(1-3):235–272, Feb 2003.
- [44] N. H. Cartwright, L. J. Keen, A. G. Demaine, N. J. Hurlock, R. J. McGonigle, P. A. Rowe, J. F. Shaw, R. M. Szydlo, and E. R. Kaminski. A study of cytokine gene polymorphisms and protein secretion in renal transplantation. *Transpl Immunol*, 8(4):237–244, Feb 2001.
- [45] J. C. Celedón, M. E. Soto-Quiros, L. J. Palmer, J. Senter, J. Mosley, E. K. Silverman, and S. T. Weiss. Lack of association between a polymorphism in the interleukin-13 gene and total serum immunoglobulin e level among nuclear families in costa rica. *Clin Exp Allergy*, 32(3):387–390, Mar 2002.
- [46] L. A. Chahl. Interactions of substance p with putative mediators of inflammation and atp. *Eur J Pharmacol*, 44(1):45–49, Jul 1977.
- [47] M. Chang, Y. Li, C. Yan, K. P. Callis-Duffin, N. Matsunami, V. E. Garcia, M. Cargill, D. Civallo, N. Bui, J. J. Catanese, M. F. Leppert, G. G. Krueger, A. B. Begovich, and S. J. Schrodi. Variants in the 5q31 cytokine gene cluster are associated with psoriasis. *Genes Immun*, 9(2):176–181, Mar 2008.
- [48] M.M. Chang, S.E. Leeman, and H.D. Niall. Amino-acid sequence of substance p. *Nat.New Biol.*, 232(29):86–87, July 1971.
- [49] S. Chang and T.M. Aune. Dynamic changes in histone-methylation 'marks' across the locus encoding interferon-gamma during the differentiation of t helper type 2 cells. *Nat.Immunol.*, 8(7):723–731, July 2007.
- [50] T.W. Chang, D. Testa, P.C. Kung, L. Perry, H.J. Dreskin, and G. Goldstein. Cellular origin and interactions involved in gamma-interferon production induced by okt3 monoclonal antibody. *J.Immunol.*, 128(2):585–589, February 1982.
- [51] L.W. Chen, L.C. Wei, H.L. Liu, Y.Q. Ding, H. Zhang, Z.R. Rao, G. Ju, and Y.S. Chan. Cholinergic neurons expressing neuromedin k receptor (nk3) in the basal forebrain of the rat: a double immunofluorescence study. *Neuroscience*, 103(2):413–422, 2001.
- [52] L.W. Chen, L.C. Wei, H.L. Liu, and Z.R. Rao. Noradrenergic neurons expressing substance p receptor (nk1) in the locus coeruleus complex: a double immunofluorescence study in the rat. *Brain Res.*, 873(1):155–159, August 2000.
- [53] C. Chiwakata, B. Brackmann, N. Hunt, M. Davidoff, W. Schulze, and R. Ivell. Tachykinin (substance-p) gene expression in leydig cells of the human and mouse testis. *Endocrinology*, 128(5):2441–2448, May 1991.
- [54] P. Chomarar and J. Banchereau. Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. *Int.Rev.Immunol.*, 17(1-4):1–52, 1998.
- [55] R.L. Coffman and J. Carty. A t cell activity that enhances polyclonal ige production and its inhibition by interferon-gamma. *J.Immunol.*, 136(3):949–954, February 1986.
- [56] S.L. Constant and K. Bottomly. Induction of th1 and th2 cd4+ t cell responses: the alternative approaches. *Annu.Rev.Immunol.*, 15:297–322, 1997.
- [57] E. Crivellato, D. Damiani, F. Mallardi, and L. Travan. Suggestive evidence for a microanatomical relationship between mast cells and nerve fibres containing substance p, calcitonin gene related peptide, vasoactive intestinal polypeptide, and somatostatin in the rat mesentery. *Acta Anat.(Basel)*, 141(2):127–131, 1991.

- [58] A. Cruz, S.A. Khader, E. Torrado, A. Fraga, J.E. Pearl, J. Pedrosa, A.M. Cooper, and A.G. Castro. Cutting edge: Ifn-gamma regulates the induction and expansion of il-17-producing cd4 t cells during mycobacterial infection. *J.Immunol.*, 177(3):1416–1420, August 2006.
- [59] J. Culman and T. Unger. Central tachykinins: mediators of defence reaction and stress reactions. *Can J Physiol Pharmacol*, 73(7):885–891, Jul 1995.
- [60] J. Culman, B. Wiegand, H. Spitznagel, S. Klee, and T. Unger. Effects of the tachykinin nk1 receptor antagonist, rp 67580, on central cardiovascular and behavioural effects of substance p, neurokinin a and neurokinin b. *Br J Pharmacol*, 114(6):1310–1316, Mar 1995.
- [61] C. Czerkinsky, G. Andersson, H.P. Ekre, L.A. Nilsson, L. Klareskog, and O. Ouchterlony. Reverse elispot assay for clonal analysis of cytokine production. i. enumeration of gamma-interferon-secreting cells. *J.Immunol.Methods*, 110(1):29–36, May 1988.
- [62] C. Czerkinsky, Z. Moldoveanu, J. Mestecky, L.A. Nilsson, and O. Ouchterlony. A novel two colour elispot assay. i. simultaneous detection of distinct types of antibody-secreting cells. *J.Immunol.Methods*, 115(1):31–37, November 1988.
- [63] C.C. Czerkinsky, L.A. Nilsson, H. Nygren, O. Ouchterlony, and A. Tarkowski. A solid-phase enzyme-linked immunospot (elispot) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J.Immunol.Methods*, 65(1-2):109–121, December 1983.
- [64] Biasi S. De and A. Rustioni. Glutamate and substance p coexist in primary afferent terminals in the superficial laminae of spinal cord. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 85(20):7820–7824, October 1988.
- [65] Felipe C. De, J.F. Herrero, J.A. O'Brien, J.A. Palmer, C.A. Doyle, A.J. Smith, J.M. Laird, C. Belmonte, F. Cervero, and S.P. Hunt. Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance p. *Nature*, 392(6674):394–397, March 1998.
- [66] J.E. de Vries. Molecular and biological characteristics of interleukin-13. *Chem.Immunol.*, 63:204–218, 1996.
- [67] J.E. de Vries. The role of il-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *J.Allergy Clin.Immunol.*, 102(2):165–169, August 1998.
- [68] C. Dean, L. Marson, and J.P. Kampine. Distribution and co-localization of 5-hydroxytryptamine, thyrotropin-releasing hormone and substance p in the cat medulla. *Neuroscience*, 57(3):811–822, December 1993.
- [69] T. Decker, D. J. Lew, J. Mirkovitch, and J. E. Darnell. Cytoplasmic activation of gaf, an ifn-gamma-regulated dna-binding factor. *EMBO J*, 10(4):927–932, Apr 1991.
- [70] M. H. Dizier, A. Sandford, A. Walley, A. Philippi, W. Cookson, and F. Demenais. Indication of linkage of serum ige levels to the interleukin-4 gene and exclusion of the contribution of the (-590 c to t) interleukin-4 promoter polymorphism to ige variation. *Genet Epidemiol*, 16(1):84–94, 1999.
- [71] T.M. Doherty, R. Kastelein, S. Menon, S. Andrade, and R.L. Coffman. Modulation of murine macrophage function by il-13. *J.Immunol.*, 151(12):7151–7160, December 1993.
- [72] J.E. Downing and J.A. Miyan. Neural immunoregulation: emerging roles for nerves in immune homeostasis and disease. *Immunol.Today*, 21(6):281–289, June 2000.
- [73] Kristina Callis Duffin, Ingrid C Freeny, Steven J Schrodi, Bob Wong, Bing-Jian Feng, Raziieh Soltani-Arabshahi, Tina Rakkhit, David E Goldgar, and Gerald G Krueger. Association between il13 polymorphisms and psoriatic arthritis is modified by smoking. *J Invest Dermatol*, 129(12):2777–2783, Dec 2009.

- [74] A.W. Duggan, I.A. Hendry, C.R. Morton, W.D. Hutchison, and Z.Q. Zhao. Cutaneous stimuli releasing immunoreactive substance p in the dorsal horn of the cat. *Brain Res.*, 451(1-2):261–273, June 1988.
- [75] T.T. Duong, F.D. Finkelman, B. Singh, and G.H. Strejan. Effect of anti-interferon-gamma monoclonal antibody treatment on the development of experimental allergic encephalomyelitis in resistant mouse strains. *J.Neuroimmunol.*, 53(1):101–107, August 1994.
- [76] T.T. Duong, Louis J. St, J.J. Gilbert, F.D. Finkelman, and G.H. Strejan. Effect of anti-interferon-gamma and anti-interleukin-2 monoclonal antibody treatment on the development of actively and passively induced experimental allergic encephalomyelitis in the sjl/j mouse. *J.Neuroimmunol.*, 36(2-3):105–115, February 1992.
- [77] K. Ebner, S.B. Sartori, and N. Singewald. Tachykinin receptors as therapeutic targets in stress-related disorders. *Curr.Pharm.Des.*, 15(14):1647–1674, 2009.
- [78] C. Ekerfelt, J. Ernerudh, and M.C. Jenmalm. Detection of spontaneous and antigen-induced human interleukin-4 responses in vitro: comparison of elispot, a novel elisa and real-time rt-pcr. *J.Immunol.Methods*, 260(1-2):55–67, February 2002.
- [79] G.E. elGhazali, S. Paulie, G. Andersson, Y. Hansson, G. Holmquist, J.B. Sun, T. Olsson, H.P. Ekre, and M. Troye-Blomberg. Number of interleukin-4- and interferon-gamma-secreting human t cells reactive with tetanus toxoid and the mycobacterial antigen ppd or phytohemagglutinin: distinct response profiles depending on the type of antigen used for activation. *Eur.J.Immunol.*, 23(11):2740–2745, November 1993.
- [80] Bernd Elser, Michael Lohoff, Sonja Kock, Marco Giaisi, Sabine Kirchhoff, Peter H Krammer, and Min Li-Weber. Ifn-gamma represses il-4 expression via irf-1 and irf-2. *Immunity*, 17(6):703–712, Dec 2002.
- [81] T. Endo, F. Ogushi, and S. Sone. Lps-dependent cyclooxygenase-2 induction in human monocytes is down-regulated by il-13, but not by ifn-gamma. *J.Immunol.*, 156(6):2240–2246, March 1996.
- [82] J. Eugen-Olsen, P. Afzelius, L. Andresen, J. Iversen, G. Kronborg, P. Aabech, J.O. Nielsen, and B. Hofmann. Serotonin modulates immune function in t cells from hiv-seropositive subjects. *Clin.Immunol.Immunopathol.*, 84(2):115–121, August 1997.
- [83] C. Ewen and M.E. Baca-Estrada. Evaluation of interleukin-4 concentration by elisa is influenced by the consumption of il-4 by cultured cells. *J.Interferon Cytokine Res.*, 21(1):39–43, January 2001.
- [84] R. Falcoff. Some properties of virus and immune-induced human lymphocyte interferons. *J.Gen.Virol.*, 16(2):251–253, August 1972.
- [85] N. Favre, G. Bordmann, and W. Rudin. Comparison of cytokine measurements using elisa, elispot and semi-quantitative rt-pcr. *J.Immunol.Methods*, 204(1):57–66, May 1997.
- [86] D.L. Felten, S.Y. Felten, S.L. Carlson, J.A. Olschowka, and S. Livnat. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. *J.Immunol.*, 135(2 Suppl):755s–765s, August 1985.
- [87] B.L. Fiebich, S. Schleicher, R.D. Butcher, A. Craig, and K. Lieb. The neuropeptide substance p activates p38 mitogen-activated protein kinase resulting in il-6 expression independently from nf-kappa b. *J.Immunol.*, 165(10):5606–5611, November 2000.
- [88] T. Fink and E. Weihe. Multiple neuropeptides in nerves supplying mammalian lymph nodes: messenger candidates for sensory and autonomic neuroimmunomodulation? *Neurosci.Lett.*, 90(1-2):39–44, July 1988.

- [89] L.M. Finocchiaro, E.S. Arzt, S. Fernandez-Castelo, M. Criscuolo, S. Finkielman, and V.E. Nahmod. Serotonin and melatonin synthesis in peripheral blood mononuclear cells: stimulation by interferon-gamma as part of an immunomodulatory pathway. *J.Interferon Res.*, 8(6):705–716, December 1988.
- [90] T.A. Fong and T.R. Mosmann. Alloreactive murine cd8+ t cell clones secrete the th1 pattern of cytokines. *J.Immunol.*, 144(5):1744–1752, March 1990.
- [91] K.A. Frazer, Y. Ueda, Y. Zhu, V.R. Gifford, M.R. Garofalo, N. Mohandas, C.H. Martin, M.J. Palazzolo, J.F. Cheng, and E.M. Rubin. Computational and biological analysis of 680 kb of dna sequence from the human 5q31 cytokine gene cluster region. *Genome Res.*, 7(5):495–512, May 1997.
- [92] N. Froger, A.M. Gardier, R. Moratalla, I. Alberti, I. Lena, C. Boni, C. de Felipe, N.M. Rupniak, S.P. Hunt, C. Jacquot, M. Hamon, and L. Lanfumey. 5-hydroxytryptamine (5-ht)1a autoreceptor adaptive changes in substance p (neurokinin 1) receptor knock-out mice mimic antidepressant-induced desensitization. *J.Neurosci.*, 21(20):8188–8197, October 2001.
- [93] B.A. Fuchs, K.S. Campbell, and A.E. Munson. Norepinephrine and serotonin content of the murine spleen: its relationship to lymphocyte beta-adrenergic receptor density and the humoral immune response in vivo and in vitro. *Cell Immunol.*, 117(2):339–351, December 1988.
- [94] J. H. GADDUM and Z. P. PICARELLI. Two kinds of tryptamine receptor. *Br J Pharmacol Chemother*, 12(3):323–328, Sep 1957.
- [95] T.F. Gajewski and F.W. Fitch. Anti-proliferative effect of ifn-gamma in immune regulation. i. ifn-gamma inhibits the proliferation of th2 but not th1 murine helper t lymphocyte clones. *J.Immunol.*, 140(12):4245–4252, June 1988.
- [96] J.F. Gauchat, E. Schlagenhaut, N.P. Feng, R. Moser, M. Yamage, P. Jeannin, S. Alouani, G. Elson, L.D. Notarangelo, T. Wells, H.P. Eugster, and J.Y. Bonnefoy. A novel 4-kb interleukin-13 receptor alpha mRNA expressed in human b, t, and endothelial cells encoding an alternate type-ii interleukin-4/interleukin-13 receptor. *Eur.J.Immunol.*, 27(4):971–978, April 1997.
- [97] N.P. Gerard, L.A. Garraway, Jr. Eddy, R.L., T.B. Shows, H. Iijima, J.L. Paquet, and C. Gerard. Human substance p receptor (nk-1): organization of the gene, chromosome localization, and functional expression of cDNA clones. *Biochemistry*, 30(44):10640–10646, November 1991.
- [98] R.K. Gershon, P.W. Askenase, and M.D. Gershon. Requirement for vasoactive amines for production of delayed-type hypersensitivity skin reactions. *J.Exp.Med.*, 142(3):732–747, September 1975.
- [99] H. Ginsburg, E. C. Olson, T. F. Huff, H. Okudaira, and T. Ishizaka. Enhancement of mast cell differentiation in vitro by t cell factor(s). *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 66(4):447–458, 1981.
- [100] B.D. Gitter, D. Regoli, J.J. Howbert, A.L. Glasebrook, and D.C. Waters. Interleukin-6 secretion from human astrocytoma cells induced by substance p. *J.Neuroimmunol.*, 51(1):101–108, April 1994.
- [101] AID Autoimmun Diagnostika GmbH. Aid elispot assay, 2001.
- [102] S. Goenka, J. Youn, L. M. Dzurek, U. Schindler, L. Y. Yu-Lee, and M. Boothby. Paired stat6 c-terminal transcription activation domains required both for inhibition of an ifn-responsive promoter and trans-activation. *J Immunol*, 163(9):4663–4672, Nov 1999.
- [103] D.J. Gordon, L.S. Ostlere, and C.A. Holden. Neuropeptide modulation of th1 and th2 cytokines in peripheral blood mononuclear leucocytes in atopic dermatitis and non-atopic controls. *Br.J.Dermatol.*, 137(6):921–927, December 1997.

- [104] P. Graber, D. Gretener, S. Herren, J.P. Aubry, G. Elson, J. Poudrier, S. Lecoanet-Henchoz, S. Alouani, C. Losberger, J.Y. Bonnefoy, M.H. Kosco-Vilbois, and J.F. Gauchat. The distribution of il-13 receptor alpha1 expression on b cells, t cells and monocytes and its regulation by il-13 and il-4. *Eur.J.Immunol.*, 28(12):4286–4298, December 1998.
- [105] F. G. Graeff, M. B. Viana, and P. O. Mora. Dual role of 5-ht in defense and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*, 21(6):791–799, Nov 1997.
- [106] Brigitte Granel, Christophe Chevillard, Yannick Allanore, Violaine Arnaud, Sandrine Cabantous, Sandrine Marquet, Pierre-Jean Weiller, Jean-Marc Durand, Jean-Robert Harlé, Claire Grange, Yves Frances, Philippe Berbis, Jean Gaudart, Philippe de Micco, André Kahan, and Alain Dessein. Evaluation of interleukin 13 polymorphisms in systemic sclerosis. *Immunogenetics*, 58(8):693–699, Aug 2006.
- [107] P.E. Graves, M. Kabesch, M. Halonen, C.J. Holberg, M. Baldini, C. Fritzsche, S.K. Weiland, R.P. Erickson, Mutius E. von, and F.D. Martinez. A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the il-13 gene is associated with total serum ige levels in three populations of white children. *J.Allergy Clin.Immunol.*, 105(3):506–513, March 2000.
- [108] D. De Groote, P. F. Zangerle, Y. Gevaert, M. F. Fassotte, Y. Beguin, F. Noizat-Pirenne, J. Pirenne, R. Gathy, M. Lopez, and I. Dehart. Direct stimulation of cytokines (il-1 beta, tnf-alpha, il-6, il-2, ifn-gamma and gm-csf) in whole blood. i. comparison with isolated pbmc stimulation. *Cytokine*, 4(3):239–248, May 1992.
- [109] B.P. Guiard, N. Froger, M. Hamon, A.M. Gardier, and L. Lanfumey. Sustained pharmacological blockade of nk1 substance p receptors causes functional desensitization of dorsal raphe 5-ht 1a autoreceptors in mice. *J.Neurochem.*, 95(6):1713–1723, December 2005.
- [110] C.J. Guo, J.P. Lai, H.M. Luo, S.D. Douglas, and W.Z. Ho. Substance p up-regulates macrophage inflammatory protein-1beta expression in human t lymphocytes. *J.Neuroimmunol.*, 131(1-2):160–167, October 2002.
- [111] J. Guo, F. Apiou, M.P. Mellerin, B. Lebeau, Y. Jacques, and S. Minvielle. Chromosome mapping and expression of the human interleukin-13 receptor. *Genomics*, 42(1):141–145, May 1997.
- [112] G.L. Gusella, T. Musso, M.C. Bosco, I. Espinoza-Delgado, K. Matsushima, and L. Varesio. Il-2 up-regulates but ifn-gamma suppresses il-8 expression in human monocytes. *J.Immunol.*, 151(5):2725–2732, September 1993.
- [113] M. Hachicha, P. Rathanaswami, T.J. Schall, and S.R. McColl. Production of monocyte chemotactic protein-1 in human type b synoviocytes. synergistic effect of tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma. *Arthritis Rheum.*, 36(1):26–34, January 1993.
- [114] N. Haddjeri and P. Blier. Effect of neurokinin-i receptor antagonists on the function of 5-ht and noradrenaline neurons. *Neuroreport*, 11(6):1323–1327, April 2000.
- [115] N. Haddjeri and P. Blier. Sustained blockade of neurokinin-1 receptors enhances serotonin neurotransmission. *Biol.Psychiatry*, 50(3):191–199, August 2001.
- [116] E. Hagiwara, F. Abbasi, G. Mor, Y. Ishigatsubo, and D. M. Klinman. Phenotype and frequency of cells secreting il-2, il-4, il-6, il-10, ifn and tnf-alpha in human peripheral blood. *Cytokine*, 7(8):815–822, Nov 1995.
- [117] K. Handa, R. Suzuki, H. Matsui, Y. Shimizu, and K. Kumagai. Natural killer (nk) cells as a responder to interleukin 2 (il 2). ii. il 2-induced interferon gamma production. *J.Immunol.*, 130(2):988–992, February 1983.

- [118] L.E. Harrington, R.D. Hatton, P.R. Mangan, H. Turner, T.L. Murphy, K.M. Murphy, and C.T. Weaver. Interleukin 17-producing cd4⁺ effector t cells develop via a lineage distinct from the t helper type 1 and 2 lineages. *Nat.Immunol.*, 6(11):1123–1132, November 2005.
- [119] H. P. Hartung, K. Wolters, and K. V. Toyka. Substance p: binding properties and studies on cellular responses in guinea pig macrophages. *J Immunol*, 136(10):3856–3863, May 1986.
- [120] H.P. Hartung, K. Heininger, B. Schafer, and K.V. Toyka. Substance p and astrocytes: stimulation of the cyclooxygenase pathway of arachidonic acid metabolism. *FASEB J.*, 2(1):48–51, January 1988.
- [121] H.P. Hartung and K.V. Toyka. Activation of macrophages by substance p: induction of oxidative burst and thromboxane release. *Eur.J.Pharmacol.*, 89(3-4):301–305, May 1983.
- [122] H. Hassessian, P. Poulat, E. Hamel, T.A. Reader, and R. Couture. Spinal cord serotonin receptors in cardiovascular regulation and potentiation of the pressor response to intrathecal substance p after serotonin depletion. *Can.J.Physiol Pharmacol.*, 71(7):453–464, July 1993.
- [123] A. Heinzmann, X.Q. Mao, M. Akaiwa, R.T. Kreomer, P.S. Gao, K. Ohshima, R. Umeshita, Y. Abe, S. Braun, T. Yamashita, M.H. Roberts, R. Sugimoto, K. Arima, Y. Arinobu, B. Yu, S. Kruse, T. Enomoto, Y. Dake, M. Kawai, S. Shimazu, S. Sasaki, C.N. Adra, M. Kitaichi, H. Inoue, K. Yamauchi, N. Tomichi, F. Kurimoto, N. Hamasaki, J.M. Hopkin, K. Izuhara, T. Shirakawa, and K.A. Deichmann. Genetic variants of il-13 signalling and human asthma and atopy. *Hum.Mol.Genet.*, 9(4):549–559, March 2000.
- [124] K. Hellstrand, C. Czerkinsky, A. Ricksten, B. Jansson, A. Asea, H. Kylefjord, and S. Hermodsson. Role of serotonin in the regulation of interferon-gamma production by human natural killer cells. *J.Interferon Res.*, 13(1):33–38, February 1993.
- [125] K. Hellstrand and S. Hermodsson. Role of serotonin in the regulation of human natural killer cell cytotoxicity. *J.Immunol.*, 139(3):869–875, August 1987.
- [126] K. Hellstrand and S. Hermodsson. Enhancement of human natural killer cell cytotoxicity by serotonin: role of non-t/cd16⁺ nk cells, accessory monocytes, and 5-ht1a receptors. *Cell Immunol.*, 127(1):199–214, April 1990.
- [127] K. Hellstrand and S. Hermodsson. Monocyte-mediated suppression of il-2-induced nk-cell activation. regulation by 5-ht1a-type serotonin receptors. *Scand.J.Immunol.*, 32(2):183–192, August 1990.
- [128] P. M. Henson. Platelet-activating factor (paf) as a mediator of neutrophil-platelet interactions in inflammation. *Agents Actions*, 11(6-7):545–547, Dec 1981.
- [129] G.K. Hershey. Il-13 receptors and signaling pathways: an evolving web. *J.Allergy Clin.Immunol.*, 111(4):677–690, April 2003.
- [130] D.J. Hilton, J.G. Zhang, D. Metcalf, W.S. Alexander, N.A. Nicola, and T.A. Willson. Cloning and characterization of a binding subunit of the interleukin 13 receptor that is also a component of the interleukin 4 receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 93(1):497–501, January 1996.
- [131] I.C. Ho, M.R. Hodge, J.W. Rooney, and L.H. Glimcher. The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell*, 85(7):973–983, June 1996.
- [132] W.Z. Ho, D. Kaufman, M. Uvaydova, and S.D. Douglas. Substance p augments interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha release by human cord blood monocytes and macrophages. *J.Neuroimmunol.*, 71(1-2):73–80, December 1996.

- [133] W.Z. Ho, J.P. Lai, X.H. Zhu, M. Uvaydova, and S.D. Douglas. Human monocytes and macrophages express substance p and neurokinin-1 receptor. *J.Immunol.*, 159(11):5654–5660, December 1997.
- [134] S. Hockertz, A. Emmendörffer, G. Scherer, T. Ruppert, H. Daube, A. R. Tricker, and F. Adlkofer. Acute effects of smoking and high experimental exposure to environmental tobacco smoke (ets) on the immune system. *Cell Biol Toxicol*, 10(3):177–190, Jun 1994.
- [135] J. Hoeck and M. Woisetschläger. Stat6 mediates eotaxin-1 expression in il-4 or tnf-alpha-induced fibroblasts. *J Immunol*, 166(7):4507–4515, Apr 2001.
- [136] S. Hoffjan, D. Nicolae, and C. Ober. Association studies for asthma and atopic diseases: a comprehensive review of the literature. *Respir.Res.*, 4:14–, 2003.
- [137] S. C. Hoffmann, E. M. Stanley, E. Darrin Cox, N. Craighead, B. S. DiMercurio, D. E. Koziol, D. M. Harlan, A. D. Kirk, and P. J. Blair. Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-cd3/cd28-stimulated peripheral blood lymphocytes. *Transplantation*, 72(8):1444–1450, Oct 2001.
- [138] T. Hokfelt, O. Johansson, A. Ljungdahl, J.M. Lundberg, and M. Schultzberg. Peptidergic neurones. *Nature*, 284(5756):515–521, April 1980.
- [139] T. Hokfelt, J.O. Kellerth, G. Nilsson, and B. Pernow. Experimental immunohistochemical studies on the localization and distribution of substance p in cat primary sensory neurons. *Brain Res.*, 100(2):235–252, December 1975.
- [140] P. Holzer and U. Holzer-Petsche. Tachykinins in the gut. part i. expression, release and motor function. *Pharmacol.Ther.*, 73(3):173–217, 1997.
- [141] P. Holzer and U. Holzer-Petsche. Tachykinins in the gut. part ii. roles in neural excitation, secretion and inflammation. *Pharmacol.Ther.*, 73(3):219–263, 1997.
- [142] S. Horie, Y. Okubo, M. Hossain, E. Sato, H. Nomura, S. Koyama, J. Suzuki, M. Isobe, and M. Sekiguchi. Interleukin-13 but not interleukin-4 prolongs eosinophil survival and induces eosinophil chemotaxis. *Intern.Med.*, 36(3):179–185, March 1997.
- [143] M. Howard, J. Farrar, M. Hilfiker, B. Johnson, K. Takatsu, T. Hamaoka, and W. E. Paul. Identification of a t cell-derived b cell growth factor distinct from interleukin 2. *J Exp Med*, 155(3):914–923, Mar 1982.
- [144] T. D. Howard, P. A. Whittaker, A. L. Zaiman, G. H. Koppelman, J. Xu, M. T. Hanley, D. A. Meyers, D. S. Postma, and E. R. Bleeker. Identification and association of polymorphisms in the interleukin-13 gene with asthma and atopy in a dutch population. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 25(3):377–384, Sep 2001.
- [145] Peter Härle, Daniel Möbius, Daniel J J Carr, Jürgen Schölmerich, and Rainer H Straub. An opposing time-dependent immune-modulating effect of the sympathetic nervous system conferred by altering the cytokine profile in the local lymph nodes and spleen of mice with type ii collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 52(4):1305–1313, Apr 2005.
- [146] Gary M Hunninghake, Manuel E Soto-Quirós, Lydiana Avila, Jessica Su, Amy Murphy, Dawn L Demeo, Ngoc P Ly, Catherine Liang, Jody S Sylvia, Barbara J Klanderman, Christoph Lange, Benjamin A Raby, Edwin K Silverman, and Juan C Celedón. Polymorphisms in il13, total ige, eosinophilia, and asthma exacerbations in childhood. *J Allergy Clin Immunol*, 120(1):84–90, Jul 2007.

- [147] K. Iken, S. Chheng, A. Fargin, A.C. Goulet, and E. Kouassi. Serotonin upregulates mitogen-stimulated b lymphocyte proliferation through 5-ht1a receptors. *Cell Immunol.*, 163(1):1–9, June 1995.
- [148] Niels K Jerne and Albert A Nordin. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science*, 140(3565):405, Apr 1963.
- [149] Michael Kabesch, Iren Tzotcheva, David Carr, Claudia Höfler, Stephan K Weiland, Christian Fritzsche, Erika von Mutius, and Fernando D Martinez. A complete screening of the il4 gene: novel polymorphisms and their association with asthma and ige in childhood. *J Allergy Clin Immunol*, 112(5):893–898, Nov 2003.
- [150] L. Kabilan, G. Andersson, F. Lolli, H.P. Ekre, T. Olsson, and M. Troye-Blomberg. Detection of intracellular expression and secretion of interferon-gamma at the single-cell level after activation of human t cells with tetanus toxoid in vitro. *Eur.J.Immunol.*, 20(5):1085–1089, May 1990.
- [151] A. Kalyuzhny and S. Stark. A simple method to reduce the background and improve well-to-well reproducibility of staining in elispot assays. *J.Immunol.Methods*, 257(1-2):93–97, November 2001.
- [152] Orhun H Kantarci, Janet L Schaefer-Klein, David D Hebrink, Sara J Achenbach, Elizabeth J Atkinson, Cynthia T McMurray, and Brian G Weinschenker. A population-based study of il4 polymorphisms in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 137(1-2):134–139, Apr 2003.
- [153] M. H. Kaplan, Y. L. Sun, T. Hoey, and M. J. Grusby. Impaired il-12 responses and enhanced development of th2 cells in stat4-deficient mice. *Nature*, 382(6587):174–177, Jul 1996.
- [154] E. Karpuzoglu-Sahin, Y. Zhi-Jun, A. Lengi, N. Sriranganathan, and S. Ansar Ahmed. Effects of long-term estrogen treatment on ifn-gamma, il-2 and il-4 gene expression and protein synthesis in spleen and thymus of normal c57bl/6 mice. *Cytokine*, 14(4):208–217, May 2001.
- [155] N. Kawamura, H. Tamura, S. Obana, M. Wenner, T. Ishikawa, A. Nakata, and H. Yamamoto. Differential effects of neuropeptides on cytokine production by mouse helper t cell subsets. *Neuroimmunomodulation.*, 5(1-2):9–15, January 1998.
- [156] H. Kelchtermans, S. Struyf, Klerck B. De, T. Mitera, M. Alen, L. Geboes, Balen M. Van, C. Dillen, W. Put, C. Gysemans, A. Billiau, Damme J. Van, and P. Matthys. Protective role of ifn-gamma in collagen-induced arthritis conferred by inhibition of mycobacteria-induced granulocyte chemotactic protein-2 production. *J.Leukoc.Biol.*, 81(4):1044–1053, April 2007.
- [157] I.A. Khan, G. Bhardwaj, N. Malla, C. Wattal, and S.C. Agarwal. Effect of serotonin on t lymphocyte proliferation in vitro in healthy individuals. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.*, 81(4):378–380, 1986.
- [158] A. Khoruts, S.D. Miller, and M.K. Jenkins. Neuroantigen-specific th2 cells are inefficient suppressors of experimental autoimmune encephalomyelitis induced by effector th1 cells. *J.Immunol.*, 155(10):5011–5017, November 1995.
- [159] K.H. Kim, K.C. Park, J.H. Chung, and H.R. Choi. The effect of substance p on peripheral blood mononuclear cells in patients with atopic dermatitis. *J.Dermatol.Sci.*, 32(2):115–124, August 2003.
- [160] T. Kincy-Cain and K.L. Bost. Substance p-induced il-12 production by murine macrophages. *J.Immunol.*, 158(5):2334–2339, March 1997.
- [161] Bertelsen A. Kjorsvik, Afrah A. Warsame, H. Gustafsson, A. Tjolsen, K. Hole, and C.O. Stiller. Stimulation of spinal 5-ht(2a/2c) receptors potentiates the capsaicin-induced in vivo release of substance p-like immunoreactivity in the rat dorsal horn. *Brain Res.*, 987(1):10–16, October 2003.

- [162] T. Kleinrath, C. Gassner, P. Lackner, M. Thurnher, and R. Ramoner. Interleukin-4 promoter polymorphisms: a genetic prognostic factor for survival in metastatic renal cell carcinoma. *J.Clin.Oncol.*, 25(7):845–851, March 2007.
- [163] I. H. Koçar, Z. Yesilova, M. Ozata, M. Turan, A. Sengül, and I. Ozdemir. The effect of testosterone replacement treatment on immunological features of patients with klinefelter’s syndrome. *Clin Exp Immunol*, 121(3):448–452, Sep 2000.
- [164] M. Kondo, T. Takeshita, N. Ishii, M. Nakamura, S. Watanabe, K. Arai, and K. Sugamura. Sharing of the interleukin-2 (il-2) receptor gamma chain between receptors for il-2 and il-4. *Science*, 262(5141):1874–1877, Dec 1993.
- [165] Y. T. Konttinen, P. Kempainen, M. Segerberg, M. Hukkanen, R. Rees, S. Santavirta, T. Sorsa, A. Pertovaara, and J. M. Polak. Peripheral and spinal neural mechanisms in arthritis, with particular reference to treatment of inflammation and pain. *Arthritis Rheum*, 37(7):965–982, Jul 1994.
- [166] M.S. Kramer. Update on substance p (nk-1 receptor) antagonists in clinical trials for depression. *Neuropeptides*, 34(5):255–, October 2000.
- [167] M.S. Kramer. Clinical update: substance p antagonists in patients with major depression. *Eur.Psychiatry*, 17 Suppl 1:10–, May 2002.
- [168] M.S. Kramer, N. Cutler, J. Feighner, R. Shrivastava, J. Carman, J.J. Sramek, S.A. Reines, G. Liu, D. Snavely, E. Wyatt-Knowles, J.J. Hale, S.G. Mills, M. MacCoss, C.J. Swain, T. Harrison, R.G. Hill, F. Hefti, E.M. Scolnick, M.A. Cascieri, G.G. Chicchi, S. Sadowski, A.R. Williams, L. Hewson, D. Smith, N.M. Rupniak, and . Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance p receptors. *Science*, 281(5383):1640–1645, September 1998.
- [169] T.R. Kramer. Application of whole-blood cultures to field study measurements of cellular immune function in vitro. In *Military Strategies for Sustainment of Nutrition and Immune Function in the Field*, number 10, pages 249–262. The National Academy Press, Washington, D.C., 1999.
- [170] J.J. Lafaille, F.V. Keere, A.L. Hsu, J.L. Baron, W. Haas, C.S. Raine, and S. Tonegawa. Myelin basic protein-specific t helper 2 (th2) cells cause experimental autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient hosts rather than protect them from the disease. *J.Exp.Med.*, 186(2):307–312, July 1997.
- [171] J.P. Lai, S.D. Douglas, and W.Z. Ho. Human lymphocytes express substance p and its receptor. *J.Neuroimmunol.*, 86(1):80–86, June 1998.
- [172] J.P. Lai, S.D. Douglas, M. Zhao, and W.Z. Ho. Quantification of substance p mrna in human mononuclear phagocytes and lymphocytes using a mimic-based rt-pcr. *J.Immunol.Methods*, 230(1-2):149–157, November 1999.
- [173] Stefano Landi, Fabio Bottari, Federica Gemignani, Lydie Gioia-Patricola, Elisabeth Guino, Alfonso Osorio, Javier de Oca, Gabriel Capella, Federico Canzian, Victor Moreno, and Bellvitge Colorectal Cancer Study Group. Interleukin-4 and interleukin-4 receptor polymorphisms and colorectal cancer risk. *Eur J Cancer*, 43(4):762–768, Mar 2007.
- [174] M.A. Laurenzi, M.A. Persson, C.J. Dalsgaard, and A. Haegerstrand. The neuropeptide substance p stimulates production of interleukin 1 in human blood monocytes: activated cells are preferentially influenced by the neuropeptide. *Scand.J.Immunol.*, 31(4):529–533, April 1990.
- [175] F.K. Lee, A.J. Nahmias, S. Lowery, S. Nesheim, S. Reef, S. Thompson, J. Oleske, A. Vahlne, and C. Czerkinsky. Elispot: a new approach to studying the dynamics of virus-immune system

- interaction for diagnosis and monitoring of hiv infection. *AIDS Res.Hum.Retroviruses*, 5(5):517–523, October 1989.
- [176] H.R. Lee, W.Z. Ho, and S.D. Douglas. Substance p augments tumor necrosis factor release in human monocyte-derived macrophages. *Clin.Diagn.Lab Immunol.*, 1(4):419–423, July 1994.
- [177] F. Lembeck and R. Gamse. Substance p in peripheral sensory processes. *Ciba Found.Symp.*, (91):35–54, 1982.
- [178] F. Lembeck and P. Holzer. Substance p as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.*, 310(2):175–183, December 1979.
- [179] M. Leon-Ponte, G.P. Ahern, and P.J. O’Connell. Serotonin provides an accessory signal to enhance t-cell activation by signaling through the 5-ht7 receptor. *Blood*, 109(8):3139–3146, April 2007.
- [180] W.J. Leonard and J.X. Lin. Cytokine receptor signaling pathways. *J.Allergy Clin.Immunol.*, 105(5):877–888, May 2000.
- [181] J.D. Levine, R. Clark, M. Devor, C. Helms, M.A. Moskowitz, and A.I. Basbaum. Intraneuronal substance p contributes to the severity of experimental arthritis. *Science*, 226(4674):547–549, November 1984.
- [182] M. Levite. Neuropeptides, by direct interaction with t cells, induce cytokine secretion and break the commitment to a distinct t helper phenotype. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 95(21):12544–12549, October 1998.
- [183] M. Levite. Nerve-driven immunity. the direct effects of neurotransmitters on t-cell function. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 917:307–321, 2000.
- [184] M. Levite. Neurotransmitters activate t-cells and elicit crucial functions via neurotransmitter receptors. *Curr.Opin.Pharmacol.*, 8(4):460–471, August 2008.
- [185] M. Levite, Y. Chowder, Y. Ganor, M. Besser, R. Hershkovits, and L. Cahalon. Dopamine interacts directly with its d3 and d2 receptors on normal human t cells, and activates beta1 integrin function. *Eur.J.Immunol.*, 31(12):3504–3512, December 2001.
- [186] A. D. Levy and L. D. Van de Kar. Endocrine and receptor pharmacology of serotonergic anxiolytics, antipsychotics and antidepressants. *Life Sci*, 51(2):83–94, 1992.
- [187] D. J. Lew, T. Decker, I. Strehlow, and J. E. Darnell. Overlapping elements in the guanylate-binding protein gene promoter mediate transcriptional induction by alpha and gamma interferons. *Mol Cell Biol*, 11(1):182–191, Jan 1991.
- [188] K. Lieb, B.L. Fiebich, M. Busse-Grawitz, M. Hull, M. Berger, and J. Bauer. Effects of substance p and selected other neuropeptides on the synthesis of interleukin-1 beta and interleukin-6 in human monocytes: a re-examination. *J.Neuroimmunol.*, 67(2):77–81, July 1996.
- [189] J. X. Lin, T. S. Migone, M. Tsang, M. Friedmann, J. A. Weatherbee, L. Zhou, A. Yamauchi, E. T. Bloom, J. Mietz, and S. John. The role of shared receptor motifs and common stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by il-2, il-4, il-7, il-13, and il-15. *Immunity*, 2(4):331–339, Apr 1995.
- [190] M.D. Linnik and M.A. Moskowitz. Identification of immunoreactive substance p in human and other mammalian endothelial cells. *Peptides*, 10(5):957–962, September 1989.

- [191] R. Liu, Y. Ding, and G.K. Aghajanian. Neurokinins activate local glutamatergic inputs to serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology*, 27(3):329–340, September 2002.
- [192] X. Liu, R. Nickel, K. Beyer, U. Wahn, E. Ehrlich, L.R. Freidhoff, B. Bjorksten, T.H. Beaty, and S.K. Huang. An il13 coding region variant is associated with a high total serum ige level and atopic dermatitis in the german multicenter atopy study (mas-90). *J.Allergy Clin.Immunol.*, 106(1 Pt 1):167–170, July 2000.
- [193] Xin Liu, Terri H Beaty, Philipp Deindl, Shau-Ku Huang, Susanne Lau, Christine Sommerfeld, M. Daniele Fallin, W. H Linda Kao, Ulrich Wahn, and Renate Nickel. Associations between specific serum ige response and 6 variants within the genes il4, il13, and il4ra in german children: the german multicenter atopy study. *J Allergy Clin Immunol*, 113(3):489–495, Mar 2004.
- [194] S. M. Liva and R. R. Voskuhl. Testosterone acts directly on cd4+ t lymphocytes to increase il-10 production. *J Immunol*, 167(4):2060–2067, Aug 2001.
- [195] G. G. Loots, R. M. Locksley, C. M. Blankespoor, Z. E. Wang, W. Miller, E. M. Rubin, and K. A. Frazer. Identification of a coordinate regulator of interleukins 4, 13, and 5 by cross-species sequence comparisons. *Science*, 288(5463):136–140, Apr 2000.
- [196] M. Lotz, D. A. Carson, and J. H. Vaughan. Substance p activation of rheumatoid synoviocytes: neural pathway in pathogenesis of arthritis. *Science*, 235(4791):893–895, Feb 1987.
- [197] M. Lotz, J.H. Vaughan, and D.A. Carson. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science*, 241(4870):1218–1221, September 1988.
- [198] W. Luttmann, B. Knoechel, M. Foerster, H. Matthys, Jr. Virchow, J.C., and C. Kroegel. Activation of human eosinophils by il-13. induction of cd69 surface antigen, its relationship to messenger rna expression, and promotion of cellular viability. *J.Immunol.*, 157(4):1678–1683, August 1996.
- [199] X. Ma, J. M. Chow, G. Gri, G. Carra, F. Gerosa, S. F. Wolf, R. Dzialo, and G. Trinchieri. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J Exp Med*, 183(1):147–157, Jan 1996.
- [200] S. Madretsma, L. M. Wolters, J. P. van Dijk, C. J. Tak, C. Feyerabend, J. H. Wilson, and F. J. Zijlstra. In-vivo effect of nicotine on cytokine production by human non-adherent mononuclear cells. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 8(10):1017–1020, Oct 1996.
- [201] M. Maes, C. Song, A.H. Lin, S. Bonaccorso, G. Kenis, R. De Jongh, E. Bosmans, and S. Scharpe. Negative immunoregulatory effects of antidepressants: inhibition of interferon-gamma and stimulation of interleukin-10 secretion. *Neuropsychopharmacology*, 20(4):370–379, April 1999.
- [202] J. Magram, J. Sfarra, S. Connaughton, D. Faherty, R. Warrier, D. Carvajal, C. Y. Wu, C. Stewart, U. Sarmiento, and M. K. Gately. Il-12-deficient mice are defective but not devoid of type 1 cytokine responses. *Ann N Y Acad Sci*, 795:60–70, Oct 1996.
- [203] D. Marazziti, L. Palego, B. Dal Canto, A. Rotondo, M. Pasqualetti, G. Gino, A. Lucacchini, H. Ladinsky, I. Nardi, and G. B. Cassano. Presence of serotonin1a (5-ht1a) receptor mrna without binding of [3h]-8-oh-dpat in peripheral blood mononuclear cells. *Life Sci*, 57(24):2197–2203, 1995.
- [204] A. Marfaing-Koka, O. Devergne, G. Gorgone, A. Portier, T.J. Schall, P. Galanaud, and D. Emilie. Regulation of the production of the rantes chemokine by endothelial cells. synergistic induction by ifn-gamma plus tnf-alpha and inhibition by il-4 and il-13. *J.Immunol.*, 154(4):1870–1878, February 1995.

- [205] F.C. Martin, P.A. Anton, J.A. Gornbein, F. Shanahan, and J.E. Merrill. Production of interleukin-1 by microglia in response to substance p: role for a non-classical nk-1 receptor. *J.Neuroimmunol.*, 42(1):53–60, January 1993.
- [206] O. Martinez-Maza, U. Andersson, J. Andersson, S. Britton, and Ley M. De. Spontaneous production of interferon-gamma in adult and newborn humans. *J.Immunol.*, 132(1):251–255, January 1984.
- [207] Kohsuke Masutani, Katsuhisa Miyake, Hitoshi Nakashima, Tadashi Hirano, Michiaki Kubo, Makoto Hirakawa, Kazuhiko Tsuruya, Kyoichi Fukuda, Hidetoshi Kanai, Takeshi Otsuka, Hideki Hirakata, and Mitsuo Iida. Impact of interferon-gamma and interleukin-4 gene polymorphisms on development and progression of iga nephropathy in japanese patients. *Am J Kidney Dis*, 41(2):371–379, Feb 2003.
- [208] A. Matejuk, K. Adlard, A. Zamora, M. Silverman, A. A. Vandembark, and H. Offner. 17 beta-estradiol inhibits cytokine, chemokine, and chemokine receptor mrna expression in the central nervous system of female mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res*, 65(6):529–542, Sep 2001.
- [209] M. Matsuyama, K. Sugamura, Y. Kawade, and Y. Hinuma. Production of immune interferon by human cytotoxic t cell clones. *J.Immunol.*, 129(2):450–451, August 1982.
- [210] S.E. Mau, T. Saermark, and H. Vilhardt. Cross-talk between cellular signaling pathways activated by substance p and vasoactive intestinal peptide in rat lactotroph-enriched pituitary cell cultures. *Endocrinology*, 138(4):1704–1711, April 1997.
- [211] L.P. McCluskey and L.A. Lampson. Local immune regulation in the central nervous system by substance p vs. glutamate. *J.Neuroimmunol.*, 116(2):136–146, June 2001.
- [212] A.N. McKenzie, J.A. Culpepper, Malefyt R. de Waal, F. Briere, J. Punnonen, G. Aversa, A. Sato, W. Dang, B.G. Cocks, S. Menon, and . Interleukin 13, a t-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and b-cell function. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 90(8):3735–3739, April 1993.
- [213] S. McLean, A.H. Ganong, T.F. Seeger, D.K. Bryce, K.G. Pratt, L.S. Reynolds, C.J. Siok, III Lowe, J.A., and J. Heym. Activity and distribution of binding sites in brain of a nonpeptide substance p (nk1) receptor antagonist. *Science*, 251(4992):437–439, January 1991.
- [214] L. Meda, S. Bernasconi, C. Bonaiuto, S. Sozzani, D. Zhou, Jr. Otvos, L., A. Mantovani, F. Rossi, and M.A. Cassatella. Beta-amyloid (25-35) peptide and ifn-gamma synergistically induce the production of the chemotactic cytokine mcp-1/je in monocytes and microglial cells. *J.Immunol.*, 157(3):1213–1218, August 1996.
- [215] D. Mileusnic, J.M. Lee, D.J. Magnuson, M.J. Hejna, J.E. Krause, J.B. Lorens, and S.A. Lorens. Neurokinin-3 receptor distribution in rat and human brain: an immunohistochemical study. *Neuroscience*, 89(4):1269–1290, 1999.
- [216] L. E. Miller, H. P. Jüsten, J. Schölmerich, and R. H. Straub. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. *FASEB J*, 14(13):2097–2107, Oct 2000.
- [217] B. Miloux, P. Laurent, O. Bonnin, J. Lupker, D. Caput, N. Vita, and P. Ferrara. Cloning of the human il-13r alpha1 chain and reconstitution with the il4r alpha of a functional il-4/il-13 receptor complex. *FEBS Lett.*, 401(2-3):163–166, January 1997.
- [218] M. Minami, T. Endo, H. Yokota, T. Ogawa, M. Nemoto, N. Hamaue, M. Hirafuji, M. Yoshioka, A. Nagahisa, and P.L. Andrews. Effects of cp-99, 994, a tachykinin nk(1) receptor antagonist, on abdominal afferent vagal activity in ferrets: evidence for involvement of nk(1) and 5-ht(3) receptors. *Eur.J.Pharmacol.*, 428(2):215–220, October 2001.

- [219] A. Minty, P. Chalon, J.M. Derocq, X. Dumont, J.C. Guillemot, M. Kaghad, C. Labit, P. Leplatois, P. Liauzun, B. Miloux, and . Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*, 362(6417):248–250, March 1993.
- [220] M. Mochizuki, J. Bartels, A. I. Mallet, E. Christophers, and J. M. Schröder. Il-4 induces eotaxin: a possible mechanism of selective eosinophil recruitment in helminth infection and atopy. *J Immunol*, 160(1):60–68, Jan 1998.
- [221] K.A. Mohammed, N. Nasreen, M.J. Ward, and V.B. Antony. Helper t cell type 1 and 2 cytokines regulate c-c chemokine expression in mouse pleural mesothelial cells. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, 159(5 Pt 1):1653–1659, May 1999.
- [222] S.A. Moller and C.A. Borrebaeck. A filter immuno-plaque assay for the detection of antibody-secreting cells in vitro. *J.Immunol.Methods*, 79(2):195–204, May 1985.
- [223] F. Momburg, N. Koch, P. Moller, G. Moldenhauer, G.W. Butcher, and G.J. Hammerling. Differential expression of ia and ia-associated invariant chain in mouse tissues after in vivo treatment with ifn-gamma. *J.Immunol.*, 136(3):940–948, February 1986.
- [224] T.C. Moore, J.L. Lami, and C.H. Spruck. Substance p increases lymphocyte traffic and lymph flow through peripheral lymph nodes of sheep. *Immunology*, 67(1):109–114, May 1989.
- [225] P. O. Mora, C. F. Netto, and F. G. Graeff. Role of 5-ht2a and 5-ht2c receptor subtypes in the two types of fear generated by the elevated t-maze. *Pharmacol Biochem Behav*, 58(4):1051–1057, Dec 1997.
- [226] J.G. Morgan, G.M. Dolganov, S.E. Robbins, L.M. Hinton, and M. Lovett. The selective isolation of novel cdnas encoded by the regions surrounding the human interleukin 4 and 5 genes. *Nucleic Acids Res.*, 20(19):5173–5179, October 1992.
- [227] T.R. Mosmann and R.L. Coffman. Th1 and th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu.Rev.Immunol.*, 7:145–173, 1989.
- [228] T. Murata, S.R. Husain, H. Mohri, and R.K. Puri. Two different il-13 receptor chains are expressed in normal human skin fibroblasts, and il-4 and il-13 mediate signal transduction through a common pathway. *Int.Immunol.*, 10(8):1103–1110, August 1998.
- [229] C.A. Nacy, S.L. James, W.R. Benjamin, J.J. Farrar, W.T. Hockmeyer, and M.S. Meltzer. Activation of macrophages for microbicidal and tumoricidal effector functions by soluble factors from el-4, a continuous t cell line. *Infect.Immun.*, 40(2):820–824, May 1983.
- [230] H. Nakashima, K. Miyake, Y. Inoue, S. Shimizu, M. Akahoshi, Y. Tanaka, T. Otsuka, and M. Harada. Association between il-4 genotype and il-4 production in the japanese population. *Genes Immun*, 3(2):107–109, Apr 2002.
- [231] P. Naveilhan, H. Hassani, G. Lucas, K. H. Blakeman, J. X. Hao, X. J. Xu, Z. Wiesenfeld-Hallin, P. Thorén, and P. Ernfors. Reduced antinociception and plasma extravasation in mice lacking a neuropeptide y receptor. *Nature*, 409(6819):513–517, Jan 2001.
- [232] Linh T Nguyen, Murali Ramanathan, Bianca Weinstock-Guttman, Monika Baier, Carol Brownschidle, and Lawrence D Jacobs. Sex differences in in vitro pro-inflammatory cytokine production from peripheral blood of multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci*, 209(1-2):93–99, May 2003.
- [233] DA Nickerson. Seattle snps nhlbiprogram for genomic applications. <http://pga.gs.washington.edu/data/il4>, 2007.

- [234] A. Nieters, J. Linseisen, and N. Becker. Association of polymorphisms in th1, th2 cytokine genes with hayfever and atopy in a subsample of epic-heidelberg. *Clin Exp Allergy*, 34(3):346–353, Mar 2004.
- [235] G. Nilsson, B. Pernow, G.H. Fischer, and K. Folkers. Presence of substance p-like immunoreactivity in plasma from man and dog. *Acta Physiol Scand.*, 94(4):542–544, August 1975.
- [236] G. Nilsson, S. Rak, and S. Ahlstedt. The influence of substance p on the proliferation of peripheral blood lymphocytes from normal individuals and birch pollen-allergic patients. *Allergy*, 42(7):516–523, October 1987.
- [237] Eran Nizri, Michal Irony-Tur-Sinai, Omer Lory, Avi Orr-Urtreger, Ehud Lavi, and Talma Brenner. Activation of the cholinergic anti-inflammatory system by nicotine attenuates neuroinflammation via suppression of th1 and th17 responses. *J Immunol*, 183(10):6681–6688, Nov 2009.
- [238] E. Noguchi, Y. Nukaga-Nishio, Z. Jian, Y. Yokouchi, M. Kamioka, K. Yamakawa-Kobayashi, H. Hamaguchi, A. Matsui, M. Shibasaki, and T. Arinami. Haplotypes of the 5' region of the il-4 gene and snps in the intergene sequence between the il-4 and il-13 genes are associated with atopic asthma. *Hum Immunol*, 62(11):1251–1257, Nov 2001.
- [239] K. Nordlind and V. Mutt. Influence of beta-endorphin, somatostatin, substance p and vasoactive intestinal peptide on the proliferative response of human peripheral blood t lymphocytes to mercuric chloride. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.*, 80(3):326–328, 1986.
- [240] K. Nordlind and E. Sundstrom. Different modulating effects of the monoamines adrenaline, noradrenaline, and serotonin on the dna synthesis response of human peripheral blood t lymphocytes activated by mercuric chloride and nickel sulfate. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.*, 87(3):317–320, 1988.
- [241] K. Nordlind, E. Sundstrom, and L. Bondesson. Inhibiting effects of serotonin antagonists on the proliferation of mercuric chloride stimulated human peripheral blood t lymphocytes. *Int.Arch.Allergy Immunol.*, 97(2):105–108, 1992.
- [242] H.C. Oettgen and R.S. Geha. Ige regulation and roles in asthma pathogenesis. *J.Allergy Clin.Immunol.*, 107(3):429–440, March 2001.
- [243] R. Oku, M. Satoh, and H. Takagi. Release of substance p from the spinal dorsal horn is enhanced in polyarthritic rats. *Neurosci.Lett.*, 74(3):315–319, March 1987.
- [244] I.C. Oliveira, N. Mukaida, K. Matsushima, and J. Vilcek. Transcriptional inhibition of the interleukin-8 gene by interferon is mediated by the nf-kappa b site. *Mol.Cell Biol.*, 14(8):5300–5308, August 1994.
- [245] I.C. Oliveira, P.J. Sciavolino, T.H. Lee, and J. Vilcek. Downregulation of interleukin 8 gene expression in human fibroblasts: unique mechanism of transcriptional inhibition by interferon. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 89(19):9049–9053, October 1992.
- [246] Sara H Olson, Irene Orlow, Jennifer Simon, Diana Tommasi, Pampa Roy, Sharon Bayuga, Emmy Ludwig, Ann G Zauber, and Robert C Kurtz. Allergies, variants in il-4 and il-4r alpha genes, and risk of pancreatic cancer. *Cancer Detect Prev*, 31(5):345–351, 2007.
- [247] W. Ouyang, S. H. Ranganath, K. Weindel, D. Bhattacharya, T. L. Murphy, W. C. Sha, and K. M. Murphy. Inhibition of th1 development mediated by gata-3 through an il-4-independent mechanism. *Immunity*, 9(5):745–755, Nov 1998.

- [248] Y. Ouyang, N. Virasch, P. Hao, M. T. Aubrey, N. Mukerjee, B. E. Bierer, and B. M. Freed. Suppression of human il-1beta, il-2, ifn-gamma, and tnf-alpha production by cigarette smoke extracts. *J Allergy Clin Immunol*, 106(2):280–287, Aug 2000.
- [249] E. Paffen, P. Medina, M. C H de Visser, A. van Wijngaarden, E. Zorio, A. Estellés, F. R. Rosendaal, F. España, R. M. Bertina, and C. J M Doggen. The -589c>t polymorphism in the interleukin-4 gene (il-4) is associated with a reduced risk of myocardial infarction in young individuals. *J Thromb Haemost*, 6(10):1633–1638, Oct 2008.
- [250] R. Palacios, O. Martinez-Maza, and Ley M. De. Production of human immune interferon (hu ifn-gamma) studied at the single cell level. origin, evidence for spontaneous secretion and effect of cyclosporin a. *Eur.J.Immunol.*, 13(3):221–225, March 1983.
- [251] D. Parker and S. Grillner. Cellular and synaptic modulation underlying substance p-mediated plasticity of the lamprey locomotor network. *J.Neurosci.*, 18(19):8095–8110, October 1998.
- [252] D.W. Pascual and K.L. Bost. Substance p production by p388d1 macrophages: a possible autocrine function for this neuropeptide. *Immunology*, 71(1):52–56, September 1990.
- [253] D.G. Payan, D.R. Brewster, and E.J. Goetzl. Specific stimulation of human t lymphocytes by substance p. *J.Immunol.*, 131(4):1613–1615, October 1983.
- [254] D.G. Payan, J.D. Levine, and E.J. Goetzl. Modulation of immunity and hypersensitivity by sensory neuropeptides. *J.Immunol.*, 132(4):1601–1604, April 1984.
- [255] C. Perrey, V. Pravica, P. J. Sinnott, and I. V. Hutchinson. Genotyping for polymorphisms in interferon-gamma, interleukin-10, transforming growth factor-beta 1 and tumour necrosis factor-alpha genes: a technical report. *Transpl Immunol*, 6(3):193–197, Sep 1998.
- [256] T. M. Petro, S. D. Schwartzbach, and S. Zhang. Smokeless tobacco and nicotine bring about excessive cytokine responses of murine memory t-cells. *Int J Immunopharmacol*, 21(2):103–114, Feb 1999.
- [257] Thomas M Petro, Lisa L Anderson, Jamie S Gowler, Xiao Juan Liu, and Steven D Schwartzbach. Smokeless tobacco extract decreases il-12 production from lps-stimulated but increases il-12 from ifn-gamma-stimulated macrophages. *Int Immunopharmacol*, 2(2-3):345–355, Feb 2002.
- [258] Peter Pietschmann, Eva Gollob, Susanne Brosch, Philipp Hahn, Stephan Kudlacek, Martin Wilhelm, Wolfgang Woloszczuk, Meinrad Peterlik, and Karl Heinz Tragl. The effect of age and gender on cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells and markers of bone metabolism. *Exp Gerontol*, 38(10):1119–1127, Oct 2003.
- [259] R. Pine, A. Canova, and C. Schindler. Tyrosine phosphorylated p91 binds to a single element in the isgf2/irf-1 promoter to mediate induction by ifn alpha and ifn gamma, and is likely to autoregulate the p91 gene. *EMBO J*, 13(1):158–167, Jan 1994.
- [260] F. Pociot, R. Veijola, J. Johannesen, P. M. Hansen, T. Lorenzen, A. E. Karlsen, H. Reijonen, M. Knip, and J. Nerup. Analysis of an interferon-gamma gene (ifng) polymorphism in danish and finnish insulin-dependent diabetes mellitus (iddm) patients and control subjects. danish study group of diabetes in childhood. *J Interferon Cytokine Res*, 17(2):87–93, Feb 1997.
- [261] S.M. Pope, E.B. Brandt, A. Mishra, S.P. Hogan, N. Zimmermann, K.I. Matthaei, P.S. Foster, and M.E. Rothenberg. Il-13 induces eosinophil recruitment into the lung by an il-5- and eotaxin-dependent mechanism. *J.Allergy Clin.Immunol.*, 108(4):594–601, October 2001.

- [262] S. Pradhan, G. Hanson, and W. Lovenberg. Inverse relation of substance p-like immunoreactivity in dorsal raphe nucleus to serotonin levels in pons-medulla following administration of cocaine and 5-hydroxytryptophan. *Biochem Pharmacol*, 30(10):1071–1076, May 1981.
- [263] V. Pravica, A. Asderakis, C. Perrey, A. Hajeer, P. J. Sinnott, and I. V. Hutchinson. In vitro production of ifn-gamma correlates with ca repeat polymorphism in the human ifn-gamma gene. *Eur J Immunogenet*, 26(1):1–3, Feb 1999.
- [264] V. Pravica, C. Perrey, A. Stevens, J. H. Lee, and I. V. Hutchinson. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human ifn-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic ca microsatellite marker of high ifn-gamma production. *Hum Immunol*, 61(9):863–866, Sep 2000.
- [265] Z. Preston, K. Lee, L. Widdowson, P.J. Richardson, and R.D. Pinnock. Tachykinins increase [3h]acetylcholine release in mouse striatum through multiple receptor subtypes. *Neuroscience*, 95(2):367–376, 2000.
- [266] Chul-Woo Pyo, Seong-Suk Hur, Yang-Kyum Kim, Hee-Baeg Choi, Young-Sun Hong, Dong-Wook Kim, Chun-Choo Kim, Hack-Ki Kim, and Tai-Gyu Kim. Polymorphisms of il-1b, il-1rn, il-2, il-4, il-6, il-10, and ifn-gamma genes in the korean population. *Hum Immunol*, 64(10):979–989, Oct 2003.
- [267] H-L. Qiao, J. Yang, and Y-W. Zhang. Relationships between specific serum ige, cytokines and polymorphisms in the il-4, il-4ralpha in patients with penicillins allergy. *Allergy*, 60(8):1053–1059, Aug 2005.
- [268] A. Raitala, M. Pertovaara, J. Karjalainen, S. S. Oja, and M. Hurme. Association of interferon-gamma +874(t/a) single nucleotide polymorphism with the rate of tryptophan catabolism in healthy individuals. *Scand J Immunol*, 61(4):387–390, Apr 2005.
- [269] P. Rathanaswami, M. Hachicha, M. Sadick, T.J. Schall, and S.R. McColl. Expression of the cytokine rantes in human rheumatoid synovial fibroblasts. differential regulation of rantes and interleukin-8 genes by inflammatory cytokines. *J.Biol.Chem.*, 268(8):5834–5839, March 1993.
- [270] H. Repke and M. Bienert. Mast cell activation—a receptor-independent mode of substance p action? *FEBS Lett.*, 221(2):236–240, September 1987.
- [271] R.L. Robson, R.M. McLoughlin, J. Witowski, P. Loetscher, T.S. Wilkinson, S.A. Jones, and N. Topley. Differential regulation of chemokine production in human peritoneal mesothelial cells: Ifn-gamma controls neutrophil migration across the mesothelium in vitro and in vivo. *J.Immunol.*, 167(2):1028–1038, July 2001.
- [272] Matthew V Rockman, Matthew W Hahn, Nicole Soranzo, David B Goldstein, and Gregory A Wray. Positive selection on a human-specific transcription factor binding site regulating il4 expression. *Curr Biol*, 13(23):2118–2123, Dec 2003.
- [273] Y. Rongcun, H. Maes, M. Corsi, F. Dellner, T. Wen, and R. Kiessling. Interferon gamma impairs the ability of monocyte-derived dendritic cells to present tumour-specific and allo-specific antigens and reduces their expression of cd1a, cd80 and cd4. *Cytokine*, 10(10):747–755, October 1998.
- [274] J. Ronnelid and L. Klareskog. A comparison between elispot methods for the detection of cytokine producing cells: greater sensitivity and specificity using elisa plates as compared to nitrocellulose membranes. *J.Immunol.Methods*, 200(1-2):17–26, January 1997.
- [275] L. J. Rosenwasser, D. J. Klemm, J. K. Dresback, H. Inamura, J. J. Mascali, M. Klinnert, and L. Borish. Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. *Clin Exp Allergy*, 25 Suppl 2:74–8; discussion 95–6, Nov 1995.

- [276] D. A. Rozwarski, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, J. F. Bazan, A. Bohm, A. Wlodawer, M. Hatada, and P. A. Karplus. Structural comparisons among the short-chain helical cytokines. *Structure*, 2(3):159–173, Mar 1994.
- [277] A. Ruiz-Linares. Dinucleotide repeat polymorphism in the interferon-gamma (ifng) gene. *Hum Mol Genet*, 2(9):1508, Sep 1993.
- [278] Alireza Sadeghnejad, Wilfried Karmaus, S. Hasan Arshad, and Susan Ewart. Il13 gene polymorphism association with cord serum immunoglobulin e. *Pediatr Allergy Immunol*, 18(4):288–292, Jun 2007.
- [279] Alireza Sadeghnejad, Wilfried Karmaus, S. Hasan Arshad, Ramesh Kurukulaaratchy, Marianne Huebner, and Susan Ewart. Il13 gene polymorphisms modify the effect of exposure to tobacco smoke on persistent wheeze and asthma in childhood, a longitudinal study. *Respir Res*, 9:2, 2008.
- [280] M. Sakuma, K. Yoshioka, H. Suzuki, M. Yanagisawa, Y. Onishi, N. Kobayashi, and M. Otsuka. Substance p-evoked release of gaba from isolated spinal cord of the newborn rat. *Neuroscience*, 45(2):323–330, 1991.
- [281] Nilgün Sallakci, Mesut Coskun, Zafer Berber, Fuat Gürkan, Halil Kocamaz, Gülnar Uysal, Sabin Bhujju, Ugur Yavuzer, Mahavir Singh, and Olcay Ye?in. Interferon-gamma gene+874t-a polymorphism is associated with tuberculosis and gamma interferon response. *Tuberculosis (Edinb)*, 87(3):225–230, May 2007.
- [282] Virginia M Sanders and Rainer H Straub. Norepinephrine, the beta-adrenergic receptor, and immunity. *Brain Behav Immun*, 16(4):290–332, Aug 2002.
- [283] L. Santarelli, G. Gobbi, P. Blier, and R. Hen. Behavioral and physiologic effects of genetic or pharmacologic inactivation of the substance p receptor (nk1). *J.Clin.Psychiatry*, 63 Suppl 11:11–17, 2002.
- [284] L. Santarelli, G. Gobbi, P.C. Debs, E.T. Sibille, P. Blier, R. Hen, and M.J. Heath. Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviors and increases serotonergic function. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 98(4):1912–1917, February 2001.
- [285] D. Saphier, J. E. Welch, G. E. Farrar, N. Q. Nguyen, F. Aguado, T. R. Thaller, and D. S. Knight. Interactions between serotonin, thyrotropin-releasing hormone, and substance p in the cns regulation of adrenocortical secretion. *Psychoneuroendocrinology*, 19(8):779–797, 1994.
- [286] H. G. Schaible and B. D. Grubb. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain*, 55(1):5–54, Oct 1993.
- [287] H.G. Schaible, B. Jarrott, P.J. Hope, and A.W. Duggan. Release of immunoreactive substance p in the spinal cord during development of acute arthritis in the knee joint of the cat: a study with antibody microprobes. *Brain Res.*, 529(1-2):214–223, October 1990.
- [288] Kate Schroder, Paul J Hertzog, Timothy Ravasi, and David A Hume. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*, 75(2):163–189, Feb 2004.
- [289] J.D. Sedgwick and P.G. Holt. A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells. *J.Immunol.Methods*, 57(1-3):301–309, February 1983.
- [290] J.D. Sedgwick and P.G. Holt. The elisa-plaque assay for the detection and enumeration of antibody-secreting cells. an overview. *J.Immunol.Methods*, 87(1):37–44, February 1986.

- [291] A. Senik, S. Stefanos, J.P. Kolb, M. Lucero, and E. Falcoff. Enhancement of mouse natural killer cell activity by type ii interferon. *Ann.Immunol.(Paris)*, 131C(3):349–361, May 1980.
- [292] V. Sergejev, T. Hokfelt, and Y. Hurd. Serotonin and substance p co-exist in dorsal raphe neurons of the human brain. *Neuroreport*, 10(18):3967–3970, December 1999.
- [293] M.C. Serra, F. Calzetti, M. Ceska, and M.A. Cassatella. Effect of substance p on superoxide anion and il-8 production by human pmnl. *Immunology*, 82(1):63–69, May 1994.
- [294] Won Ho Shin, Da-Yong Lee, Keun Woo Park, Seung Up Kim, Myung-Soon Yang, Eun-Hye Joe, and Byung Kwan Jin. Microglia expressing interleukin-13 undergo cell death and contribute to neuronal survival in vivo. *Glia*, 46(2):142–152, Apr 2004.
- [295] Y. Shirayama, H. Mitsushio, M. Takashima, H. Ichikawa, and K. Takahashi. Reduction of substance p after chronic antidepressants treatment in the striatum, substantia nigra and amygdala of the rat. *Brain Res.*, 739(1-2):70–78, November 1996.
- [296] C.L. Sidman, J.D. Marshall, L.D. Shultz, P.W. Gray, and H.M. Johnson. Gamma-interferon is one of several direct b cell-maturing lymphokines. *Nature*, 309(5971):801–804, June 1984.
- [297] H. Sigmundsdottir, B. Sigurgeirsson, M. Troye-Blomberg, M.F. Good, H. Valdimarsson, and I. Jonsdottir. Circulating t cells of patients with active psoriasis respond to streptococcal m-peptides sharing sequences with human epidermal keratins. *Scand.J.Immunol.*, 45(6):688–697, June 1997.
- [298] Alla Skapenko, Joachim R Kalden, Peter E Lipsky, and Hendrik Schulze-Koops. The il-4 receptor alpha-chain-binding cytokines, il-4 and il-13, induce forkhead box p3-expressing cd25+cd4+ regulatory t cells from cd25-cd4+ precursors. *J Immunol*, 175(9):6107–6116, Nov 2005.
- [299] M.J. Skoskiewicz, R.B. Colvin, E.E. Schneeberger, and P.S. Russell. Widespread and selective induction of major histocompatibility complex-determined antigens in vivo by gamma interferon. *J.Exp.Med.*, 162(5):1645–1664, November 1985.
- [300] P. Skrabanek, D. Cannon, J. Kirrane, D. Legge, and D. Powell. Circulating immunoreactive substance p in man. *Ir.J.Med.Sci.*, 145(12):399–408, December 1976.
- [301] D.O. Slauson, C. Walker, F. Kristensen, Y. Wang, and A.L. de Weck. Mechanisms of serotonin-induced lymphocyte proliferation inhibition. *Cell Immunol.*, 84(2):240–252, April 1984.
- [302] D.V. Smirnov, M.G. Smirnova, V.G. Korobko, and E.I. Frolova. Tandem arrangement of human genes for interleukin-4 and interleukin-13: resemblance in their organization. *Gene*, 155(2):277–281, April 1995.
- [303] A.J. Smith and S.E. Humphries. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 20(1):43–59, February 2009.
- [304] Mark J Smyth, Yoshihiro Hayakawa, Kazuyoshi Takeda, and Hideo Yagita. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2(11):850–861, Nov 2002.
- [305] P. Sozzani, C. Cambon, N. Vita, M.H. Seguelas, D. Caput, P. Ferrara, and B. Pipy. Interleukin-13 inhibits protein kinase c-triggered respiratory burst in human monocytes. role of calcium and cyclic amp. *J.Biol.Chem.*, 270(10):5084–5088, March 1995.
- [306] A. Spangeus, S. Forsgren, and M. El-Salhy. Effect of diabetic state on co-localization of substance p and serotonin in the gut in animal models. *Histol.Histopathol.*, 16(2):393–398, April 2001.

- [307] A.M. Stanisiz, D. Befus, and J. Bienenstock. Differential effects of vasoactive intestinal peptide, substance p, and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferations by lymphocytes from peyer's patches, mesenteric lymph nodes, and spleen. *J.Immunol.*, 136(1):152–156, January 1986.
- [308] R. Steinberg, N. Marco, B. Voutsinos, M. Bensaid, D. Rodier, J. Souilhac, R. Alonso, F. Oury-Donat, Fur G. Le, and P. Soubrie. Expression and presence of septal neurokinin-2 receptors controlling hippocampal acetylcholine release during sensory stimulation in rat. *Eur.J.Neurosci.*, 10(7):2337–2345, July 1998.
- [309] E.M. Sternberg, J. Trial, and C.W. Parker. Effect of serotonin on murine macrophages: suppression of ia expression by serotonin and its reversal by 5-ht2 serotonergic receptor antagonists. *J.Immunol.*, 137(1):276–282, July 1986.
- [310] E.M. Sternberg, H.J. Wedner, M.K. Leung, and C.W. Parker. Effect of serotonin (5-ht) and other monoamines on murine macrophages: modulation of interferon-gamma induced phagocytosis. *J.Immunol.*, 138(12):4360–4365, June 1987.
- [311] T.L. Stevens, A. Bossie, V.M. Sanders, R. Fernandez-Botran, R.L. Coffman, T.R. Mosmann, and E.S. Vitetta. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper t cells. *Nature*, 334(6179):255–258, July 1988.
- [312] R. Strait, S.C. Morrist, and F.D. Finkelman. Cytokine enhancement of anaphylaxis. *Novartis.Found.Symp.*, 257:80–91, 2004.
- [313] V. Suppiah, M. Rooney, and K. Vandenbroeck. Polymorphisms in the interleukin-4 and il-4 receptor genes modify risk for chronic inflammatory arthropathies in women. *Exp Mol Pathol*, 81(3):239–244, Dec 2006.
- [314] T. Suwabe and R.M. Bradley. Effects of 5-hydroxytryptamine and substance p on neurons of the inferior salivatory nucleus. *J.Neuropsychiol.*, 97(4):2605–2611, April 2007.
- [315] I. Suzuki, N. Hizawa, E. Yamaguchi, and Y. Kawakami. Association between a c+33t polymorphism in the il-4 promoter region and total serum ige levels. *Clin Exp Allergy*, 30(12):1746–1749, Dec 2000.
- [316] S. J. Szabo, A. S. Dighe, U. Gubler, and K. M. Murphy. Regulation of the interleukin (il)-12r beta 2 subunit expression in developing t helper 1 (th1) and th2 cells. *J Exp Med*, 185(5):817–824, Mar 1997.
- [317] Hideo K Takahashi, Hiromi Iwagaki, Ryosuke Hamano, Toru Kanke, Keyue Liu, Hiroshi Sadamori, Takahito Yagi, Tadashi Yoshino, Noriaki Tanaka, and Masahiro Nishibori. The immunosuppressive effects of nicotine during human mixed lymphocyte reaction. *Eur J Pharmacol*, 559(1):69–74, Mar 2007.
- [318] Hideo Kohka Takahashi, Hiromi Iwagaki, Ryosuke Hamano, Tadashi Yoshino, Noriaki Tanaka, and Masahiro Nishibori. alpha7 nicotinic acetylcholine receptor stimulation inhibits lipopolysaccharide-induced interleukin-18 and -12 production in monocytes. *J Pharmacol Sci*, 102(1):143–146, Sep 2006.
- [319] K. Takahashi, A. Tanaka, M. Hara, and S. Nakanishi. The primary structure and gene organization of human substance p and neuromedin k receptors. *Eur.J.Biochem.*, 204(3):1025–1033, March 1992.
- [320] Y. Takeda, J. Takeda, B.M. Smart, and J.E. Krause. Regional distribution of neuropeptide gamma and other tachykinin peptides derived from the substance p gene in the rat. *Regul.Pept.*, 28(3):323–333, May 1990.

- [321] T. Tanaka, J. Hu-Li, R. A. Seder, B. Fazekas de St Groth, and W. E. Paul. Interleukin 4 suppresses interleukin 2 and interferon gamma production by naive t cells stimulated by accessory cell-dependent receptor engagement. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(13):5914–5918, Jul 1993.
- [322] S. Tanguay and J.J. Killian. Direct comparison of elispot and elisa-based assays for detection of individual cytokine-secreting cells. *Lymphokine Cytokine Res.*, 13(4):259–263, August 1994.
- [323] Y. Taya, R. Devos, J. Tavernier, H. Cheroutre, G. Engler, and W. Fiers. Cloning and structure of the human immune interferon-gamma chromosomal gene. *EMBO J.*, 1(8):953–958, 1982.
- [324] W. E. Thierfelder, J. M. van Deursen, K. Yamamoto, R. A. Tripp, S. R. Sarawar, R. T. Carson, M. Y. Sangster, D. A. Vignali, P. C. Doherty, G. C. Grosveld, and J. N. Ihle. Requirement for stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and t cells. *Nature*, 382(6587):171–174, Jul 1996.
- [325] P.A. Tooney, G.G. Au, and L.A. Chahl. Localisation of tachykinin nk1 and nk3 receptors in the human prefrontal and visual cortex. *Neurosci.Lett.*, 283(3):185–188, April 2000.
- [326] E.H. Tran, E.N. Prince, and T. Owens. Ifn-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. *J.Immunol.*, 164(5):2759–2768, March 2000.
- [327] G.W. Tregear, H.D. Niall, Jr. Potts, J.T., S.E. Leeman, and M.M. Chang. Synthesis of substance p. *Nat.New Biol.*, 232(29):87–89, July 1971.
- [328] R.A. Tripp, A. Barskey, L. Goss, and L.J. Anderson. Substance p receptor expression on lymphocytes is associated with the immune response to respiratory syncytial virus infection. *J.Neuroimmunol.*, 129(1-2):141–153, August 2002.
- [329] D. M. Turner, D. M. Williams, D. Sankaran, M. Lazarus, P. J. Sinnott, and I. V. Hutchinson. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*, 24(1):1–8, Feb 1997.
- [330] R.J. Valentino, V. Bey, L. Pernar, and K.G. Commons. Substance p acts through local circuits within the rat dorsal raphe nucleus to alter serotonergic neuronal activity. *J.Neurosci.*, 23(18):7155–7159, August 2003.
- [331] Koen Vandebroek and An Goris. Cytokine gene polymorphisms in multifactorial diseases: gateways to novel targets for immunotherapy? *Trends Pharmacol Sci*, 24(6):284–289, Jun 2003.
- [332] J.E. Vaquerano, M. Peng, J.W. Chang, Y.M. Zhou, and S.P. Leong. Digital quantification of the enzyme-linked immunospot (elispot). *BioTechniques*, 25(5):830–836, November 1998.
- [333] Robert Vassallo, Paula R Kroening, Joseph Parambil, and Hirohito Kita. Nicotine and oxidative cigarette smoke constituents induce immune-modulatory and pro-inflammatory dendritic cell responses. *Mol Immunol*, 45(12):3321–3329, Jul 2008.
- [334] D. Verthelyi and D. M. Klinman. Sex hormone levels correlate with the activity of cytokine-secreting cells in vivo. *Immunology*, 100(3):384–390, Jul 2000.
- [335] L. Vitkovic, J. Bockaert, and C. Jacque. inflammatory cytokines: neuromodulators in normal brain? *J.Neurochem.*, 74(2):457–471, February 2000.
- [336] Frank D Vladich, Susan M Brazille, Debra Stern, Michael L Peck, Raffaella Ghittoni, and Donata Vercelli. Il-13 r130q, a common variant associated with allergy and asthma, enhances effector mechanisms essential for human allergic inflammation. *J Clin Invest*, 115(3):747–754, Mar 2005.

- [337] von Euler U.S. and Gaddum J.H. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J.Physiol.*, 72:74–87, 1931.
- [338] F. Wagner, R. Fink, R. Hart, and H. Dancygier. Substance p enhances interferon-gamma production by human peripheral blood mononuclear cells. *Regul.Pept.*, 19(5-6):355–364, December 1987.
- [339] Matthias Wahle, Gesine Hanefeld, Stephan Brunn, Rainer H Straub, Ulf Wagner, Andreas Krause, Holm Häntzschel, and Christoph G O Baerwald. Failure of catecholamines to shift t-cell cytokine responses toward a th2 profile in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 8(5):R138, 2006.
- [340] P. D. Walker, L. A. Riley, R. P. Hart, and G. M. Jonakait. Serotonin regulation of tachykinin biosynthesis in the rat neostriatum. *Brain Res*, 546(1):33–39, Apr 1991.
- [341] A. J. Walley and W. O. Cookson. Investigation of an interleukin-4 promoter polymorphism for associations with asthma and atopy. *J Med Genet*, 33(8):689–692, Aug 1996.
- [342] Sophia S Wang, J. Daniel Carreon, Barrie Hanchard, Stephen Chanock, and Michie Hisada. Common genetic variants and risk for non-hodgkin lymphoma and adult t-cell lymphoma/leukemia in jamaica. *Int J Cancer*, 125(6):1479–1482, Sep 2009.
- [343] Michiel C Warlé, Ayar Farhan, Herold J Metselaar, Wim C J Hop, Chris Perrey, Pieter E Zondervan, Marcel Kap, Jaap Kwekkeboom, Jan N M Ijzermans, Hugo W Tilanus, Vera Pravica, Ian V Hutchinson, and Gerda J Bouma. Are cytokine gene polymorphisms related to in vitro cytokine production profiles? *Liver Transpl*, 9(2):170–181, Feb 2003.
- [344] C.T. Weaver, R.D. Hatton, P.R. Mangan, and L.E. Harrington. Il-17 family cytokines and the expanding diversity of effector t cell lineages. *Annu.Rev.Immunol.*, 25:821–852, 2007.
- [345] E. Weihe, D. Nohr, S. Michel, S. Muller, H.J. Zentel, T. Fink, and J. Krekel. Molecular anatomy of the neuro-immune connection. *Int.J.Neurosci.*, 59(1-3):1–23, July 1991.
- [346] J.V. Weinstock, A. Blum, J. Walder, and R. Walder. Eosinophils from granulomas in murine schistosomiasis mansoni produce substance p. *J.Immunol.*, 141(3):961–966, August 1988.
- [347] E. F. Wheelock. Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science*, 149:310–311, Jul 1965.
- [348] Joseph L Wiemels, John K Wiencke, Karl T Kelsey, Michelle Moghadassi, Terri Rice, Kevin Y Urayama, Rei Miike, and Margaret Wrensch. Allergy-related polymorphisms influence glioma status and serum ige levels. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16(6):1229–1235, Jun 2007.
- [349] Z. Wiesenfeld-Hallin, T. Hokfelt, J.M. Lundberg, W.G. Forssmann, M. Reinecke, F.A. Tschopp, and J.A. Fischer. Immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance p coexist in sensory neurons to the spinal cord and interact in spinal behavioral responses of the rat. *Neurosci.Lett.*, 52(1-2):199–204, November 1984.
- [350] I. Wilke, V. Arolt, M. Rothermundt, C. Weitzsch, M. Hornberg, and H. Kirchner. Investigations of cytokine production in whole blood cultures of paranoid and residual schizophrenic patients. *Eur.Arch.Psychiatry Clin.Neurosci.*, 246(5):279–284, 1996.
- [351] D.O. Willenborg, S. Fordham, C.C. Bernard, W.B. Cowden, and I.A. Ramshaw. Ifn-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *J.Immunol.*, 157(8):3223–3227, October 1996.

- [352] M. Wills-Karp. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol.Rev.*, 202:175–190, December 2004.
- [353] T.A. Wynn. Il-13 effector functions. *Annu.Rev.Immunol.*, 21:425–456, 2003.
- [354] C. Yanaihara, H. Sato, M. Hirohashi, M. Sakagami, and K. Yamamoto. Substance p radioimmunoassay using nalpa-tyrosyl-substance p and demonstration of the presence of substance p-like immunoreactivities in human blood and porcine tissue extracts. *Endocrinol.Jpn.*, 23(6):457–463, December 1976.
- [355] Myung-Soon Yang, Kyung-Ae Ji, Sae-Bom Jeon, Byung-Kwan Jin, Seung U Kim, Ilo Jou, and Eunhye Joe. Interleukin-13 enhances cyclooxygenase-2 expression in activated rat brain microglia: implications for death of activated microglia. *J Immunol*, 177(2):1323–1329, Jul 2006.
- [356] Myung-Soon Yang, Eun Jung Park, Seonghyang Sohn, Hyuk Jae Kwon, Won-Ho Shin, Han Kyung Pyo, Byungkwan Jin, Kyeong Sook Choi, Ilo Jou, and Eun-Hye Joe. Interleukin-13 and -4 induce death of activated microglia. *Glia*, 38(4):273–280, Jun 2002.
- [357] P. Yaqoob, E. A. Newsholme, and P. C. Calder. Comparison of cytokine production in cultures of whole human blood and purified mononuclear cells. *Cytokine*, 11(8):600–605, Aug 1999.
- [358] Z. Yesilova, M. Ozata, I. H. Kocar, M. Turan, A. Pekel, A. Sengul, and I. C. Ozdemir. The effects of gonadotropin treatment on the immunological features of male patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab*, 85(1):66–70, Jan 2000.
- [359] J. Yin, R.H. Albert, A.P. Tretiakova, and B.A. Jameson. 5-ht(1b) receptors play a prominent role in the proliferation of t-lymphocytes. *J.Neuroimmunol.*, 181(1-2):68–81, December 2006.
- [360] R. Yokote, H. Yagi, F. Furukawa, and M. Takigawa. Regulation of peripheral blood mononuclear cell responses to dermatophagoides farinae by substance p in patients with atopic dermatitis. *Arch.Dermatol.Res.*, 290(4):191–197, April 1998.
- [361] M.R. Young, J.L. Kut, M.P. Coogan, M.A. Wright, M.E. Young, and J. Matthews. Stimulation of splenic t-lymphocyte function by endogenous serotonin and by low-dose exogenous serotonin. *Immunology*, 80(3):395–400, November 1993.
- [362] J.S. Youngner and S.B. Salvin. Production and properties of migration inhibitory factor and interferon in the circulation of mice with delayed hypersensitivity. *J.Immunol.*, 111(6):1914–1922, December 1973.
- [363] Robert Y L Zee, Nancy R Cook, Suzanne Cheng, Rebecca Reynolds, Henry A Erlich, Klaus Lindpaintner, and Paul M Ridker. Polymorphism in the p-selectin and interleukin-4 genes as determinants of stroke: a population-based, prospective genetic analysis. *Hum Mol Genet*, 13(4):389–396, Feb 2004.
- [364] D. H. Zhang, L. Cohn, P. Ray, K. Bottomly, and A. Ray. Transcription factor gata-3 is differentially expressed in murine th1 and th2 cells and controls th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J Biol Chem*, 272(34):21597–21603, Aug 1997.
- [365] J.G. Zhang, D.J. Hilton, T.A. Willson, C. McFarlane, B.A. Roberts, R.L. Moritz, R.J. Simpson, W.S. Alexander, D. Metcalf, and N.A. Nicola. Identification, purification, and characterization of a soluble interleukin (il)-13-binding protein. evidence that it is distinct from the cloned il-13 receptor and il-4 receptor alpha-chains. *J.Biol.Chem.*, 272(14):9474–9480, April 1997.
- [366] W. Zheng and R. A. Flavell. The transcription factor gata-3 is necessary and sufficient for th2 cytokine gene expression in cd4 t cells. *Cell*, 89(4):587–596, May 1997.

- [367] Z.H. Zhou, P. Chaturvedi, Y.L. Han, S. Aras, Y.S. Li, P.E. Kolattukudy, D. Ping, J.M. Boss, and R.M. Ransohoff. Ifn-gamma induction of the human monocyte chemoattractant protein (hmc β)-1 gene in astrocytoma cells: functional interaction between an ifn-gamma-activated site and a gc-rich element. *J.Immunol.*, 160(8):3908–3916, April 1998.
- [368] N. Zimmermann, S. P. Hogan, A. Mishra, E. B. Brandt, T. R. Bodette, S. M. Pope, F. D. Finkelman, and M. E. Rothenberg. Murine eotaxin-2: a constitutive eosinophil chemokine induced by allergen challenge and il-4 overexpression. *J Immunol*, 165(10):5839–5846, Nov 2000.
- [369] G. Zurawski and J.E. de Vries. Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and b cells, but not on t cells. *Immunol. Today*, 15(1):19–26, January 1994.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

5-HT:	5-Hydroxytryptophan (Serotonin)
8-OH-DPAT:	8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin
a.d.:	Aqua destillata
ALP:	Alkalische Phosphatase
aqua bidest.:	aqua bidestillata
Arg:	Arginin
AS:	Aminosäure(n)
BSA:	Bovines Serumalbumin
cAMP:	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD:	Cluster of differentiation
cDNA:	Kodierende Desoxynukleinsäure (coding desoxynuclein acid)
CGRP:	Calcitonin-Gen-related Peptid
CPDA:	Citrate Phosphate Dextrose Adenin
CPD:	Citrate Phosphate Dextrose
DAG:	Diacylglycerol
DMF:	Dimethylformamid
DMSO:	Dimethylsulfoxid
dNTP:	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDRF:	Endothelium-derived relaxing Factor
ELISA:	Enzyme-linked immunosorbened assay
ELISpot:	Enzyme-linked immunospot
ERK:	Extracellular-signal Regulated Kinase
FCS:	Fetal calf serum
FKS:	Fetales Kälberserum
GABA:	Gammaaminobuttersäure
Gln:	Glutamin
Gly:	Glycin
HPA-Achse:	Hypothalamus-Pituitary-Adrenal-axis
IFN- γ :	Interferon-gamma
IgG:	Immunglobulin G
IL:	Interleukin
IP3:	Inositoltriphosphat
kD:	Kilo Dalton
Leu:	Leucin
LW:	Leerwert
Lys:	Lysin
MAF:	Macrophage activating factor
MALT:	Mucosa associated lymphatic tissue
Max.:	Maximum
MCP-1:	Monocyte chemotactic protein-1
Met:	Methionin
Min.:	Minimum
MHC:	Major Histocompatibility Complex
MNC:	Mononuclear Cells
mRNA:	Methylierte Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)

MW:	Mittelwert
NaCl:	Natriumchlorid, bzw. Stimulation mit nur Träger von SP bei ELISpot-Versuchen
NK-1,2,3,4:	Neurokininrezeptor 1-4
NK-Zellen:	Natürliche Killerzellen
NO:	Stickstoffmonoxid
P/S:	Penicillin-Streptomycin
PBMC:	Peripheral blood monocytes
PBL:	Peripheral blood lymphocytes
PBS:	Phosphatgepufferte Salz-Lösung (Phosphate buffered saline)
PHA:	Phytohämagglutinin bzw. Stimulation mit nur PHA bei ELISpotversuchen
Phe:	Phenylalanin
PPT-A:	Preprotachykinin-A
PPT-B:	Preprotachykinin-B
Pro:	Prolin
R:	Rezeptor
REM:	Rapid eye movement
RPMI:	Zellkulturmedium entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
ROS:	Reactive Oxygen Species
RT-PCR:	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
SD:	Standard deviation (Standardabweichung)
SER_4:	Stimulation mit nur Serotonin in Konzentration von 10^{-4} mol/l bei ELISpot-Versuchen
SER_5:	Stimulation mit nur Serotonin in Konzentration von 10^{-5} mol/l bei ELISpot-Versuchen
SER_NaCl:	Stimulation mit Serotonin in Konzentration von 10^{-5} mol/l und NaCl bei ELISpot-Versuchen
SER_SP:	Stimulation mit Serotonin in Konzentration von 10^{-5} mol/l und SP bei ELISpot-Versuchen
SFC:	spot forming cells
SNP:	Single Nucleotide Polymorphismus
SP:	Substanz P bzw. Stimulation mit nur SP bei ELISpot-Versuchen
SSRI:	Selektive Serotonin Rückaufnahmeinhibitoren
STAT4/6:	Signal Transducer and Activator of Transcription 4/6
Th1/2:	T-Helferzellen 1/2
TNF- α :	Tumornekrosefaktor alpha
VCAM-1:	vascular cell adhesion molecule-1
VIP:	Vasointestinales Peptid
ZNS:	Zentrales Nervensystem

7.2 Buffy coats:

500 ml CPD-Blut vom Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes, Goethestraße, München.

7.3 Probenaufbewahrung

7.3.1 Lagern der Zellen

Die Zellen lagerten im Schnitt 313,2 Tage im Stickstofftank (SD: 64,1 Tage; Min: 232; Max: 448).

7.4 ELISpot

7.4.1 Verwendete Lösungen und Medien

7.4.1.1 Aliquotieren von fetalem Kälberserum FKS wurde in 500-ml-Portionen bei -20 °C gelagert. Vor Gebrauch wurde FKS in einem Wasserbad für 30 min bei 56 °C inaktiviert und zu 50-ml-Portionen aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C bis zum Gebrauch.

7.4.1.2 Aliquotieren von PHA PHA wurde lyophilisiert in Portionen von 1,2 mg Protein/Flask geliefert und bei 4 °C gelagert. Zum Gebrauch wird das Proteinpulver mit gefiltertem, deionisiertem aqua bidest. auf 5 ml aufgefüllt und die Protein-Lösung über 30-60 min auf dem Vortex verschüttelt. PHA wird mit einer Konzentration von 240 µg/ml (1,2 mg/5 ml) in Mikroschraubröhrchen aliquotiert und gefroren bei -20 °C aufbewahrt.

7.4.1.3 Aliquotieren von Trypan-Blau-Lösung Steril gelieferte Trypan-Blau-Lösung wurde mit gefiltertem aqua bidest. im Verhältnis 1:5 verdünnt und steril in Mikro-Reagiergefäße aliquotiert. Die Lösungen wurden bis zur Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

7.4.1.4 Aliquotieren von Penicillin/Streptomycin Penicillin/Streptomycin wurde in Portionen von 50 ml gefroren geliefert und bei -20 °C gelagert. Es wurde in 5-ml-Portionen in 15-ml-Falcons aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

7.4.1.5 Lösung I Lösung I ist 500 ml reines RPMI-1640 Medium mit einem Zusatz von 5 ml Natriumpyruvat und 5 ml L-Glutamin.

7.4.1.6 Lösung II Lösung II entspricht Lösung I mit weiteren 50 ml FKS (10%). Die Hinzunahme von FKS dient der Verhinderung von Zellagglutination und unspezifischer Bindungen der sezernierten Antikörper.

7.4.1.7 Penicillin/Streptomycin -Medium Dieses Medium ist Lösung II mit einem Zusatz von 5 ml Penicillin/Streptomycin.

7.4.1.8 Gefriermedium Das Gefriermedium besteht aus Lösung II mit weiteren 50 ml FKS (insgesamt 20%) und 10% DMSO.

7.4.1.9 Essigsäure Lösung Für erste Lösungsversuche von Substanz P und zum Lösen von Sar-Met-Substanz P wurde eine essigsäure Lösung in einer Konzentration von 0,017 mol/l durch Verwendung von 50 ml aqua bidest. und 50 µl Essigsäure hergestellt und die Lösung bei 3 bar für 30 min autoklaviert.

Berechnung:

Spezifisches Gewicht von Essigsäure: 60,05 g/mol. 100%ige Essigsäure: 1,05 kg auf einen Liter. Dichte: $\delta = m/V = 1,05 \text{ kg/l}$. In 50 µl befinden sich demnach $1,05 \text{ kg/l} \times 50 \times 10^{-6} \text{ l} = 0,0000525 \text{ kg}$, bzw. 0,0525 g. Mol-Menge in diesem Volumen: $n = m/M = 0,0525 \text{ g}/60,05 \text{ g/mol} = 8,74 \times 10^{-4} \text{ g/mol}$. Konzentration: $c = n/V = 8,74 \times 10^{-4} \text{ g/mol}/50 \times 10^{-3} \text{ l} = 0,017 \text{ mol/l}$.

7.4.1.10 Verdünnungsreihe für Substanz P Die aliquotierten Substanzproben von Substanz P wurden in ihren Träger-Gläschen gelöst.

Berechnung:

Molekulargewicht von SP: 1347,6 g/mol. Benötigte Volumina: $V = n/c$ und $m = n \times M \Rightarrow V = m/M \times c$. Bei 200 µl Gesamtvolumen im Well wird Substanz P in einer achtfach höheren Konzentration eingestellt und als Ausgangskonzentration für die Verdünnungsreihe 10^{-5} mol/l verwendet. Somit berechnen sich die Volumina wie folgt: $V = m/1347,6 \times 8 \times 10^{-5}$ bzw. $V = m/0,107808$.

7.4.1.11 Verdünnungsreihe für Serotonin Aliquotiertes Serotonin wurde in RPMI-Medium gelöst.

Berechnung:

Molekulargewicht von Serotonin: 212,7 g/mol. Benötigte Volumina: $V = m/M \times c$. Ausgangskonzentration für die Verdünnungsreihe: 10^{-3} mol/l. Somit berechnen sich die Volumina wie folgt: $V = m/212,7 \times 8 \times 10^{-3}$ bzw. $V = m/1,7016$.

7.4.2 Verwendete Puffer

7.4.2.1 Karbonat-Puffer zum Beschichten mit 1. Antikörper Puffer I: 1,68 g NaHCO_3 + aqua bidest. ad 100 ml

Puffer II: 1,06 g Na_2CO_3 + aqua bidest. ad 50 ml

Puffer I wurde mit Puffer II auf pH = 9,6 titriert und bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Nach dem Autoklavieren veränderte sich der pH-Wert auf 9,81 (Min.: 9,69; Max.: 9,99; SD: 0,09). Bei 4 °C ist dieser Puffer drei bis vier Wochen haltbar. Vor jedem Gebrauch wurde der Puffer nochmals steril gefiltert und der pH-Wert einer Probe kontrolliert.

7.4.2.2 PBS zum Waschen und Verdünnen: 9,55 g Trockensubstanz von Dulbecco + aqua bidest. ad 1 l respektive 42,98 g + aqua bidest. ad 4,5 l. Der pH-Wert wurde mit NaCl oder HCl auf 7,40 eintitriert. Der Puffer wurde vor Verwendung für 20 min bei 121 °C autoklaviert und vor Gebrauch nochmals gefiltert.

Alternativ können 0,68 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ und 3,34 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ eingewogen werden und zusammen mit 73,05 g NaCl auf 2,5 l a.d. aufgefüllt werden.

7.4.2.3 May Grünwald-Verdünnungspuffer Es wurden 54,5 g Na_2HPO_4 und 40,0 g KH_2PO_4 abgewogen und mit 10 l aqua bidest. aufgefüllt. Der pH-Wert betrug 6,8.

7.4.2.4 Giemsa-Verdünnungspuffer Hierzu wurden 8,9 g Na_2HPO_4 und 10,5 g K_2HPO_4 mit 2 l aqua bidest. aufgefüllt. Der pH-Wert war 6,6.

7.4.3 Reagenzien

Die verwendeten Antikörper stammten alle von Mabtech AB, Gamla Vrmdv. 2, S-131 37 Nacka, SWEDEN.

7.4.3.1 Beschichtungsantikörper (1. Antikörper) Die Aufreinigung der Antikörper erfolgte durch *in vitro* Kulturen mittels G-Protein Affinitätschromatographie. Sie sind zur Detektion ihrer jeweiligen Zytokine aus Kulturflüssigkeiten in ELISA und ELISpot-Tests geeignet. Alle Antikörper wurden geöffnet bei 2 bis 8 °C aufbewahrt und geschlossen bei -20 °C.

Beschichtungsantikörper wurden in Konzentrationen von 1 mg/ml in PBS mit 0,02% Natrium Azid (NaN_3) geliefert und auf 7,5 μg /ml mit Karbonatpuffer aufgefüllt.

Verwendete Berechnung zur Beschichtung von einer Platte:

Für eine 96-Well-Platte werden $96 \times 100 \mu\text{l}$ Lösung benötigt. Es wurde eine Sicherheit von zusätzlich 0,4 ml Lösung eingerechnet. Es wurden insgesamt 10 ml Lösung hergestellt. Für eine Endkonzentration von 7,5 μg /ml werden 75 μg Antikörper mit einer Ausgangskonzentration von mg/ml benötigt. Diese sind in 75 μl gelöst. Zum Gesamtvolumen von 10 ml wurden 9,925 μl Beschichtungspuffer benötigt.

7.4.3.1.1 IFN- γ Monoklonal; immunogen gegen rekombinant humanes IFN- γ ; Code: 1-D1K, Isotyp Maus IgG1, Spezifität: natives und rekombinantes humanes IFN- γ . Batches: 3420-3-40 (2x), -41 und -38.

7.4.3.1.2 IL-4 Monoklonal; immunogen gegen rekombinant humanes IL-4; Code: IL4-I (clone 82-4[79]), Isotyp Maus IgG1, κ ; Spezifität: natives und rekombinantes humanes IL-4. Batches: 3410-3-17 (3x), -15.

7.4.3.1.3 IL-13 Monoklonal; immunogen gegen rekombinant humanes IL-13; Code: IL13-I, Isotyp Maus IgG1, κ , ; Spezifität: natives und rekombinantes humanes IL-13. Batches: 3470-3-1, -3 (2x) und -4.

7.4.3.2 Biotinylierte Detektionsantikörper (2. Antikörper) Detektionsantikörper wurden in Konzentrationen von 1 mg/ml in PBS mit 0,02% Natrium Azid (NaN_3) geliefert und auf 1,0 μg /ml (1:1000) verdünnt (z.B. 10 μl + PBS ad 10 ml). IL13-II, IL4-II und 7-B6-1 wurden durch Reaktion mit dem N-hydroxysuccinimide Ester von Biotin biotinyliert. Die Beschichtungs- und Detektionsklone erkennen verschiedene Epitope der Zytokine. Alle Antikörper wurden geschlossen bei -20 °C und geöffnet bei 2-8 °C aufbewahrt.

7.4.3.2.1 IFN- γ Monoklonal; immunogen gegen rekombinant humanes IFN- γ ; Code: 7-B6-1, Isotyp Maus IgG1; Spezifität: natives und rekombinantes humanes IFN. Batches: 3420-6-27, -28 und -17.

7.4.3.2.2 IL-4 Monoklonal; immunogen gegen rekombinant humanes IL-4; Code: IL4-II (clone 12-1[79]), Isotyp Maus IgG1, κ , ; Spezifität: natives und rekombinantes humanes IL-4, kreuzreaktiv mit nativen IL-4 von Rhesus- und Cynomolgus Makaken. Batches: 3410-6-10 (2 \times).

7.4.3.2.3 IL-13 Monoklonal; immunogen gegen rekombinant humanes IL-13; Code: IL13-II, Isotyp Maus IgG1, κ , ; Spezifität: natives und rekombinantes humanes IL-13, kreuzreaktiv mit nativen IL-13 von Rhesus- und Cynomolgus Makaken. Batches: 3470-6-1 und -2.

7.4.3.3 Reaktionsenzym Streptavidin Alkalin Phosphatase, gelöst in: 0,1 M Tris, 1 mM ZnCl_2 , 1% BSA, 0,1% NaN_3 , pH = 7,4; enthält 50 μg /ml Streptavidin (hochgereinigt (>99%; MW 55000 kD) von *Streptomyces avidinii*; hohe Aktivität: \sim 15-22 units/mg, (1 unit bindet 1,0 μg Biotin) und 150 μg /ml Enzym (hochgereinigt von Kälberdarm mit hoher Aktivität). Batches: 36775 und 37138; Code: 3310-8.

Die Enzym-Lösung wurde in einer Verdünnung von 1:1000 mit autoklaviertem und nochmals gefiltertem PBS nach den Angaben des Herstellers verdünnt. Das konjugierte Produkt ist speziell für Enzym-immunoassay Zwecke geeignet.

7.4.3.4 Farbreagenz (von BIO-RAD, Glattbrugg, Schweiz) AP Conjugate Substrate Kit: 25-fach AP-Color-Development-Buffer 40 ml (auf 1 Liter aqua bidest. verdünnen, Endkonzentration 0,1 M Tris, pH 9,5); AP-Color-Reagent A und B, je 10 ml AP-Farbreagenz A enthält Nitroblau Tetrazolium in wässrigem Dimethylformamid (DMF), enthält MgCl_2 . AP-Farbreagenz B enthält 5-bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphat in DMF. Die Farbreagenzien A und B wurden bei -20 °C gelagert, der Puffer bei 4 °C.

Vor Gebrauch wurde die benötigte Menge hergestellt.

Beispiel Verdünnungsschema: 12500 μl aqua bidest. + 500 μl Farbpuffer + je 125 μl Farbreagenz A/B. Die Lösung wurde sorgfältig auf einem Vortex verschüttelt.

7.4.4 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden bei 4 °C mit Kieselgel gelagert.

7.4.4.1 8-Hydroxy-DPAT (Tocris Cookson Ltd. Northpoint fourth Way Avonmouth Bristol UK) Als Hydrobromid ($\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{NO}\cdot\text{HBr}$) (10 mg) in destilliertem Wasser zu 5 mM löslich; MW: 328,29 g/mol; Batch: 6/26672. Die Gesamtmenge wird steril gefiltert und das verbleibende Volumen von 4,8 ml in 48 Portionen à 100 μl aliquotiert und bei 8 °C gelagert.

Benötigtes Volumen:

$$V = n/c = m/M \times c = 10 \times 10^{-3} \text{ g} / 328,29 \text{ g/mol} = 3,046 \times 10^{-5} \text{ mol} / 5 \times 10^{-3} \text{ mol/l} = 6,092 \text{ ml.}$$

7.4.4.2 Substanz P (Tocris Cookson Ltd. Northpoint fourth Way Avonmouth Bristol UK) Substanz P (5 mg): Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ (C₆₃H₉₈N₁₈O₁₃S); MW: 1347,60 g/mol; lyophilisierte Trockensubstanz wurde abgewogen und als Festsubstanz aliquotiert bei -20 °C aufbewahrt.

7.4.4.3 (S)-Way 100135 (Tocris Cookson Ltd. Northpoint fourth Way Avonmouth Bristol UK) Als Dihydrochlorid (C₂₄H₃₃N₃O₂·2HCl) (10 mg) in destilliertem Wasser zu 100 mM löslich; MW: 468,47 g/mol; Batch: 1/28743. Volumenberechnung siehe Punkt 7.4.4.1.

7.4.4.4 Sar-Met-Substanz P (Tocris Cookson Ltd. Northpoint fourth Way Avonmouth Bristol UK) [Sar₉,Met(O₂)₁₁]-Substanz P (1 mg): Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Sar-Leu-Met-(O₂)-NH₂ (C₆₄H₉₇N₁₉O₁₅S). MW: 1393,00 g/mol; lyophilisierte Trockensubstanz wurde abgewogen und als Festsubstanz aliquotiert bei -20 °C aufbewahrt. Batch: 9A/32346 (x2), 8/27107. Volumenberechnung siehe Punkt 7.4.4.1

7.4.4.5 Serotonin (Sigma-Aldrich) Serotonin (5-Hydroxytryptamin); MW: 212,7 g/mol; Lot 21 K 7095 und Lot 69 H 7025.

7.4.4.6 PHA (Biochrom) Phythämagglutinin (PHA-L) 1,2 mg Protein/Flask, lyophilisiert ad 5 ml aqua bidest.

Verwendete Berechnung für letzte Versuchsreihe:

Für vier Platten wurden 2 x 50 µl PHA in 1450 µl auf 37 °C vorgewärmtem P/S-Medium gelöst. Das entspricht für IFN-γ einer Konzentration von 1,0 µg/ml. Für die beiden Interleukine wurden 4 bis 5×150 µl PHA in je 1350 µl P/S-Medium gelöst, was einer Konzentration von 3,0 µg/ml entspricht.

7.4.4.7 Natrium Pyruvat (Biochrom) Natriumpyruvat wurde in Portinen von 100 mM aufbewahrt.

7.5 ELISA

7.5.1 SP-ELISA (Assay Designs Inc.)

Substance P Correlate-EIATMKit 96 Well; Catalog No. 90018; LOT No. 00Q022C; bei 4 °C aufbewahrt; mit: Goat anti-Rabbit IgG Microtiter Plate; Substance P EIA Conjugate, 5 ml, Lot No: 00Q016; bei -20 °C gelagert; Substance P EIA Antibody, 5 ml; Assay-Puffer, 30 ml; Waschpufferkonzentrat, 30 ml; Substance P Standard, 0,5 ml; p-Npp Substrate, 20 ml; Stop Solution, 5 ml.

Vorschrift:

Standardvorbereitung: Alle Reagenzien werden auf Raumtemperatur gebracht; 1 ml Assay-Puffer wird in ein Eppendorf-Reagiergefäß gefüllt, 750 µl in fünf weitere. Aus dem ersten werden 100 µl entnommen und 100 µl 100000 pg/ml SP Standard zugefügt. Die Lösung wird auf dem Vortex verschüttelt und 250 µl dieser Mischung in das nächste Eppi gefüllt. Dieser Vorgang wird 5 mal wiederholt. Waschpuffer: 10 ml Konzentrat werden mit 90 ml a.d. verdünnt.

Assayablauf: Die Plattenaufteilung erfolgt nach dem Assay-Layout-Sheet 1) 50 µl Assay Puffer werden in die NSB und Bo (0 pg/ml Standard) Wells gefüllt; 50 µl der Standards 1-6 werden in die entsprechenden Wells gefüllt. Je 50 µl der Proben werden in Duplikaten aufgetragen. Weitere 50 µl Assay Puffer kommen in die NSB-Wells, 50 µl SP Conjugate kommen in jedes Well bis auf die "TA" und "Blank" Wells. 50 µl SP Antibody kommen in jedes Well, bis auf die "TA", "Blank" und "NSB" Wells. 2) Platten werden bei Raumtemperatur für 2 h auf Plattenrüttler inkubiert. 3) Platten werden ausgeschüttelt und 3 mal mit Waschpuffer 200 µl/Well gewaschen. Platten werden sorgfältig ausgeklopft. 4) 5 µl SP Conjugate werden in die "TA" Wells pipettiert und anschließend 200 µl p-Npp Substrate in jedes Well hinzugefügt. 5) Platten werden bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert. 6) 50 µl Stop Solution werden in jedes Well gefüllt und die Platten ausgelesen. 7) Die Ergebnisse wurden entsprechend der beigefügten Anleitung ausgewertet und die Konzentrationen berechnet.

Sensitivität: 8.04 pg/ml; Linearität: Neigung der Kurve: 1,006, Korr. Koeffizient: r = 0,998; Intraassayvarianz: 4,5 - 6,%; Interassayvarianz: 4,2 - 7,3% (je nach SP-Konzentration (niedrig - hoch)).

7.5.2 Serotonin EIA (dsl: Diagnostic Systems Laboratories Deutschland GmbH)

Kit-Nr.: BA 10-0900; LOT: 0134; Lagerung bei 2-8 °C; mit: Standards A-G, je 4 ml; Serotonin beschichtete Mikrotiter-Streifen; Serotonin-Kontrollen 1 und 2, je 4 ml; Serotonin Antiserum, 5,25 ml; Enzymkonjugat,

11 ml; Substratlösung, 11 ml; Stopp-Lösung, 11 ml; Waschpufferkonzentrat, 50 ml; Acylierungsreagenz, 3 ml; Acylierungspuffer, 30 ml; Derivatisierungsplatte für Acylierung.

Vorschrift:

Vorbereitung: Alle Reagenzien und die Platte werden auf Raumtemperatur gebracht. Waschpuffer: 50 ml Konzentrat werden mit a.d. ad 500 ml verdünnt.

Assayablauf: A) Probenvorbereitung und Acylierung: 1) Je 10 μ l der Standards A - G, 10 μ l der Kontrollen 1 & 2, 10 μ l Probenmaterial werden in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert. 2) Je 250 μ l Acylierungspuffer kommen in alle Vertiefungen, je 25 μ l werden in alle Wells pipettiert. 3) Platten werden bei Raumtemperatur für 15 min. auf Plattenschüttler inkubiert. 4) Je 10 μ l der so vorbereiteten Proben werden in den nachfolgenden Serotonin-EIA eingesetzt.

B) 1) Je 10 μ l der acylierten Standards, acylierten Kontrollen und acylierten Proben werden in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettiert. 2) Je 50 μ l Antiserum werden in alle Wells gefüllt. 3) Inkubation bei RT für 60 min. 4) Vertiefungen werden 3 mal mit je 250 μ l Waschpuffer gewaschen. 5) Je 100 μ l Enzymkonjugat werden in die Wells pipettiert; 6) Inkubation für 30 min. bei RT; 7) Erneutes Waschen wie unter 4); 8) Je 100 μ l Substratlösung werden in die Vertiefungen gefüllt und für 20 - 30 min. bei RT unter Schütteln inkubiert. 9) Je 100 μ l Stopp-Lösungen werden zu den Proben gegeben. 10) Streifen werden bei 450 nm ausgewertet.

Sensitivität: 7.5 ng/ml.

7.6 Genotypisierungen

7.6.1 Probenverarbeitung

- Heraeus Septatech Omnifuge 2.0 RS
- Heraeus Septatech Biofuge fresco
- Vortex Genie 2 - Scientific Industries
- 96-V-Mikrotiterplatte; Art.Nr. 710880, BiozymDiagnostik GmbH
- DistriTip Mini Syringes für die DistrimonTM repetitive pipette, Eppendorf
- PCR Softstrips 0,2 ml, Biozym
- LightCycler Capillaries, Roche Diagnostics
- Formamide (deionisiert), International Biotechnologies, INC
- Ethanol pro analysi, Merck

7.6.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

- PTC Peltier ThermoCycler - Biozym
- PTC-200 ThermoCycler, MJ Research, Watertown, MA, USA
- Elektrophoreseapparat: Wide Mini Sub Zelle, Biorad
- Sequi-Gene Gelkammer, Biorad
- Gel-Dokumentationsgerät: Eagle Eye II, Stratagene
- Agarosegel 0,8-1,5% in TBE-Puffer
- 1%ige Ethidiumbromidlösung
- Lauffuffer: TBE
- Alle Chemikalien für IFN- γ und IL-13 (Enzym, Puffer, dNTPs, Formamid, Standard, Polymer, Software) von Applied Biosystems, Foster City, CA, USA.

7.6.3 Sequenzierung

- Light Cycler Version 3.5 - Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
- ABI PRISM 310 Genetic Analyser, Applied Biosystems
- ABI 310 Kapillarelektrophorese-Gerät (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- Computer-Programme: Genscan Analysis, Version 3.7 und Genotyper, Version 3.7
- GeneScan Polymer: Performance Optimized Polymer 4 (POP 4), Applied Biosystems
- GeneSCAN Polymer ohne TSR, Applied Biosystems
- GeneScan Capillaries, 47 cm \times 50 μ m, in Verbindung mit POP 4, Applied Biosystems
- 310 Genetic Analyzer Buffer + EDTA, Applied Biosystems
- SNaPshot Ready Reaction Mix, PE Biosystems
- SNaPshot Control Primers, PE Biosystems

- pGEM -3Zf(+)
- Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA
- Exonuclease I, USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA
- Primer von Tib Molbiol, Berlin, Deutschland
- AmpliTaq Gold
-

7.7 Verbrauchsmaterialien

- Kimberley-Clark: Kimtech Pflgetücher
- Kimberley-Clark: Kimwipes Lite 200
- Safeskin 2000 sterile chirurgische Latexhandschuhe (puderfrei)
- Safeskin Satin Plus puderfreie Latexuntersuchungshandschuhe
- Eppendorf Combitips plus 5 ml
- Eppendorf Standartips 1,25 ml für Plus/8 (Waschpipette)
- Eppendorf Biopur Combitips plus 5 ml (steril)
- Eppendorf Biopur Combitips plus 2,5 ml (steril)
- Schleicher & Schuell FP 30/0,2 CA-S Rotrand Filtereinheit
- Microlance 3 sterile Nadeln von Becton Dickinson
- Discardit II sterile Spritzen von Becton Dickinson in Größen 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml
- Thermo Shandon Cytofunnel disposable sample chambers (Zellzentrifugation)
- Shandon Cyto-Träger (Objekt-Träger)
- Sarstedt Reagier-Gefäße 1,5 ml (“Eppis”)
- Sarstedt Röhre 50 ml (“50-ml-Falcon”) (PP, rote Kappe)
- Sarstedt Röhre 15 ml (“15-ml-Falcon”) (PP, rote Kappe)
- Sarstedt Serologische Pipette 10 ml und 25 ml steril, pyrogenfrei
- Sarstedt Transferpipette 3,5 ml steril
- Sarstedt Mikroschraub-Röhre 0,5 ml PP (PHA-Aliquotierung)
- Sarstedt Pipettenspitzen 100 μ l (gelb) und 1000 μ l (blau)
- Sarstedt Cuvettes 10×10×48 mm Acryl (RNA Zählung für cDNA-Array)
- MBP Ultra Micro Pipet Tips 10 μ l (weiß)
- Nunc Cryo-Tube 1,8 ml (Zellen einfrieren)
- American national Can Parafilm M
- Wheaton 8-425 Black Plastic Cap open top without liner
- Alufolie
- Sample Vials, Disposable Sample Container, Beckman Coulter (Accuvetten)
- LÜDI-AG Aluminium-Schiffchen 0,12 ml 12×4×2,7 mm (Substanzen-Waage)
- Millipore MultiscreenTM-HA 96 Well MAHAS4510 sterile Platten 0,45 μ m Surfactant free
- Heißluft-Sterilisations-Klebeband
- Schleicher & Schuell Faltenfilter (Filtern von May-Grünwald-Lösung)
- PCR-Gefäße 8er Strips, Brand (Schutz der Alufolie beim Autoklavieren von Pinzetten)

7.8 Chemikalien

- Barrycidal 36 Desinfektionsmittel
- 70% Ethanol mit MEK vergällt (Apotheke Klinikum Innenstadt)
- Sigma - Dimethylsulfoxid (DMSO) (Lot: 51K000425)
- Sigma - Trypan Blue Solution (0,4%) (Lot: 12K2359) (hergestellt in 0,81% NaCl und 0,06% K₃PO₄)
- Biochrom - Biocoll Separating Solution (Ficoll Separating Solution)
- Isotonische Lösung, Dichte 1.077, bei Raumtemperatur gelagert

- Biochrom - Fetales Kälberserum, auf Mycoplasmen getestet (bei -20 °C gelagert)
- Biochrom - 100 U/ml Penicillin/ 100 µg/ml Streptomycin
- Biochrom RPMI 1640 Medium (1×) w 2,0 g/l NaHCO₃, w 0,532 g/l N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin (bei 4 °C gelagert)
- Braun - Isotone Kochsalz-Lösung 0,9% zur intravenösen Infusion
- PBS-Medium (von Apotheke Klinikum Innenstadt): 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na₂HPO₄·(H₂O)₂, 0,2 g KH₂PO₄ ad 1000,0 ml Wasser für Inj. filtriert und sterilisiert in 20 ml und 100 ml Portionen Salzsäure 5 mol/l (von Apotheke Klinikum Innenstadt)
- Merck, May-Grünwald (1.01424.0500)
- Merck, Giemsa (1.09204.0500)
- Isoton II Azide-Free Balanced Electrolyte Solution (Kat. Nr. 8448011), Beckman Coulter
- Coulter Clenz, Cleaning Agent (Kat.Nr. 8448222), Beckman Coulter
- Merck Essigsäure 100%
- Merck Natriumcarbonat Na₂CO₃, wasserfrei
- Merck Natriumhydrogencarbonat NaHCO₃
- Biochrom PBS DULBECCO Instamed 9,55 g/l w/o Ca²⁺, Mg²⁺
- Merck Kieselgel mit Feuchtigkeitsindikator (Blaugel)
- Isopropanol (Desinfizieren beim Substanzen abwiegen)

7.9 Geräte

7.9.1 Pipetten:

- Eppendorf-Pipette Reference 10-100 µl
- Eppendorf-Pipette Reference 100-1000 µl
- Titertek Plus 50-200 µl von ICN
- Eppendorf Multipette plus
- Eppendorf-Pipette Reference 0,5 - 10 µl
- Eppendorf Research Pro 8-Kanal, 50-1200 µl (Waschpipette)
- Seripettor, Labora Mannheim (Isoton-Abfüllung)

7.9.2 Gläser:

- Schott Duran Bechergläser (50 ml-3000 ml)
- Schott Duran Erlenmayerkolben (250 ml)
- Glasflaschen, gereinigt, Biochrom 100 ml und 500 ml
- Borosilikatglas Trichter (May-Grünwald filtern)
- Färbekästen Glas für Objektträger (Färbebeäder)
- Sprühflaschen zum Desinfizieren mit Ethanol
- Enghals-Spritzflasche zum Plattenwaschen
- Reagenzglas-Ständer für Zentrifugen-Röhrchen (50 ml, 15 ml) (Falcon-Ständer)
- Gestell für Zentrifugenröhrchen für 50 ml-Röhrchen blau PP
- Reaktionsgefäß-Ständer (Eppi-Ständer)
- Styro-Gestell (Einfrieren der Substanzen)
- Eppendorf Eurobox 1,25 ml für Eppendorf Standardtips
- Pipettenspitzen-Tip-Boxen (Firmen Eppendorf, Alpha, Greiner)
- Instrumenten-Kasten (Platteninkubation mit wassergetränktem Tuch bei Plattenentwicklung am Anfang - gleichmäßige Luftfeuchtigkeit als Versuchsbedingung)
- Waschwanne PE
- Chemikalienlöffel (Pufferherstellung)

- Mikrospatel (Substanzenabwiegen)
- Färbepinzetten (Substanzenabwiegen)
- Magnetrührstäbchen
- Cryoboxen
- Reagenz-Reservoir für Mehrkanalpipetten (Waschen der Platten)
- Alu-Sterilisationsboxen
- SHANDON Metallschlitten (für Cytospin Objektträger)

7.9.3 Zentrifugen:

- Heraeus Minifuge T
- Heraeus Sepatech Omnifuge 2.0 RS
- Hettich Rotixa /RP
- Hettich Rotina 35 R
- SHANDON Cytospin3

7.9.4 Wasserbäder:

- Köttermann-Wasserbad, Typ 3042
- Julabo SW-20C

7.9.5 Brutschränke:

- Heraeus CO₂-AUTO-ZERO Brutschrank
- Heraeus cytoperm 2 Brutschrank

7.9.6 Mikroskope:

- Labovert 090 122.012, Mikroskop von Leitz
- ZEISS Axioplan 2, ELISpot-Reader mit Epiplan-NEOFLUAR 5× Optik
- ZEISS Axioskop (Zellobjektträger der Cytospins auswerten)
- ZEISS Axioplan (Neubauerkammer auswerten)
- Power HAD Sony 3CCD Color Video Camera
- Sony CMA-D2 Camera Adapter

7.9.7 Waagen:

- Chygo Electronic Balance MP-3000 (Puffer-Waage)
- Sartorius M2P Elektronische Mikrowaage (Substanzen-Waage)

7.9.8 Weiteres:

- Accu-jet Pipettierhelfer von Brand
- Vortex-Genie-2 von Scientific Industries
- Uniflow UVUB 1200 Laminarflow von UNI-EQUIP
- Heraeus Instruments HERAsafe HSP 12 Sicherheitswerkbank (“Laminarflow”)
- MELAG Autoklav Typ 23
- H+P Labortechnik Varioklav Dampfsterilisator
- Heraeus VTR 5036 Heißluftsterilisator
- Ikamag RCT (0-1100 1/min) (Magnetrührer)
- WTW pH-Meter pH 523
- Eppendorf Thermostat 3401 (“Eppi-Heizer”)

- Coulter Particle Count and Size Analyzer Z2 (Version 1,02) (100 μm C, Kd = 59,29; upper size 17,00 μm , lower size 5.000 μm , count mode <between>)
- Heraeus HFU 86 (450) und 586 STDV 14 Heraeus Instruments (-80°C)
- Messer, Chronos Biosafe® (Stickstofftank)
- SIEMENS Kühlschränke
- BOSCH Kühlschränke
- Pharmacia GeneQuant RNA/DNA Calculator (RNA Bestimmung für cDNA-Array)
- Janke & Kunkel IKA-Labortechnik Ultra-Turrax T25 (Zellzerstörung für RNA-Extraktion)
- Brand Neubauer improved Zählkammer, Tiefe 0,100 mm superior Marienfeld Haemocytometer-Deckgläser 20×26×0,4 mm, optisch plan geschliffen
- Wallac 1296-001 DELFIA Plateshake (Plattenrüttler für ELISA)
- SLT Labinstruments Spectra III “Rainbow” (ELISA-Reader)
- Kurzzeitmesser (Stoppuhr)
- Millipore Milli-QPlus Reinstwasseranlage
- SCOTSMAN AF-10 EISANLAGE
- Micromass ZMD Massenspektrometer

7.10 Software

- SPSS 11 - 17
- ZEISS KS-ELISpot
- Genscan Analysis Version 3.7 and Genotyper Version 3.7
- MS-Excel
- MS-Word
- Reference-Manager
- LYX
- JabRef

7.11 Bildanhang

7.11.1 Beispielwells

Abb. 7.11.1.1 und 7.11.1.2 zeigen zwei Beispielwells zur Darstellung des Spot-Membran-Kontrasts in den Wells.

Abbildung 7.11.1.1: Beispiel-Well - Spot-Membran-Kontrast für IFN- γ

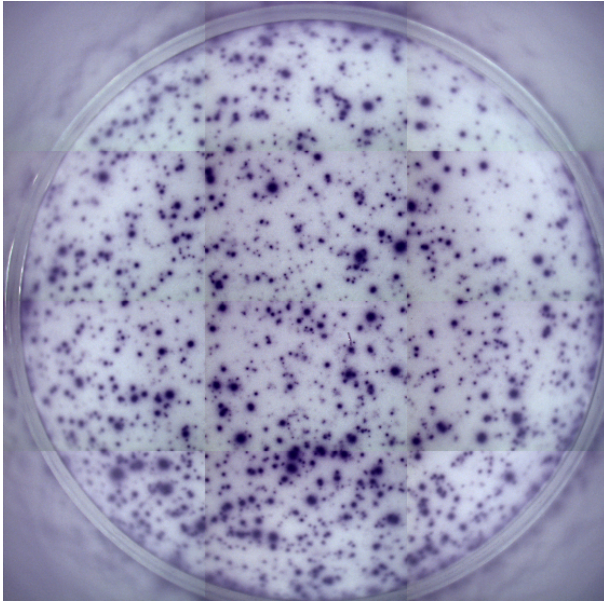


Abbildung 7.11.1.2: Beispiel-Well - Spot-Membran-Kontrast für IL-4

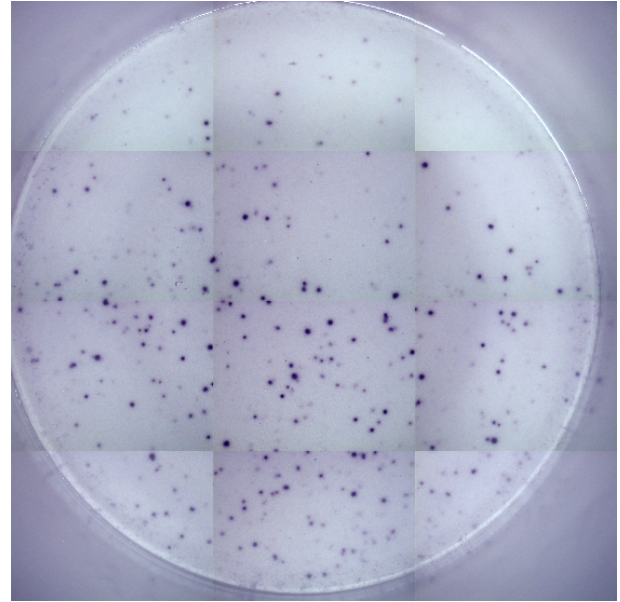


Abb. 7.11.1.3 und 7.11.1.4 zeigen den Einfluss des Gesamtvolumens in den Wells auf die Spot-Dichte.

Abbildung 7.11.1.3: Beispiel ELISpot IFN- γ

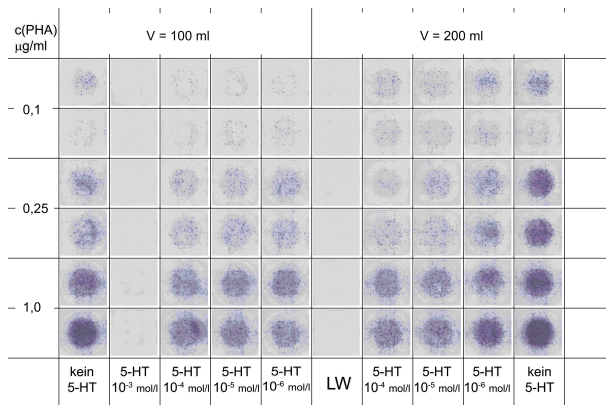
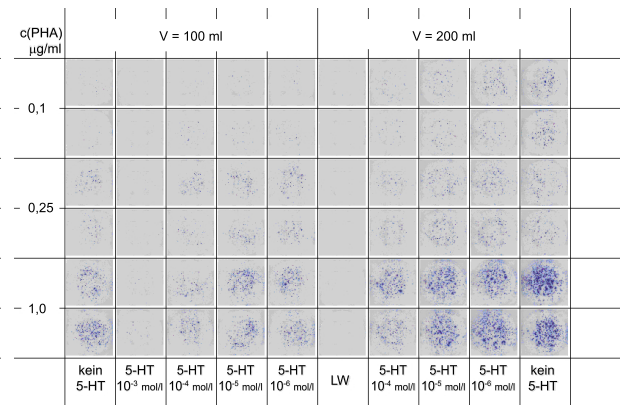


Abbildung 7.11.1.4: Beispiel ELISpot IL-4



Spot-Dichte bei verschiedenen Volumina, PHA- und Serotoninkonzentrationen, alle Stimulationen mit Serotonin auch mit SP ($c = 10^{-12}$ mol/l)

7.12 Tabellenanhang

7.12.1 Deskriptive Statistik Gesamtstichprobe

Tabelle 7.12.1.1: Soziodemographische und methodische Charakteristika (Gesamtstichprobe)

Variable	Kategorien	N	Prozent
Geschlecht	Männlich	38	52,1
	Weiblich	35	47,9
Familienstand	Nie verheiratet gewesen	50	68,5
	Geschieden	3	4,1
	Verheiratet	6	8,2
	Verheiratet mit Kind(ern)	4	5,5
	Geschieden mit Kind(ern)	2	2,7
	Geschieden, 2. Ehe	2	2,7
Schulabschluss	Hauptschule	8	11,0
	Realschule	13	17,8
	Gymnasium	44	60,3
	Fachoberschule	1	1,4
Berufsausbildung	Arbeiter ohne Ausbildung	2	2,7
	Student	18	24,7
	Lehre	28	38,4
	Meister	2	2,7
	FH Diplom	3	4,1
	Hochschulabschluss	10	13,7
Medikamenteneinnahme*	Ja	22	30,1
	Nein	51	69,9
Kontamination	Ja	9	10,1
	Nein	80	89,9
Antibiotika	Ja	49	55,1
	Nein	40	44,9
Zeitpunkt	Nur Zeitpunkt T1	11	15,1
	Beide Zeitpunkte	62	84,9

*Erfasste Medikamente: Allopurinol (N=1), ASS und Lipidsenker (N=1), Bisoprolol (N=1), Heloazid und Metheozym (N=1), Ibuprofen, Ca und Actonel (N=1), Kilogest und Thyroxin (N=1), Neuralgin (N=1), Vitaminpräparate (N=1), Ovulationshemmer (N=10) und Ovulationshemmer in Kombination mit ASS (N=1) oder Jodid (N=1).

Tabelle 7.12.1.2: Deskriptive Statistik stetiger Variablen

Variable	N	MW	Min.	Max.	SD	Referenzbereich
Alkoholkonsum ^a	66	1,50	0,00	7,50	1,78	
Nikotinkonsum ^b	65	8,71	0,00	40,00	9,63	
RRsys (mmHg)	52	123,65	100,00	150,00	8,65	
RRdias (mmHg)	52	76,94	65,00	90,00	5,51	
Puls (S/min)	52	66,23	48,00	80,00	7,06	
Größe (cm)	52	174,73	160,00	196,00	8,06	
Gewicht (kg)	52	70,52	50,00	95,00	11,59	
BMI (kg/m ²)	52	22,99	18,29	28,73	2,66	
Wortschatztest	66	34,82	23,00	42,00	3,47	
GOT (U/l)	62	9,79	6,00	26,00	2,97	10 – 35
GPT (U/l)	62	8,31	1,00	56,00	8,07	10 – 35
GGT (U/l)	62	12,48	3,00	42,00	6,90	< 39
Cholesterin (mg/dl)	63	196,60	125,00	290,00	36,92	< 20
Triglyzeride (mg/dl)	63	117,32	40,00	316,00	60,05	< 200
HDL (mg/dl)	62	59,18	36,00	109,00	14,18	> 65
LDL (mg/dl)	62	128,21	61,00	987,00	115,02	< 130

N: Fallzahl; MW: Mittelwert; Min.: Minimum; Max.: Maximum; SD: Standardabweichung; RRsys: systolischer Blutdruck; RRdias: diastolischer Blutdruck; BMI: Body-mass index ^a: Durchschnittlicher Konsum niedrig alkoholischer Getränke (Wein/Bier) in liter/Woche ^b: Nikotinkonsum in pack-years (20 Zig./Tag × Anzahl konsumierter Jahre); Blutfette wurden nüchtern gemessen

Tabelle 7.12.1.3: Zellkonzentrationen nach Coulter-Counter und Neubauerkammer für die Gesamtstichprobe

Variable (Einheit)	N	MW	Min.	Max.	SD	Wilcoxon Z und p-Werte
Leerwert ("Partikel")	40	41 558,56	6667,00	174 000,00	29 682,31	
T1 Zellzahl (C) Nr. 1 (10^6 /ml)	79	3,69	1,15	8,84	1,54	Z = -0,642;
T2 Zellzahl (C) Nr. 1 (10^6 /ml)	72	3,98	0,55	8,08	1,54	p = 0,521
T1 Zellzahl (C) Nr. 2 (10^6 /ml)	11	4,09	2,19	8,81	1,95	N zu klein
T2 Zellzahl (C) Nr. 2 (10^6 /ml)	7	4,63	2,51	6,30	1,43	
T1 Zellzahl (C) MW (10^6 /ml)	19	3,82	2,10	8,83	1,70	Z = -0,051;
T2 Zellzahl (C) MW (10^6 /ml)	16	3,93	0,55	8,08	1,89	p = 0,959
T1 Waschen ("Partikel")	73	63 643,75	13 333,00	236 660,00	42 954,73	Z = -0,277;
T2 Waschen ("Partikel")	60	60 366,43	14 667,00	240 660,00	40 327,44	p = 0,782
T1 Zellzahl gesamt (10^6 /ml)	79	16,92	3,68	44,12	7,85	Z = -0,663;
T2 Zellzahl gesamt (10^6 /ml)	72	18,41	1,65	35,57	7,30	p = 0,508
T1 Zellzahl/Kryo (10^6 /ml)	78	9,03	2,87	22,06	3,72	Z = -0,515;
T2 Zellzahl/Kryo (10^6 /ml)	72	9,71	0,82	20,20	3,63	p = 0,606
T1 Zellkonz. eingest. (10^6 /ml)	76	2,05	1,10	2,44	0,22	Z = -0,655;
T2 Zellkonz. eingest. (10^6 /ml)	70	2,10	1,94	2,36	0,09	p = 0,512
T1 Zellzahl (N)	79	122,49	45,00	300,00	51,34	Z = -0,645;
T2 Zellzahl (N)	73	135,95	8,00	269,00	52,23	p = 0,519
T1 Zellzahl (N) (10^6 /ml)	79	2,45	0,90	6,00	1,03	Z = -0,645;
T2 Zellzahl (N) (10^6 /ml)	73	2,72	0,16	5,38	1,04	p = 0,519
T1 Anzahl toter Zellen	79	10,04	1,00	37,00	7,85	Z = -0,195;
T2 Anzahl toter Zellen	71	9,61	2,00	32,00	6,54	p = 0,845
T1 tote Zellen (%)	79	7,47	1,04	30,77	5,09	Z = -0,604;
T2 tote Zellen (%)	71	6,43	1,64	18,12	3,51	p = 0,546
T1 Prozentsatz N/C (%)	79	67,05	27,12	106,06	15,71	Z = -1,111;
T2 Prozentsatz N/C (%)	72	70,14	29,14	134,29	17,10	p = 0,266
T1 Zellzahl (C) IFN- γ (10^6 /ml)	78	1,02	0,42	1,39	0,20	Z = -0,670;
T2 Zellzahl (C) IFN- γ (10^6 /ml)	69	1,05	0,46	1,46	0,16	p = 0,503
T1 (C) IFN- γ Sollwert (10^6 /ml)	78	1,03	0,55	1,22	0,11	Z = -0,655;
T2 (C) IFN- γ Sollwert (10^6 /ml)	70	1,05	0,97	1,18	0,04	p = 0,512
T1 Ist/Soll Prozent (IFN- γ) (%)	78	99,22	40,57	139,20	15,77	Z = -0,376;
T2 Ist/Soll Prozent (IFN- γ) (%)	69	100,09	45,90	140,10	13,81	p = 0,707

"Leerwert": Zählung im Coulter-Counter vor einer Zellzählung; (C): Zählung mittels Coulter-Counter; (N): Zählung mittels Neubauerkammer; "Waschen": Wert nach der ersten Zählung; "T1 Zellzahl gesamt": verfügbare Zellen, Wert = T1 Zellzahl (Coulter) MW \times Volumen in dem das Pellet gelöst wurde (meist 5 ml); "T1 Zellzahl/Kryo-Tube": Zellzahl pro Kryotube, Wert = T1 Zellzahl gesamt/2 (2 Kryotubes); "T1 Zellkonz. eingestellt": angestrebte Zellkonzentration, für Interleukine 2×10^6 /ml zuzüglich eines Ausgleichs für den prozentualen Anteil toter Zellen; "T1 Zellzahl (Neubauer)": hochgerechnete Zellzahl nach Angaben in Neubauerkammer; "T1 Prozentsatz Neubauer/Coulter": prozentualer Anteil der Zellzahl ermittelt aus der Neubauerkammer zu Zellzahl mit Coulter Counter gezählt; "T1 Zellzahl (Coulter) IFN- γ ": nach Verdünnung der Zellsuspension für IFN- γ gezählte Anzahl im Coulter Counter; "T1 (Coulter) IFN- γ Sollwert": theoretischer Sollwert, entspricht T1 Zellkonz. eingestellt/2; "T1 Ist/Soll Prozent (IFN- γ)": prozentuale Abweichung des gemessenen Wertes vom Soll-Wert; Werte zu T2 analog.

Tabelle 7.12.1.4: Inkubationszeiten während der ELISpot-Assays, Gesamtstichprobe

Variable	N	MW	Min.	Max.	SD
1. Ak Coatingzeit	39	19:32 Uhr	15:00 Uhr	23:00 Uhr	1.34 Std.
Platten aus 4 °C ^a	32	16:48 Uhr	13:30 Uhr	20:45 Uhr	1.25 Std.
1. Ak Inkubationszeit	32	21.11 Std.	17.50 Std.	24.55 Std.	1.51 Std.
Zellen ungezählt bei 37 °C ^b	28	14:16 Uhr	11:25 Uhr	16:40 Uhr	1.11 Std.
Gezählte Zellen bei 37 °C	41	15:00 Uhr	09:30 Uhr	18:00 Uhr	1.58 Std.
Zellen aus 37 °C	31	18:09 Uhr	13:50 Uhr	22:00 Uhr	1.23 Std.
Inkubationszeit native Zellen	29	02.31 Std.	00.00 Std.	03.30 Std.	0.49 Std.
IFN-Platte bei 37 °C	42	17:37 Uhr	12:30 Uhr	22:25 Uhr	3.23 Std.
IL-Platten bei 37 °C	27	18:53 Uhr	17:30 Uhr	20:15 Uhr	0.51 Std.
IL13_2_Platte bei 37 °C	10	18:44 Uhr	17:40 Uhr	20:25 Uhr	0.58 Std.
Platten aus 37 °C	40	12:12 Uhr	08:35 Uhr	22:00 Uhr	3.36 Std.
IL_13_2_Platte aus 37 °C	10	20:34 Uhr	18:50 Uhr	23:30 Uhr	1.33 Std.
IFN-Platte Inkubationszeit	38	14.10 Std.	12.30 Std.	20.45 Std.	4.48 Std.
IL-Platten Inkubationszeit	28	15.32 Std.	14.35 Std.	18.13 Std.	0.41 Std.
IL13_2-Platte Inkubationszeit	10	25.50 Std.	24.50 Std.	27.40 Std.	0.56 Std.
Platten bei 4 °C	44	12:52 Uhr	00:45 Uhr	22:25 Uhr	0.51 Std.
IL_13_2 Platte bei 4 °C	10	20:54 Uhr	19:10 Uhr	23:45 Uhr	0.30 Std.
Platten aus 4 °C	29	10:41 Uhr	08:20 Uhr	15:30 Uhr	1.58 Std.
Inkubationszeit 2. Ak	29	23.11 Std.	20.30 Std.	28.30 Std.	1.56 Std.
IL_13_2 Inkubationszeit 2. Ak	10	13.05 Std.	11.40 Std.	14.20 Std.	0.51 Std.
Streptavidin/ALP bei RT ^c	42	11:42 Uhr	08:20 Uhr	18:50 Uhr	2.31 Std.
Streptavidin/ALP Ende	42	13:49 Uhr	10:35 Uhr	21:00 Uhr	2.32 Std.
Streptavidin/ALP Inkubationszeit	42	02.07 Std.	01.40 Std.	02.40 Std.	0.16 Std.
Start Farbreaktion bei RT	42	14:08 Uhr	10:50 Uhr	21:15 Uhr	2.30 Std.
Ende Farbreaktion	36	16:16 Uhr	12:45 Uhr	23:20 Uhr	2.33 Std.
Farbe Inkubationszeit	36	02.03 Std.	01.30 Std.	02.35 Std.	0.14 Std.

N (gesamt) = 46 ELISpot-Gesamtdurchgänge; MW: Mittelwert; Min.: Minimum; Max.: Maximum; SD: Standardabweichung; 1. Ak: Beschichtungsantikörper; 2. Ak: Detektionsantikörper; IL_13_2: IL-13 Platte mit 25 h Inkubationszeit; ^a: Inkubation im Kühlraum bei 4 °C; ^b: Inkubation im Brutschrank bei 37 °C; ^c: Inkubation bei Raumtemperatur.

7.12.2 Deskriptive Statistik endgültige Stichprobe

Tabelle 7.12.2.1: Zellkonzentrationen nach Coulter-Counter und Neubauerkammer für die Endstichprobe

Variable (Einheit)	N	MW	Min.	Max.	SD	Wilcoxon Z und p-Werte
Leerwert ("Partikel")	18	42 889,17	14 667,00	84 333,00	19 777,55	
T1 Zellzahl (C) (10^6 /ml)	42	3,81	1,23	8,11	1,44	Z = -0.611;
T2 Zellzahl (C) (10^6 /ml)	37	4,13	1,94	7,11	1,26	p = 0.541
T1 Waschen ("Partikel")	40	65 741,58	13 333,00	236 660,00	45 259,54	Z = -0.103;
T2 Waschen ("Partikel")	31	58 311,45	14 667,00	146 000,00	33 037,54	p = 0.918
T1 Zellzahl gesamt (10^6 /ml)	42	18,29	3,68	40,55	7,59	Z = -0.611;
T2 Zellzahl gesamt (10^6 /ml)	37	20,64	9,72	35,57	6,28	p = 0.541
T1 Zellzahl/Kryo (10^6 /ml)	42	9,32	3,68	20,28	3,53	Z = -0.611;
T2 Zellzahl/Kryo (10^6 /ml)	37	10,32	4,86	17,78	3,14	p = 0.541
T1 Zellkonz. eingest. (10^6 /ml)	42	2,07	1,20	2,44	0,23	Z = -0.326;
T2 Zellkonz. eingest. (10^6 /ml)	37	2,13	1,94	2,36	0,08	p = 0.744
T1 Zellzahl (N) (absolut)	42	128,83	45,00	245,00	50,68	Z = -0.256;
T2 Zellzahl (N) (absolut)	37	138,86	65,00	233,00	42,45	p = 0.798
T1 Zellzahl (N) (10^6 /ml)	42	2,58	0,90	4,90	1,01	Z = -0.256;
T2 Zellzahl (N) (10^6 /ml)	37	2,78	1,30	4,66	0,85	p = 0.798
T1 Anzahl toter Zellen	42	10,95	1,00	37,00	8,51	Z = -0.402;
T2 Anzahl toter Zellen	37	10,73	2,00	32,00	6,97	p = 0.688
T1 tote Zellen (%)	42	7,65	1,04	21,92	4,84	Z = -0.913;
T2 tote Zellen (%)	37	7,14	2,65	18,12	3,77	p = 0.361
T1 Prozentsatz N/C (%)	42	68,11	41,68	97,06	14,18	Z = -0.339;
T2 Prozentsatz N/C (%)	37	68,99	34,79	106,74	16,16	p = 0.734
T1 Zellzahl (C) IFN- γ (10^6 /ml)	42	1,02	0,42	1,33	0,22	Z = -1.230;
T2 Zellzahl (C) IFN- γ (10^6 /ml)	37	1,09	0,81	1,46	0,14	p = 0.219
T1 (C) IFN- γ Sollwert (10^6 /ml)	42	1,04	0,60	1,22	0,12	Z = -0.326;
T2 (C) IFN- γ Sollwert (10^6 /ml)	37	1,07	0,97	1,18	0,04	p = 0.744
T1 Ist/Soll Prozent (IFN- γ) (%)	42	98,04	66,95	124,86	15,41	Z = -1.109;
T2 Ist/Soll Prozent (IFN- γ) (%)	37	102,47	79,19	140,10	12,79	p = 0.267

"Leerwert": Zählung im Coulter-Counter vor einer Zellzählung; (C): Zählung mittels Coulter-Counter; (N): Zählung mittels Neubauerkammer; "Waschen": Wert nach der ersten Zählung; "T1 Zellzahl gesamt": verfügbare Zellen, Wert = T1 Zellzahl (Coulter) MW \times Volumen in dem das Pellet gelöst wurde (meist 5 ml); "T1 Zellzahl/Kryo-Tube": Zellzahl pro Kryotube, Wert = T1 Zellzahl gesamt/2 (2 Kryotubes); "T1_Zellkonz. eingestellt": angestrebte Zellkonzentration, für Interleukine 2×10^6 /ml zusätzlich eines Ausgleichs für den prozentualen Anteil toter Zellen; "T1 Zellzahl (Neubauer)": hochgerechnete Zellzahl nach Angaben in Neubauerkammer; "T1 Prozentsatz Neubauer/Coulter": prozentualer Anteil der Zellzahl ermittelt aus der Neubauerkammer zu Zellzahl mit Coulter Counter gezählt; "T1 Zellzahl (Coulter) IFN- γ ": nach Verdünnung der Zellsuspension für IFN- γ gezählte Anzahl im Coulter Counter; "T1 (Coulter) IFN- γ Sollwert": theoretischer Sollwert, entspricht T1 Zellkonz. eingestellt/2; "T1 Ist/Soll Prozent (IFN- γ)": prozentuale Abweichung des gemessenen Wertes vom Soll-Wert; Werte zu T2 analog.

Tabelle 7.12.2.2: Inkubationszeiten während der ELISpot-Assays, Endstichprobe

Variable	N	MW	Min.	Max.	SD
1. Ak Coatingzeit	18	19:45 Uhr	17:40 Uhr	23:00 Uhr	01.14 Std.
Platten aus 4 °C ^a	18	16:53 Uhr	15:40 Uhr	18:40 Uhr	00.56 Std.
1. Ak Inkubationszeit	18	21.08 Std.	18.30 Std.	24.50 Std.	01.39 Std.
Zellen ungezählt bei 37 °C ^b	18	14:15 Uhr	12:25 Uhr	16:40 Uhr	01.10 Std.
Gezählte Zellen bei 37 °C	18	15:14 Uhr	13:40 Uhr	17:15 Uhr	01.00 Std.
Zellen aus 37 °C	18	17:59 Uhr	16:45 Uhr	19:30 Uhr	00.50 Std.
Inkubationszeit native Zellen	18	02.45 Std.	01.50 Std.	03.30 Std.	00.30 Std.
IFN-Platte bei 37 °C	18	18:16 Uhr	17:00 Uhr	19:30 Uhr	00.48 Std.
IL-Platten bei 37 °C	18	18:48 Uhr	17:30 Uhr	20:15 Uhr	00.51 Std.
IL13_2_Platte bei 37 °C	10	18:44 Uhr	17:40 Uhr	20:25 Uhr	00.58 Std.
Platten aus 37 °C	18	10:28 Uhr	08:35 Uhr	11:45 Uhr	00.55 Std.
IL_13_2_Platte aus 37 °C	10	20:34 Uhr	18:50 Uhr	23:30 Uhr	01.33 Std.
IFN-Platte Inkubationszeit	18	16.11 Std.	15.05 Std.	18.35 Std.	00.46 Std.
IL-Platten Inkubationszeit	18	15.39 Std.	14.35 Std.	18.13 Std.	00.48 Std.
IL13_2-Platte Inkubationszeit	10	25.50 Std.	24.50 Std.	27.40 Std.	00.56 Std.
Platten bei 4 °C	18	11.26 Uhr	09.30 Uhr	13.05 Uhr	00.59 Std.
IL_13_2 Platte bei 4 °C	10	20:54 Uhr	19:10 Uhr	23:45 Uhr	01.:30 Std.
Platten aus 4 °C	18	10:17 Uhr	08:20 Uhr	15:30 Uhr	01.52 Std.
Inkubationszeit 2. Ak	18	22.51 Std.	20.30 Std.	24.30 Std.	02.00 Std.
IL_13_2 Inkubationszeit 2. Ak	10	13.05 Std.	11.40 Std.	14.20 Std.	00.51 Std.
Streptavidin/ALP bei RT ^c	18	10:39 Uhr	08:40 Uhr	15:45 Uhr	01.51 Std.
Streptavidin/ALP Ende	18	12:41 Uhr	10:50 Uhr	17:50 Uhr	01.53 Std.
Streptavidin/ALP Inkubationszeit	18	02.02 Std.	01.40 Std.	02.30 Std.	00.12 Std.
Start Farbreaktion bei RT	18	13:03 Uhr	11:10 Uhr	18:05 Uhr	01.52 Std.
Ende Farbreaktion	17	15:09 Uhr	12:55 Uhr	20:10 Uhr	01.54 Std.
Farbe Inkubationszeit	17	02.03 Std.	01.30 Std.	02.35 Std.	00.18 Std.

N (gesamt) = 46 ELISpot-Gesamtdurchgänge; MW: Mittelwert; Min.: Minimum; Max.: Maximum; SD: Standardabweichung; 1. Ak: Beschichtungsantikörper; 2. Ak: Detektionsantikörper; IL_13_2: IL-13 Platte mit 25 h Inkubationszeit; ^a: Inkubation im Kühlraum bei 4 °C; ^b: Inkubation im Brutschrank bei 37 °C; ^c: Inkubation bei Raumtemperatur

8 Danksagung

Zuerst möchte ich Gott für die Kraft danken, die er mir immer wieder zugeführt hat, um meine Dissertation zu einem guten Ende zu führen. Meinen innigsten Dank möchte ich meiner Frau Anina widmen, die durch ihre Treue und ihren unerschütterlichen Glauben an mich zu einem Großteil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Meinem Doktorvater Prof. M. Ackenheil, der leider mittlerweile verstorben ist, möchte ich aus ganzem Herzen danken und ihm meine guten Gedanken zur Erinnerung schicken. Mein herzlichster Dank gilt Markus Schwarz, der meine Arbeit anfangs betreut hat und schließlich die Doktorvaterschaft übernommen hat. Durch sein sonniges Gemüt, seine immerwährende Hilfsbereitschaft und seine aufmunternden Worte konnte er mich immer wieder anspornen auch während der Zeit meiner klinischen Arbeit am Ball zu bleiben, nicht aufzugeben und die Arbeit zu beenden. Meinem Großvater Prof. E. Fischer, der mich durch seinen weit reichenden Blick auf das Forschungsgebiet der Psychoneuroimmunologie aufmerksam gemacht hat, möchte ich ebenfalls danken. Mein Dank gilt auch Katharina Busl und Sonig Chiang, mit denen ich zusammen das Blut der Probanden gesammelt hatte. Sylvia de Jonge, Stephanie Behrens, Karin Neumaier und Beate Kauschak möchte ich für Ihre Hilfe bei methodischen Problemen danken. Dipl.-Stat. M. Obermeier möchte ich für seine immer geduldigen und stets konstruktiven Ratschläge bei statistischen Fragestellungen danken und PD Dr. rer-nat P. Zill für seine Hilfe bei den Genotypisierungen. Sabine Fink gilt mein Dank für die mikroskopischen Auswertungen der Zytospinpräparate. Frau Prof. B. Bondy, PD Dr. M. Riedel und Prof. N. Müller möchte ich für ihre steten erinnernden Worte an meine Doktorarbeit danken und die Ratschläge, mich nicht in Details zu verlieren. Und nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mich während der gesamten Zeit immer unterstützt haben.

9 Lebenslauf

1. Angaben zur Person

Name	Musil
Vornamen	Richard Leopold
Anschrift geschäftlich	Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der LMU München Nussbaumstraße 7 80336 München
Geburtsdatum	07.08.1977

2. Berufliche Laufbahn

Seit Jan. 2008:	Stationsarzt der Tagklinik der Psychiatrischen Klinik der LMU
März 2005 - Dez.2007:	Assistenzarzt in der Psychiatrischen Klinik: Institutsambulanz
Juni 2004 - Sept. 2004 und Okt. 2004 - Feb. 2005	AiP und Assistenzarzt in der Psychiatrischen Klinik: Schizophrenie-Spezialstation

3. PJ

Dez. - Feb. 2004:	Chirurgie Tertial: Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, München
Okt./Nov. 2003:	Neurologie Tertial II: Neurologische Klinik des RdI, München
Aug./Sep. 2003:	Neurologie Tertial I: McMaster University, Hamilton, Canada
April - Juli 2003:	Innere Tertial: Weill-Cornell Medical School, New York, USA

4. Hochschullaufbahn

07.05.2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: Note: 1,66
12.03.2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
20.09.2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09.09.1999	Ärztliche Vorprüfung
Nov 1997 - Mai 2004:	Studium der Humanmedizin an der TU München

5. Zivildienst

Nov. 1996 / Okt. 1997:	Pflege atembehinderter Kinder in der Stiftung Pfennigparade
------------------------	---

6. Schullaufbahn

Juli 1996 / Dez. 2003:	Stipendiat der Begabtenförderung des Bayerischen Staates
Juni 1996:	Allgemeine Hochschulreife: Note: 1,0
Sep. 1988 / Juni 1996:	Klenze-Gymnasium, Wackersbergerstr. 59, München; Wechsel von der 8. in die 9. Klasse zum Halbjahr 1991/92
Sep. 1984 / Juli 1988:	Grundschule an der Boshetsriederstr. 35 in Sendling, München

Literaturverzeichnis

Originalartikel

Riedel M, Muller N, Strassnig M, Spellmann I, Engel RR, Musil R, Dehning S, Douhet A, Schwarz MJ, Moller HJ. *Quetiapine has equivalent efficacy and superior tolerability to risperidone in the treatment of schizophrenia with predominantly negative symptoms.* Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci. 2005 Dec;255(6):432-7.

Riedel M, Muller N, Spellmann I, Engel RR, Musil R, Valdevit R, Dehning S, Douhet A, Cerovecki A, Strassnig M, Moller HJ. *Efficacy of olanzapine versus quetiapine on cognitive dysfunctions inpatients with an acute episode of schizophrenia.* Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci. 2007 Oct;257(7):402-12.

Musil R, Spellmann I, Riedel M, Dehning S, Douhet A, Maino K, Zill P, Müller N, Möller HJ, Bondy B *SNAP-25 gene polymorphisms and weight gain in schizophrenic patients* J Psychiatr Res. 2008 Oct;42(12):963-70. Epub 2008 Jan 8.

Spellmann I, Muller N, Musil R, Zill P, Douhet A, Dehning S, Cerovecki A, Bondy B, Möller HJ, Riedel M *Associations of SNAP-25 polymorphisms with cognitive dysfunctions in Caucasian patients with schizophrenia during a brief trial of treatment with atypical antipsychotics.* Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci. 2008 Sep;258(6):335-44. Epub 2008 Mar 17.

Dehning S, Müller N, Matz J, Bender A, Kerle I, Benninghoff J, Musil R, Spellmann I, Bondy B, Möller HJ, Riedel M, Zill P. *A genetic variant of HTR2C may play a role in the manifestation of Tourette syndrome.* Psychiatr Genet. 2010 Feb;20(1):35-8.

Seemüller F, Riedel M, Obermeier M, Bauer M, Adli M, Kronmüller K, Holsboer F, Brieger P, Laux G, Bender W, Heuser I, Zeiler J, Gaebel W, Dichgans E, Bottländer R, Musil R & Möller HJ *Outcomes of 1014 naturalistically treated inpatients with major depressive episode.* Eur Neuropsychopharmacol. 2010 May;20(5):346-55. Epub 2010 Jan 22.

Riedel, M, Spellmann, I, Schennach-Wolff, R, Musil, R., Dehning, S, Cerovecki, A, Opgen-Rhein, M, Matz, J, Seemüller, F, Obermeier, M, Severus, E, Engel, RR, Müller, N & Möller, HJ *Effect of aripiprazole on cognition in the treatment of patients with schizophrenia.* Pharmacopsychiatry. 2010 Mar;43(2):50-7. Epub 2009 Dec 10.

Riedel, M.; Schennach-Wolff, R.; Musil, R.; Dehning, S.; Cerovecki, A.; Opgen-Rhein, M.; Matz, J.; Seemüller, F.; Obermeier, M.; Engel, R. R.; Müller, N.; Möller, H.-J. & Spellmann, I. *Neurocognition and its influencing factors in the treatment of schizophrenia-effects of aripiprazole, olanzapine, quetiapine and risperidone.* Hum Psychopharmacol. 2010 Mar;25(2):116-25.

Müller N, Krause D, Dehning S, Musil R, Schennach-Wolff R, Obermeier M, Möller HJ, Klauss V, Schwarz MJ, Riedel M. *Celecoxib treatment in an early stage of schizophrenia: Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of celecoxib augmentation of amisulpride treatment.* Schizophr Res. 2010 May 28. [Epub ahead of print]

Spellmann I, Rujescu D, Musil R, Mayr A, Giegling I, Genius J, Zill P, Dehning S, Opgen-Rhein M, Cerovecki A, Hartmann AM, Schäfer M, Bondy B, Müller N, Möller HJ, Riedel M. *Homer-1 polymorphisms are associated with psychopathology and response to treatment in schizophrenic patients* J Psychiatr Res. 2010 Jul 1. [Epub ahead of print]

Riedel M, Spellmann I, Schennach-Wolff R, Obermeier M, Musil R. *The RSM-scale: a pilot study on a new specific scale for self- and observer-rated quality of life in patients with schizophrenia* Qual Life Res. 2010 Oct 5. [Epub ahead of print]

Zitierfähige Abstracts

- R. Musil, M Schwarz, M Riedel, S Dehning, A Douhet, I Spellmann, N Müller *Immune parameters in patients with depression versus healthy controls during an open-label, placebo-controlled, randomized trial of reboxetine and celecoxib* Pharmacopsychiatry 2005; 38 DOI: 10.1055/s-2005-918792
- I. Spellmann; M. Riedel; R. Musil; A. Douhet; S. Dehning; P. Zill; N. Müller; H.J. Möller; B. Bondy *Influences of polymorphisms of beta adrenergic receptors in the psychopharmacological treatment of schizophrenia* European Neuropsychopharmacology; 16 Suppl. 4 September 2006 S. 378 - 379
- P. Zill, M. Riedel, I. Spellmann, R. Musil, A. Douhet, S. Dehning, N. Müller, H.-J. Möller, B. Bondy *Metabolic disturbances under psychopharmacological therapy: role of pharmacogenetics* Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci (2006) 256 [Suppl 2] S. 16
- O. Pogarell, K. Tatsch, C. Mulert, G. Leicht, R. Musil, W. Koch, M. Riedel, H.-J. Möller, U. Hegerl *Central monoaminergic function as assessed by neurophysiological and functional neuroimaging techniques* Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci (2006) 256 [Suppl 2] S. 24
- I. Spellmann, R. Musil, S. Dehning, P. Zill, N. Müller, H.-J. Möller, B. Bondy, M. Riedel *Influences of the Ghrelin Leu72Met polymorphism on weight gain and obesity in schizophrenic patients with antipsychotic treatment* Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci (2006) 256 [Suppl 2] S. 36-37
- R. Musil, I. Spellmann, M. Riedel, B. Bondy, A. Douhet, S. Dehning, N. Müller, P. Zill *Polymorphisms in the metabotropic Glutamate-Receptor 5 are possibly associated with response to treatment in schizophrenic patients* Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci (2006) 256 [Suppl 2] S. 41
- R. Musil, P. Zill, M. J. Schwarz *Effects of substance P and serotonin on the cytokine production of peripheral blood lymphocytes* Experimental Dermatology (2007), 16, 347–383
- R. Musil, M. Riedel, I. Spellmann, M. Opgen-Rhein, M. J. Schwarz *Changes in prolactin levels as predictor of response to treatment with Aripiprazole* Brain, Behavior, and Immunity (2009), 23, S2-S17

Übersichtsartikel

- M. Riedel, R. Schennach-Wolff, R. Musil, F. Seemüller, I. Spellmann *Atypische Antipsychotika – Wie fällt der Wirksamkeitsvergleich aus?* DNP (2008) DGPPN-Sonderheft S. 12 – 18
- M. Riedel, R. Musil, I. Spellmann, F. Seemüller, H.-J. Möller *Quetiapine XR – A New Retard Formulation in the Treatment of Schizophrenia* European Psychiatric Review (2008) 1 (2) S. 70 – 75
- Riedel, M.; Musil, R.; Seemüller, F.; Spellmann, I.; Moeller, H.-J. & Schennach-Wolff, R. *Safety evaluation of zotepine for the treatment of schizophrenia.* Expert Opin Drug Saf. 2010 Jul;9(4):659-66.

Buchbeiträge

- Bondy, B., Spellmann, I., Musil, R., Zill, P., Müller, N., Möller, H.-J., Riedel, M.: *Die Bedeutung der Pharmakogenetik für die antipsychotische Therapie* in "Schizophrenie - Zukunftsperspektiven in Klinik und Forschung"; Hrsg. Möller, Müller (2010) SpringerWienNewYork
- Schwarz, M. J., Musil, R., Spellmann, I., Opgen-Rhein, M., Jurgeleit, F., Sirch, S., Sterz, S., Zach, J., Riedel, M.: *Therapeutisches Drug-Monitoring neuerer atypischer Antipsychotika* in "Schizophrenie - Zukunftsperspektiven in Klinik und Forschung"; Hrsg. Möller, Müller (2010) SpringerWienNewYork

10 Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

2.2.15.1	Versuchsvariationen	25
2.4.2.1	Deskriptive Statistik Zellzahl/Kryotube	27
2.4.5.1	Klassifikation des Zellaspekts unter der Neubauerzählkammer	29
2.7.0.1	KS-ELISpot Parameter	31
2.8.2.1	Versuchsbedingungen	33
3.2.1.1	Klassifikation der Zellsuspension unter der Neubauerzählkammer stratifiziert nach Abnahmezeitpunkt vor Beginn der Versuchsreihen (Gesamtstichprobe)	37
3.2.1.2	Zellaspektklassifikation am Ende der Versuchsreihen, stratifiziert nach Zytokinen für Gesamtstichprobe	37
3.2.1.3	Zytospin-Kategorisierungen	38
3.3.1.1	Fallzahlen der Zwischensubjektfaktoren der allgemeinen linearen Modelle	39
3.3.1.2	Deskriptive Statistik für den Leerwert, stratifiziert nach Zytokinen	39
3.3.1.3	Levene-Test auf Gleichheit der Fehlervarianzen für Leerwert	40
3.3.1.4	Tests der Zwischensubjekteffekte für IFN- γ (Leerwerte)	41
3.3.1.5	Tests der Zwischensubjekteffekte für IL-4 (Leerwerte)	41
3.3.1.6	Tests der Zwischensubjekteffekte für IL-13 (Leerwerte)	42
3.3.1.7	Levene-Test auf Gleichheit der Fehlervarianzen für Grundstimulation mit PHA	42
3.3.1.8	Deskriptive Statistik für Stimulation mit PHA	43
3.3.1.9	Tests der Zwischensubjekteffekte für IFN- γ (PHA)	43
3.3.1.10	Tests der Zwischensubjekteffekte für IL-4 (PHA)	44
3.3.1.11	Tests der Zwischensubjekteffekte für IL-13 (PHA)	44
3.3.2.1	Statistik des Gesamtmodells und der Einflussfaktoren Alter, Geschlecht und Medikation	45
3.3.2.2	Weitere methodische Einflussfaktoren	45
3.3.4.1	Korrelationen zwischen Zeitpunkten T1 und T2	49
3.4.1.1	Soziodemographische und methodische Charakteristika (Endstichprobe)	51
3.4.1.2	Klassifikation der Zellsuspension unter der Neubauerzählkammer stratifiziert nach Abnahmezeitpunkt vor Beginn der Versuchsreihen (endgültige Stichprobe)	52
3.4.1.3	Zellaspektklassifikation am Ende der Versuchsreihen, stratifiziert nach Zytokinen für Endstichprobe	52
3.4.1.4	Zellzahl am Ende der ELISpot Assays	53
3.4.1.5	Versuchsvariationen Endstichprobe	53
3.4.2.1	Erwartete Ergebnisse der Hypothesenprüfung	55
3.4.3.1	Deskriptive Statistik für IFN- γ , Spotanzahl und Flächenwerte	55
3.4.3.2	Ergebnisse für IFN- γ , Spotanzahl und Flächenwerte	56
3.4.4.1	Deskriptive Statistik für IL-4, Spotanzahl und Flächenwerte	58
3.4.4.2	Ergebnisse für IL-4, Spotanzahl und Flächenwerte	59
3.4.5.1	Deskriptive Statistik für IL-13, Spotanzahl und Flächenwerte	61
3.4.5.2	Ergebnisse für IL-13, Spotanzahl und Flächenwerte	62
3.4.5.3	Deskriptive Statistik IL-13, 25 h Inkubationszeit, Spotanzahl und Flächenwerte	62
3.4.5.4	Ergebnisse IL-13, 25 h Inkubationszeit	64
3.5.1.1	IFN- γ : Deskriptive Statistik und Mann-Whitney-U-Tests	66
3.5.1.2	IL-4: Deskriptive Statistik und Mann-Whitney-U-Tests	67
3.5.1.3	IL-13: Deskriptive Statistik und Mann-Whitney-U-Tests	68
3.5.1.4	Zusammenfassung Geschlechtsunterschiede für neu gebildete Variablen	69

3.5.1.5	Zusammenfassung Altersunterschiede für neu gebildete Variablen	70
3.5.1.6	Korrelation zwischen Alter und Zytokinproduktion	71
3.5.2.1	Allelfrequenzen für CA-Repeat (rs3138557) der endgültigen Stichprobe	72
3.5.2.2	Haplotypenverteilung für CA-Repeat (rs3138557)	73
3.5.2.3	Deskriptive Statistik für IFN- γ , stratifiziert nach Genotypen	73
3.5.2.4	Genotypen und Allelfrequenzen für IL-4 C589T in verschiedenen Populationen	74
3.5.2.5	Genotypen und Allelfrequenzen für IL-13 Q130R in verschiedenen Populationen . . .	75
3.5.2.6	Deskriptive Statistik für IL-13, stratifiziert nach Genotypen	76
3.5.3.1	Zwischensubjektfaktoren des allgemeinen linearen Modells	77
3.5.3.2	Deskriptive Statistik des allgemeinen linearen Modells für IL-4	77
3.5.3.3	Tests der Zwischensubjekteffekte für IL-4; Interaktionen	78
3.6.0.4	Deskriptive Statistik für das Th2/Th1-Verhältnis der Spot-Produktion	79
3.6.0.5	Deskriptive Statistik für das Th2/Th1-Verhältnis der Flächenwerte	79
3.6.0.6	Wilcoxon-Tests für Th2/Th1-Verhältnis	80
7.12.1.1	Soziodemographische und methodische Charakteristika (Gesamtstichprobe)	139
7.12.1.2	Deskriptive Statistik stetiger Variablen	140
7.12.1.3	Zellkonzentrationen nach Coulter-Counter und Neubauerkammer für die Gesamtstich- probe	141
7.12.1.4	Inkubationszeiten während der ELISpot-Assays, Gesamtstichprobe	142
7.12.2.1	Zellkonzentrationen nach Coulter-Counter und Neubauerkammer für die Endstichprobe	143
7.12.2.2	Inkubationszeiten während der ELISpot-Assays, Endstichprobe	144

11 Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

1.5.2.1	ELISpot - Schematische Darstellung	18
2.2.1.1	Plattenaufteilung "Standard IIa"	21
2.6.0.1	Flussdiagramm des ELISpot-Ablaufs	32
3.3.1.1	IFN- γ : Histogramm über alle Wells	40
3.3.1.2	IFN- γ : Histogramm nur für Mittelwerte	40
3.3.1.3	IFN- γ : Histogramm über alle Wells ohne Antibiotika	41
3.3.1.4	IFN- γ : Histogramm nur für Mittelwerte ohne Antibiotika	41
3.3.2.1	Zellaspekt Neubauerammer für IFN- γ , Bedingung "LW"	46
3.3.2.2	Zellaspekt Neubauerammer für IFN- γ , Bedingung "SER_NaCl"	46
3.3.2.3	Zellaspekt Neubauerammer für IL-4, Bedingung "LW"	46
3.3.2.4	Zellaspekt Neubauerammer für IL-4, Bedingung "SER_NaCl"	46
3.3.2.5	Zellaspekt Neubauerammer für IL-13, Bedingung "LW"	47
3.3.2.6	Zellaspekt Neubauerammer für IL-13, Bedingung "SER_NaCl"	47
3.3.3.1	Beispiel-Platte mit Randeffekten	47
3.3.3.2	Geschätztes Randmittel für IFN- γ , Bedingung "PHA"	48
3.3.3.3	Geschätztes Randmittel für IFN- γ , Bedingung "SER_NaCl"	48
3.3.3.4	Geschätztes Randmittel für IL-4, Bedingung "PHA"	48
3.3.3.5	Geschätztes Randmittel für IL-13, Bedingung "PHA"	48
3.3.4.1	Korrelation zwischen Zeitpunkt T1 und T2 für IFN- γ , Bedingung "PHA"	50
3.3.4.2	Korrelation zwischen Zeitpunkt T1 und T2 für IL-4, Bedingung "PHA"	50
3.3.4.3	Korrelation zwischen Zeitpunkt T1 und T2 für IL-13, Bedingung "PHA" und 15 h Inkubationszeit	50
3.3.4.4	Korrelation zwischen Zeitpunkt T1 und T2 für IL-13, Bedingung "PHA" und 25 h Inkubationszeit	50
3.4.2.1	P-P-Diagramm für IFN- γ	54
3.4.2.2	P-P-Diagramm für IL-4	54
3.4.2.3	P-P-Diagramm für IL-13 bei 15 h Inkubationszeit	54
3.4.2.4	P-P-Diagramm für IL-13 bei 25 h Inkubationszeit	54
3.4.3.1	Liniendiagramm für IFN- γ	57
3.4.3.2	Mittelwertverlauf für IFN- γ , Spotanzahl	58
3.4.3.3	Mittelwertverlauf für IFN- γ , Flächenwerte	58
3.4.4.1	Liniendiagramm für IL-4	60
3.4.4.2	Mittelwertverlauf für IL-4, Spotanzahl	60
3.4.4.3	Mittelwertverlauf für IL-4, Flächenwerte	60
3.4.5.1	Liniendiagramm für IL-13	63
3.4.5.2	Mittelwertverlauf für IL-13, Spotanzahl	63
3.4.5.3	Mittelwertverlauf für IL-13, Flächenwerte	63
3.4.5.4	Liniendiagramm für IL-13, 25 h Inkubationszeit	65
3.4.5.5	Mittelwertverlauf für IL-13, Spotanzahl, 25 h Inkubationszeit	65
3.4.5.6	Mittelwertverlauf für IL-13, Flächenwerte, 25 h Inkubationszeit	65
3.5.0.7	Beispiel-Platte für interindividuelle Unterschiede (IFN- γ)	66
3.5.1.1	Geschlechtsdifferenzen für IL-4, Spotanzahl	67
3.5.1.2	Geschlechtsdifferenzen für IL-4, Spotanzahl, Mittelwertverlauf	67
3.5.1.3	Geschlechtsdifferenzen für IL-13, Flächenwerte	68

3.5.1.4	Geschlechtsdifferenzen für IL-13, Flächenwerte, Mittelwertverlauf	68
3.5.1.5	Beispiel-Platte für Altersunterschiede (IL-4)	69
3.5.1.6	Altersdifferenzen für IFN- γ , Spotanzahl	70
3.5.1.7	Altersdifferenzen für IL-4, Spotanzahl	70
3.5.1.8	Altersdifferenzen für IL-13, Spotanzahl	71
3.5.1.9	Altersdifferenzen für IL-4, Flächenwerte	71
3.5.1.10	Korrelation von Alter und Spotanzahl für IL-13, 15 h Inkubationszeit	71
3.5.1.11	Korrelation von Alter und Spotanzahl für IL-13, 25 h Inkubationszeit	71
3.5.2.1	Genetische Unterschiede für IFN- γ , Spotanzahl, CA-repeats des 2. Allels	73
3.5.2.2	Genetische Unterschiede für IFN- γ , Spotanzahl, häufige Haplotypen	73
3.5.2.3	Genetische Unterschiede für IL-4, C589T Polymorphismus, Spotanzahl	75
3.5.2.4	Genetische Unterschiede für IL-4, C589T Polymorphismus, Flächenwerte	75
3.5.2.5	Genetische Unterschiede für IL-13, A4257G Polymorphismus, Spotanzahl	76
3.5.2.6	Genetische Unterschiede für IL-13, A4257G Polymorphismus, Flächenwerte	76
3.5.3.1	Geschätztes Randmittel für IL-4, Altersgruppe < 30 Jahre	78
3.5.3.2	Geschätztes Randmittel für IL-4, Altersgruppe > 29 Jahre	78
3.6.0.3	IL-4/IFN- γ -Verhältnisse bei vier verschiedenen Bedingungen, Spot-Werte	81
3.6.0.4	IL-13/IL-4-Verhältnisse bei vier verschiedenen Bedingungen, Spot-Werte	81
3.6.0.5	IL-13/IFN- γ -Verhältnisse bei vier verschiedenen Bedingungen, Spot-Werte	81
3.6.0.6	IL-13/IFN- γ -Verhältnisse bei vier verschiedenen Bedingungen, Flächenwerte	81
7.11.1.1	Beispiel-Well - Spot-Membran-Kontrast für IFN- γ	138
7.11.1.2	Beispiel-Well - Spot-Membran-Kontrast für IL-4	138
7.11.1.3	Beispiel ELISpot IFN- γ	138
7.11.1.4	Beispiel ELISpot IL-4	138