

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Phänotyp mukosaler und peripherer Lymphozyten von  
Allergikern und funktionelle Immunmodulation durch  
apathogene *Escherichia coli* Nissle 1917

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Claudia Rasche  
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Worm

2. Prof. Dr. med. E. Hamelmann

3. Priv.-Doz. Dr. M. Wagenmann

Datum der Promotion: 21.04.2008

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	DEFINITION DER TYP ALLERGIE.....	1
1.2	ASPEKTE DER IGE-VERMITTELTEN ALLERGIE – DIE ALLERGISCHE RHINITIS ..	1
1.3	DAS TH1/TH2 MODELL.....	3
1.4	CHARAKTERISIERUNG WICHTIGER AKTIVIERUNGSMARKER, KOSTIMULATORISCHER MOLEKÜLE UND ANDERER OBERFLÄCHEN-MOLEKÜLE DER ALLERGISCHEN IMMUNANTWORT .....	5
1.5	THERAPEUTISCHE ANSÄTZE UND DIE HYGIENE HYPOTHES .....	8
1.6	PROBIOTISCHE BAKTERIEN – ESCHERICHIA COLI STAMM NISSLE 1917 .....	9
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG .....</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>15</b>
3.1	MATERIALIEN .....	15
3.1.1	Ansätze .....	15
3.2	METHODEN.....	16
3.2.1	Patienten.....	16
3.2.2	Serum-IgE.....	16
3.2.3	PBMC-Aufreinigung .....	17
3.2.4	WST-Assay und Dosis-Zeit-Kinetiken.....	17
3.2.5	Stimulation der PBMCs.....	18
3.2.6	Gewinnung von Lymphozyten aus der Nasenschleimhaut.....	18
3.2.7	Stimulation der gewonnenen Zellen aus der Nasenschleimhaut.....	19
3.2.8	Durchflusszytometrie .....	19
3.2.9	Immunhistochemische Färbung der Nasenschleimhaut.....	20
3.3	STATISTIK .....	21
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>23</b>
4.1	IGE-BESTIMMUNG.....	23
4.2	PRICKTESTUNG .....	23
4.3	PHÄNOTYP DER LYMPHOZYTÄREN ZELLEN IN BLUT UND NASENSCHLEIMHAUT .....	24
4.3.1	T-Lymphozyten .....	24

## Inhaltsverzeichnis

---

4.3.2	B-Lymphozyten.....	27
4.4	EINFLUSS VON APATHOGENEN E. COLI NISSLE 1917 AUF DIE PERIPHEREN LYMPHOZYTÄREN ZELLEN.....	30
4.4.1	Auswertung des WST-Assays und der Dosis-Zeit-Kinetiken .....	30
4.4.2	Oberflächenfärbung peripherer T-Lymphozyten.....	31
4.4.3	Intrazelluläre Färbung peripherer T-Lymphozyten .....	35
4.4.4	Oberflächenfärbung peripherer B-Lymphozyten .....	40
4.5	EINFLUSS DER STIMULATION AUF DIE FUNKTION DER LYMPHOZYTÄREN ZELLEN AUS DER NASENSCHLEIMHAUT.....	44
4.5.1	Stimulation mukosaler T-Lymphozyten .....	44
4.5.2	Stimulation mukosaler B-Lymphozyten .....	45
4.6	DARSTELLUNG UND LOKALISATION DER LYMPHOZYTEN IN DER NASENSCHLEIMHAUT .....	48
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>49</b>
5.1	CHARAKTERISIERUNG MUKOSALER UND PERIPHERER LYMPHOZYTEN – MUKOSALE LOKALINFLAMMATION IM SINNE EINER ENTOPIE?.....	49
5.2	METHODIK DER ZELLGEWINNUNG AUS DER NASENSCHLEIMHAUT – VERGLEICH MIT ANDEREN VERFAHREN.....	52
5.3	EINFLUSS VON E. COLI NISSLE 1917 AUF DIE TH1/TH2 – BALANCE .....	53
5.4	MODULATION DES „ALLERGISCHEN“ PHÄNOTYPS DURCH E. COLI NISSLE 1917 .....	56
5.5	AUSBLICK - BEDEUTUNG VON E. COLI NISSLE 1917 ALS ANTIALLERGIKUM... ..	60
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>MATERIALVERZEICHNIS .....</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>71</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>73</b>
<b>10</b>	<b>ERKLÄRUNG AN EIDES STATT .....</b>	<b>83</b>
<b>11</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>85</b>
<b>12</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>87</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Definition der Typ-I-Allergie

Im Jahre 1906 begründete der Wiener Kinderarzt Clemens Freiherr von Pirquet die Lehre von den schon seit dem Altertum beschriebenen Unverträglichkeitsreaktionen, den Allergien [1]. Dieser neu eingeführte medizinische Fachbegriff "Allergie" charakterisiert durch die griechischen Wörter "allos" für anders und "ergon" für Werk die überschießende Immunreaktion auf unspezifische, harmlose Substanzen. Erst 1968 entdeckten das japanische Ärzte-Ehepaar Kimishige und Teruko Ishizaka und der schwedische Mediziner S.G.O. Johansson unabhängig voneinander, dass Antikörper der Immunglobulinklasse E (IgE) in Verbindung mit dem jeweiligen Allergen verantwortlich für die Vermittlung dieser Reaktion vom Soforttyp sind [2].

Auslösend für die allergische Sofortreaktion wirkt die allergeninduzierte Quervernetzung FcεRI gebundener IgE-Antikörper auf Mastzellen oder basophilen Granulozyten [3]. Neuere Nomenklaturen unterscheiden die IgE-vermittelten von den nicht-IgE-vermittelten allergischen Reaktionen [4].

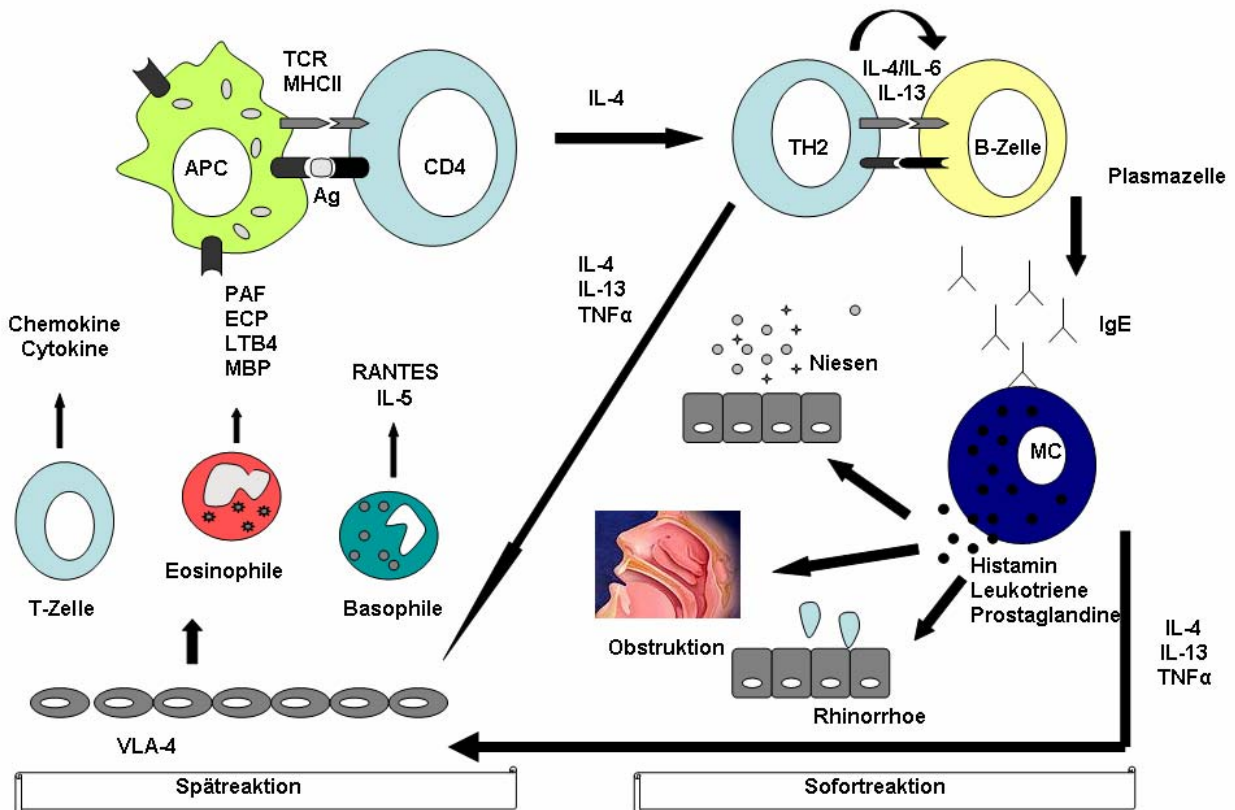
## 1.2 Aspekte der IgE-vermittelten Allergie – die allergische Rhinitis

Seit dem 15. Jahrhundert beschäftigten sich Ärzte intensiv mit der bereits damals häufig vorkommenden allergischen Rhinitis. Heutzutage stellt die allergische Rhinitis eine weltweit verbreitete Erkrankung mit einer Prävalenz von 10 - 20 % in der Bevölkerung dar [5]. Hiervon sind ca. 20 – 30 % mit Asthma vergesellschaftet [6]. Klinisch finden sich die typischen Symptome Pruritus, Niesen, nasale Obstruktion und Rhinorrhoe [7]. Die Abgrenzung der allergischen Rhinitis als häufigste Form der chronischen Rhinitis von nicht-allergischen Formen, wie z.B. rezidivierender viraler, endokriner, durch Noxen, Neoplasien oder anatomisch bedingter Rhinitis, ist für die Therapie von großer Bedeutung [8].

Initial kommt es bei der allergischen Rhinitis zu einer Sensibilisierung gegenüber bestimmten Aeroallergenen, die sich zusammen mit inhalieren wasserlöslichen Gasen und anderen Partikeln über den Mukus auf der Nasenschleimhaut ablagern können und so in das Schleimhautgewebe diffundieren [8]. In den lokalen Lymphknoten und den Tonsillen kommt es zur Präsentation von prozessiertem Allergen über MHC II –

## Einleitung

Rezeptoren Antigen-Präsentierender Zellen (APZs) am T-Zell-Rezeptor CD4-positiver T-Lymphozyten (T-Helferzellen, TH), die zu TH2-Lymphozyten differenzieren. Das spezifische Zytokinmuster dieser TH2-Immunantwort (IL-4, IL-13) sowie die T-B-Zellinteraktion über CD40 und CD40-Ligand bewirken die Induktion des Immunglobulin-Klassenwechsels zur IgE-Produktion mit der Generation von Plasmazellen [7].



modifiziert nach Pawankar R, 2002

**Abbildung 1 Pathogenese der allergischen Rhinitis [9]**

Bei erneutem Allergenkontakt führt die Bindung des Allergens über spezifisches IgE zu einer Degranulation der Mastzellen (MC) mit Freisetzung von Mediatoren. Histamin, Tryptase sowie neu gebildete Leukotriene (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>) und Prostaglandine (PGD<sub>2</sub>) führen zu einer vermehrten Permeabilität des Gefäßendothels mit Gewebsödem und Erhöhung des venösen Blutpools in den Sinusoiden. Es kommt zur nasalen Obstruktion sowie zu einer vermehrten Mukussekrektion aus den Drüsenzellen, die sich klinisch in Form von wässrigem Fließschnupfen manifestiert [8]. Histamin

bewirkt über eine Bindung an H1-Rezeptoren nozizeptiver Nervenendigungen (Typ-C) zusätzlich die Entstehung von Juckreiz und Niesen [7].

Aktivierte endotheliale Zellen und freigesetzte Zytokine verursachen die Einwanderung von eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie von Neutrophilen und Mastzellen in oberflächliche Schichten der Lamina propria, die 4 – 8 Stunden verzögert zu einer Spätreaktion führen können. Hierbei treten ähnliche Symptome wie bei der Sofortreaktion auf, die nasale Obstruktion ist jedoch das führende Symptom [8].

Neben der lokalen allergischen Immunantwort können bei einer IgE-vermittelten Allergie auch systemische Reaktionen bis hin zu einem anaphylaktischen Schock auftreten [4].

### 1.3 Das TH1/TH2 Modell

Für die Ausprägung einer Immunreaktion bei Typ-I-Allergien und auch bei Infektionen spielen die T-Lymphozyten eine bedeutende Rolle. Entscheidend ist hierbei die Ausprägung der so genannten TH1- bzw. der TH2-dominierten Immunantwort. Die Polarisierungsrichtung ist abhängig von der Art und der Menge des präsentierten Antigens sowie vom Zelltypus der präsentierenden Zelle selbst [10].

Die T-Zell-Subpopulationen unterscheiden sich durch ein charakteristisches Zytokinmuster: TH1-Zellen produzieren vornehmlich Interferon-gamma ( $\text{IFN-}\gamma$ ), Interleukin-2 (IL-2) und Tumor Necrosis Factor alpha ( $\text{TNF-}\alpha$ ), wohingegen TH2-Zellen bevorzugt IL-4, IL-5 und IL-13 sezernieren [5], [11]. Das Überwiegen der TH2-vermittelten Immunantwort führt zum Vorliegen einer Sensibilisierung, zum Auftreten anderer IgE-vermittelter Erkrankungen und einigen Autoimmunkrankheiten, die TH1-dominierte Immunantwort spielt eine bedeutende Rolle für die Abwehr von beispielsweise Mikroorganismen [11, 12].

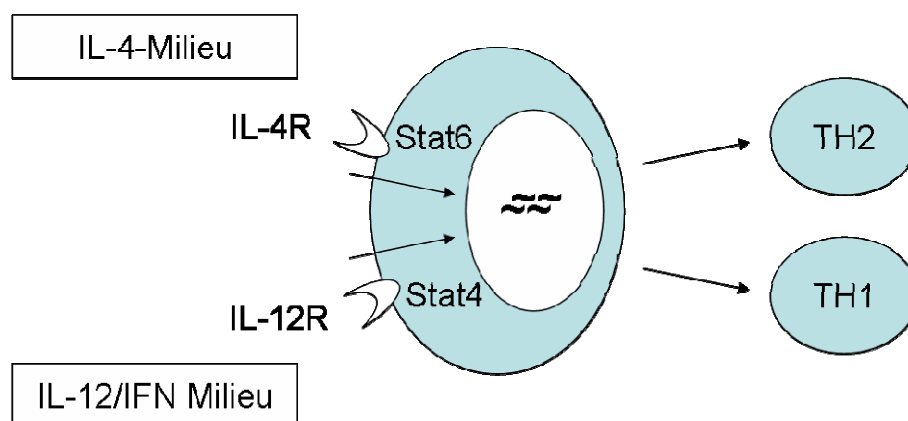
Charakteristisch für beide T-Zell-Populationen ist die Produktion von bestimmten Zytokinen, die die Differenzierung der eigenen Subklasse als *feed-forward-loop*-Mechanismus fördern. Andererseits bewirken die Zytokine der einen Subklasse gleichermaßen die Herunterregulation der anderen [13]. Dementsprechend induziert die IL-4 Produktion durch TH2-Zellen parallel die Aktivierung und Differenzierung weiterer TH2-Zellen und hemmt gleichzeitig die TH1-Immunantwort, wohingegen  $\text{IFN-}\gamma$  TH1-Mechanismen fördert und die TH2-Immunantwort hemmt.

## Einleitung

---

Ursache für die Ausprägung dieser divergenten T-Zell-Populationen ist die Polarisierung naiver T-Lymphozyten abhängig von der Art des präsentierten Antigens durch APZs. Hauptfaktor für die Richtung der Differenzierung sind die Zytokinmuster der APZs. Hierbei führt die IL-12 Sekretion durch APZs zu einer IFN- $\gamma$ -Antwort der natürlichen Killer-Zellen (NK) und induziert den TH1-Weg. Andererseits bewirkt die Produktion von IL-6 durch APZs eine Freisetzung von IL-4 durch NK1.1+-Zellen, Basophile, Eosinophile und Mastzellen und so zur Ausprägung des TH2-Weges [10, 12].

Von den antigenpräsentierenden Zellen spielen die dendritischen Zellen die bedeutendste Rolle, wobei für Makrophagen ein fördernder Effekt auf die Proliferation von TH1-Zellen nachgewiesen werden konnte. Erfolgt die Antigenpräsentation durch B-Zellen, so bewirkt dies eher eine Proliferation von TH2-Lymphozyten [14]. Dendritische Zellen beeinflussen die TH-Polarisierung durch die Menge von sezerniertem IL-12, eine Produktion von IL-4 und IL-13 durch dendritische Zellen ist nicht nachweisbar [15].



**Abbildung 2 Vereinfachte Darstellung der Polarisierungsfaktoren für die Ausprägung der TH1- und TH2-Antwort**

Die Entwicklung der TH2-Immunantwort wird durch den IL-4-medierte Stat6-Signaltransduktionsweg und die TH1-Immunantwort durch den IL-12/IFN- $\gamma$  dominierte Stat4-Signaltransduktionsweg induziert [11].

Spezifische Mechanismen vermitteln intrazellulär die Wirkung der verschiedenen Zytokine. Nach Bindung der Zytokine an ihren Rezeptor führt die Bildung von Rezeptorhomo- und Rezeptorheterodimeren zur Aktivierung der *Target*-Gene über den so genannten *Jak-Signal-transducer-and-activation-of-the-transcription*-Signalweg (STAT). Durch Zytokinstimuli kommt es zur schnellen Tyrosin-Phosphorylierung der



STAT-Faktoren, zur Dimerisierung dieser mit konsekutiver Translokation in den Nukleus und Aktivierung der Transkription (siehe Abbildung 2).

#### **1.4 Charakterisierung wichtiger Aktivierungsmarker, kostimulatorischer Moleküle und anderer Oberflächenmoleküle der allergischen Immunantwort**

Der Freisetzung der Zytokine geht die Aktivierung der Zelle über bestimmte Zell-Zell-Interaktionen voraus. Die Expression der verschiedenen Oberflächenmoleküle ermöglicht die phänotypische Charakterisierung der beteiligten T- und B-Lymphozyten bezüglich ihres Aktivierungszustandes und Differenzierungsgrades sowie der Interaktionsbereitschaft und Funktion im Gewebe, wie z. B. in der Nasenschleimhaut.

Ein früher Aktivierungsmarker auf T-Lymphozyten ist das Membran-Glykoprotein CD69 [16]. Die Stimulation des T-Zell-Rezeptors (TCR/CD3) und hierüber die Aktivierung der Proteinkinase C induziert die Expression des Oberflächenmoleküls auf T-Lymphozyten und stellt ein Signal für die T-Zell-Aktivierung bei inflammatorischen Prozessen dar [17]. Die so getriggerte Signaltransduktion führt zur Aktivierung der Genexpression von Lymphokinen und zur Proliferation CD4- und CD8-positiver T-Lymphozyten, nicht aber zu einer Auslösung zytolytischer Mechanismen bei T-Lymphozyten [17].

Periphere CD4-positive T-Lymphozyten werden je nach Differenzierungszustand in zwei funktionell verschiedene Untergruppen unterschieden, in naive und *memory*-T-Zellen [18]. Diese Merkmale lassen sich mit Hilfe des Oberflächenmoleküls CD45 und seinen Isoformen CD45RO für *memory*-Zellen und CD45RA für naive T-Zellen nachweisen. *Memory*-T-Zellen sind im Vergleich zu naiven Zellen durch eine schnellere Antwort auf Antigene gekennzeichnet, die mit einer raschen Heraufregulation der Adhäsionsmoleküle sowie einer besseren Migrationsfähigkeit in extravaskuläre Gewebestrukturen bei insgesamt reduzierter Überlebensfähigkeit einhergeht [18].

Die Migration von TH2-Zellen erfolgt an den Ort des Allergenkontaktes, d.h. aus dem peripheren Blut werden Gewebe wie beispielsweise die Haut oder Nasenschleimhaut infiltriert. Die Mehrzahl der Zellen, die in die Haut diffundieren, zeigen einen CD45RO *memory*-Phänotyp und exprimieren den hautselektiven *homing*-Rezeptor CLA (*cutaneous lymphocyte antigen*), den Liganden des vaskulären E-Selektins [19] [20].

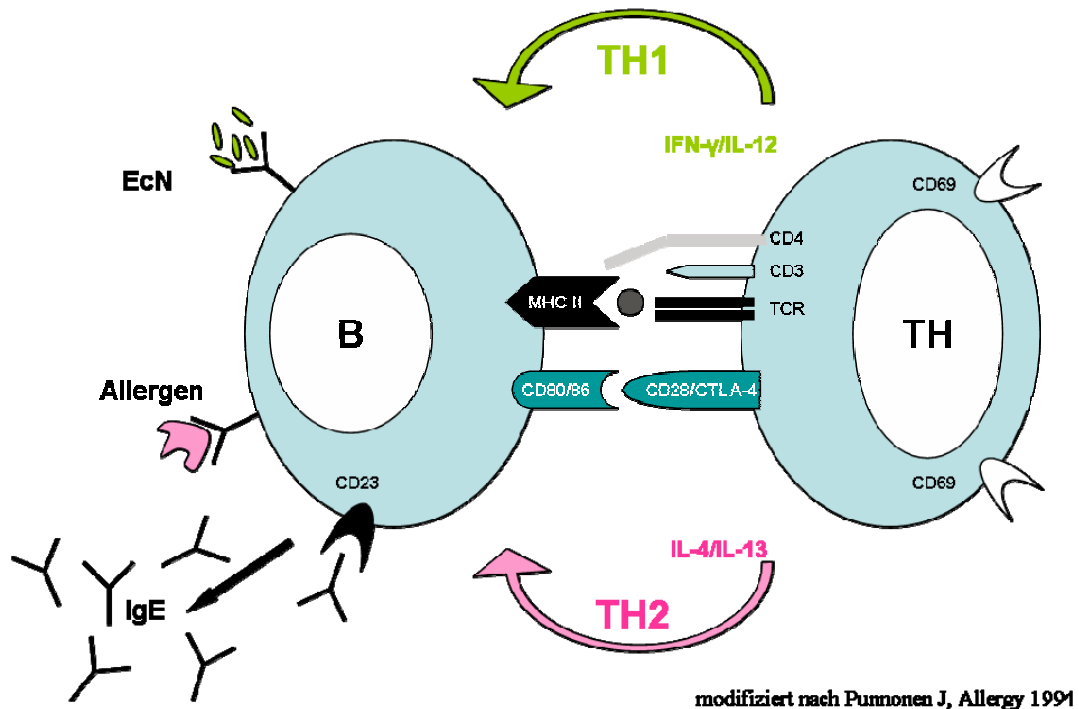
## Einleitung

---

Die Induktion von CLA auf TH2-Zellen benötigt die Stimulation der T-Lymphozyten über den TCR. Die CLA-Expression ist nach Abschluss der T-Zell-Differenzierung zunächst auf TH1-Zellen nachweisbar [19]. Betrachtet man die CD45RO-positiven T-Lymphozyten, so wird CLA von der gesamten, die Haut infiltrierenden Population exprimiert und ist nur zu einem geringen Anteil auf peripheren T-Lymphozyten bzw. extrakutanen *memory*-T-Zell-Infiltraten messbar [20].

Die allergenspezifische T-Zell-Antwort benötigt neben dem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)- und antigenvermittelten Signal an den TCR ein zweites, kostimulatorisches Signal zur optimalen Aktivierung. Dieses kostimulatorische Signal entsteht durch die Interaktion von CD28 auf T-Lymphozyten mit CD80 bzw. CD86 auf der antigenpräsentierenden Zelle (APZ). CD28 ist ein wesentlicher kostimulatorischer Rezeptor auf der ruhenden T-Zelle und lässt sich auf allen CD4-positiven T-Lymphozyten nachweisen [21]. Sein Gegenspieler CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4) wird stark von aktivierten T-Zellen exprimiert und stellt einen zweiten Liganden für CD80 und CD86 dar [22]. Im Vergleich zu CD28 vermittelt CTLA-4 die Herunterregulation der Immunantwort durch Hemmung der Proliferation oder durch direkte Induktion von Apoptose [23]. CTLA-4 wirkt somit über die Konkurrenz um die gleichen Liganden als Induktor der Zellapoptose verzögert gegenregulatorisch [21].

Der Signalweg über CD28-CD86 während der allergischen Immunantwort ist für die Produktion von IL-4 durch T-Lymphozyten notwendig und erhöht gleichzeitig die Sensitivität der TH2-Zellen gegenüber IL-4 [22]. CD86 wird nach Allergenkontakt rasch auf der Oberfläche aktivierter B-Lymphozyten und Monozyten exprimiert und unterstützt die Initiierung der TH2-Antwort [24]. Dementsprechend konnte auf B-Lymphozyten von Atopikern eine erhöhte CD86-Expression nachgewiesen werden [25]. Im Gegensatz hierzu wird CD80 von aktivierten B-Lymphozyten und verschiedenen APZs heraufreguliert [21] und scheint aufgrund der verzögerten Induktion für die Aufrechterhaltung einer TH1-Antwort über IFN- $\gamma$  und IL-2 eine Rolle zu spielen [23]. Die Induktion der initialen IL-4 Produktion wird ausschließlich durch den CD86-Signalweg und nicht durch CD80 vermittelt [21]. Im Mausmodell zeigten CD80<sup>-/-</sup>-Tiere eine relativ normale TH1- und TH2-Immunantwort, wohingegen CD86<sup>-/-</sup>-Mäuse eine deutliche Abschwächung der Antigen-spezifischen Immunantwort aufwiesen [21].



**Abbildung 3 Schematische Darstellung der T-B-Zellinteraktion und Modulation der TH-Antwort in Abhängigkeit von der Art des Stimulus [26]**

B-Lymphozyten exprimieren auch CD23 [24]. Der niedrig-affine IgE-Rezeptor CD23 (FcεRII) spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Typ1-Allergieantwort. CD23 wird durch den eigenen Liganden IgE und nach Stimulation mit IL-4 heraufreguliert [27] und beeinflusst die IgE-Synthese über zwei verschiedene Mechanismen. Einerseits bewirkt die Bindung von IgE an den CD23-Rezeptor die Stabilisierung von CD23 und über einen negativen *feedback*-Mechanismus kommt es zur Hemmung der IgE-Produktion. Andererseits wird bei Verminderung von IgE durch die Bindung autokatalytisch gebildeter sCD23-Fragmente an CD21 die IgE-Produktion stimuliert. Durch eine Fehlregulation des CD23-Signalweges bei Atopikern kann die verstärkte IgE-Produktion teilweise erklärt werden [27]. IFN-γ dagegen verursacht eine Herunterregulation von CD23 auf posttranskriptionaler Ebene in B-Lymphozyten [28]. Die Interaktion von T-Lymphozyten mit B-Lymphozyten beeinflusst somit einerseits die Ausprägung der TH2-Antwort und hat andererseits für den Ig-Klassenwechsel und die Induktion der IgE-Produktion eine große Bedeutung.

### 1.5 Therapeutische Ansätze und die Hygiene Hypothese

Neben der Erforschung der immunologischen Mechanismen, die den Allergien zu Grunde liegen, stehen epidemiologische und pathophysiologische Studien im Vordergrund der gegenwärtigen Forschung. Der allergische Phänotyp ist von der genetischen Prädisposition und der Interaktion mit Umweltfaktoren abhängig. Das komplexe polygene Vererbungsmuster und dessen Modulation durch Umweltreize beeinflusst somit die Entwicklung und Ausprägung allergischer Manifestationen [29].

Eine der ersten Hypothesen zur Erklärung der zunehmenden Prävalenz allergischer Erkrankungen ist die von Strachan et al. 1989 formulierte so genannte „Hygiene Hypothese“. Entscheidend hierbei ist die Annahme, dass Infektionen in der frühen Kindheit eine wirksame Allergieprävention darstellen. Folglich wurde die zunehmende Prävalenz allergischer Erkrankungen mit der Reduktion schwerer kindlicher Infektionskrankheiten infolge der konsequenten Durchführung von Vakzinierungen und Antibiotikatherapien sowie mit einer Veränderung der Ernährungsgewohnheiten und der Schaffung hygienischer Lebensräume assoziiert [30]. Mit der Entdeckung der TH1- und TH2-Populationen konnte die Hypothese gestärkt werden, da die natürliche Immunität gegenüber viralen und bakteriellen Infektionen im Sinne einer TH1-Antwort eine damit verbundene Unterdrückung der IgE-vermittelten allergischen TH2-Antwort immunpathologisch plausibel macht [31].

Epidemiologische und experimentelle Daten liefern einerseits bestätigende Aspekte, andererseits auch offene Fragen in Bezug auf die formulierte Hypothese. Querschnitts- und Longitudinalstudien zu spezifischen und unspezifischen Infektionskrankheiten in der Kindheit konnten die „Hygiene Hypothese“ in den meisten Untersuchungen nicht erhärten [31]. Für Maserninfektionen [32], virale Tröpfcheninfektionen [33] und Vergleiche zwischen Kohorten mit und ohne Pertussis- [34] und BCG-Impfschutz [35] konnten keine signifikanten Tendenzen nachgewiesen werden, die den in der Hygiene Hypothese postulierten Zusammenhang bestätigen.

Im Gegensatz dazu zeigte eine retrospektive Querschnittstudie die reduzierte Prävalenz atopischer Erkrankungen bei jungen italienischen Männern mit Antikörpern gegen Hepatitis A bzw. unter Männern negativen HAV-Serotyps mit mehr als drei älteren Geschwistern [36]. Indirekt findet sich hier ein Hinweis, dass ein vermehrtes Auftreten frühkindlicher Infektionskrankheiten bei Kindern mit älteren Geschwistern und das Leben unter unhygienischen Lebensbedingungen, gekennzeichnet durch HAV-

Infektionen, die Prävalenz atopischer Erkrankungen reduzieren [36]. Führt man diesen Gedanken weiter, so liegt die Vermutung nahe, dass möglicherweise besonders die gastrointestinale Keimflora immunmodulatorisch die TH1/TH2-Balance beeinflusst. Hinweisend auf die Beteiligung des gesamten mukosalen Immunsystems bei allergischen Erkrankungen könnte auch der Nachweis eosinophiler Infiltrate in duodenaler Mukosa bei Allergikern sein [37].

### **1.6 Probiotische Bakterien – Escherichia coli Stamm Nissle 1917**

Die Aufnahme bestimmter Mikroorganismen über Nahrungsmittel zur Förderung der Gesundheit hat eine über Jahrtausende reichende Geschichte. Die Bezeichnung mit dem aus dem griechischen stammenden Begriff probiotisch - „für das Leben“ - wurde 1965 von Lilly und Stillwell [38] für wachstumsstimulierende mikrobielle Substanzen als Antonym zu der Bezeichnung antibiotisch eingeführt. Die Definition hat sich seit 1974, seit der erstmaligen Verwendung im heute gebräuchlichen Sinne [39], stetig verändert. Probiotisch definiert ein Produkt bestimmter lebensfähiger Mikroorganismen, welche bei Aufnahme durch den entsprechenden Wirt die vorherrschende Mikroflora eines Kompartiments verändern und sich günstig auf die Gesundheit dieses Wirtes auswirken [40].

Zu den gebräuchlichsten Probiotika zählen Lactobazillen und Bifidobakterien, aber auch für einige Enterokokken und E. coli lässt sich die oben genannte Definition anwenden [41]. Neben der Einsatzfähigkeit bei z.B. Diarrhoen, Obstipation, entzündlichen Darmerkrankungen und Laktasemangel wird ihnen eine Anwendbarkeit bei allergischen Erkrankungen zugeschrieben. Die vermutete Wirksamkeit erschließt sich zunächst aus epidemiologischen Daten, die einen Zusammenhang zwischen Veränderungen der Darmflora und der epidemischen Entwicklung von Allergien zeigen [42, 43]. Verschiedene in vitro und in vivo Untersuchungen zeigen immunmodulatorische Effekte wie die Induktion der IL-12- und IFN- $\gamma$ -Produktion [44] und eine Reduktion der Eosinophilie bei Asthma [45] sowie eine Reduktion des fäkalen TNF $\alpha$  [46].

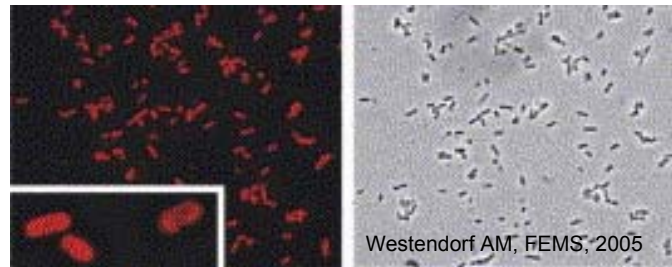
Die erste placebo-kontrollierte doppel-blinde (PCDB) Studie zur Wirksamkeit probiotischer Bakterien erfolgte 1997 mit Lactobacillus GG (LGG) bei Kindern mit Kuhmilchallergie [47]. 31 Kinder mit atopischer Dermatitis erhielten extensiv hydrolysierte Formula-Nahrung mit bzw. ohne Zusatz von LGG, zusätzlich wurde 10

stillenden Müttern von Säuglingen mit atopischer Dermatitis LGG verabreicht. Es zeigte sich nach einem Behandlungsmonat eine signifikante Ekzemverbesserung gegenüber der Kontrollgruppe, die intestinale Besiedlung wurde nicht untersucht [47]. Bei Erwachsenen mit Asthma bzw. allergischer Rhinitis durchgeführte Studien zur Langzeiteinnahme von Lactobazillen in Milchprodukten wiesen divergente Resultate bezüglich eines positiven Effektes für die allergische Symptomatik auf [45, 48, 49].

Die präventive Bedeutung der LGG wurde 2001 in einer PCDB-Studie bei finnischen Kindern mit hohem Risiko für die Entwicklung eines atopischen Ekzems untersucht, deren Mütter präpartal und zum Geburtszeitpunkt LGG über 2-4 Wochen erhielten [50]. Kindern, die nicht gestillt werden konnten, wurde zusätzlich mit LGG-versetzte Flaschennahrung verabreicht. Eine Kontrollgruppe erhielt Placebo analog der LGG-Gabe. Im 12. Lebensmonat zeigte sich in der Verumgruppe eine signifikante Reduktion bezüglich des Auftretens einer atopischen Dermatitis [50].

Epidemiologische Daten bestätigen, dass das Aufwachsen in ländlicher Umgebung signifikant das Auftreten einer Atopie beeinflusst. Als kausaler Faktor steht hierbei auch die Auseinandersetzung mit mikrobiellen Partikeln vornehmlich aus den Stallungen im Vordergrund. Hier sind vor allem bakterielle Endotoxine bedeutsam. Endotoxine setzen sich aus den sogenannten Lipopolysacchariden (LPS) zusammen und enthalten Bestandteile der äußeren Zellmembranen von gram-negativen Bakterien [51]. LPS führt nach Antigen-Präsentation zu einer deutlichen IL-12-Antwort und stellt ein obligatorisches Signal für die Reifung naiver T-Zellen zu TH1-Lymphozyten dar [52]. Von Mutius et al. konnten zeigen, dass die Endotoxinkonzentrationen in ländlichen Regionen auch in den Haushalten von Familien mit Viehzucht signifikant erhöht sind und einen protektiven Faktor für die Entwicklung atopischer Erkrankungen im Kindesalter darstellen [53].

Zu den apathogenen, gram-negativen Bakterien, die LPS auf ihrer Zellwand exprimieren, zählt der 1917 patentierte, durch Prof. Dr. med. Alfred Nissle aus dem Darm eines vor Diarrhoe geschützten Pionierunteroffiziers isolierte Kolistamm [54]. Die Anwendung von *Escherichia coli* Nissle 1917 bei Diarrhoen, entzündlichen Darmerkrankungen sowie zur Kolonisation des Darmes nach schweren Infektionen und antibiotischer Therapie ist weit verbreitet [55-58].



**Abbildung 4 Immunfluoreszenzmikroskopie von E. coli NISSLE-HA110-120 and E. coli NISSLE 1917 mit einem HA110-120 spezifischem Antikörper. Rechts dargestellt ist die Kontrastphase von E. coli NISSLE 1917 (Abbildung entnommen aus [59]).**

Untersuchungen bei Frühgeborenen konnten nach präventiver intestinaler Kolonisierung mit E. coli Nissle immunmodulatorische Effekte mit Stimulation der Lymphozytenproliferation und einer Steigerung der IgM- und IgA-Spiegel im Sinne einer Verstärkung der spezifischen humoralen Immunantwort nachweisen [60]. Lodinová-Zádníková et al. wiesen in einer retrospektiven Studie auch 10 bzw. 20 Jahre nach postnataler Kolonisation mit apathogenen E. coli 083:K24:H31 eine reduzierte Inzidenz allergischer Erkrankungen nach [61].

Der Einsatz apathogener E. coli Nissle zur Prävention und Therapie allergischer Erkrankungen begründet sich auf Beobachtungen und vorliegende Daten zur immunmodulatorischen Kapazität der Bakterien. Weiterführende und spezielle Erkenntnisse bezüglich des Einflusses auf die TH1/TH2-Balance lagen zum Zeitpunkt des Beginns der Arbeit nicht vor. Daher war die Untersuchung der den T-Zell-modulierenden Wirkungen von E. coli Nissle zugrunde liegenden Mechanismen eines der Ziele der vorliegenden Arbeit.





## 2 Zielsetzung

Die allergische Rhinitis ist durch eine spezifische lokale Immunreaktion und in den meisten Fällen durch den systemischen Nachweis spezifischer IgE-Antikörper charakterisiert. Die steigende Prävalenz dieser Erkrankung lässt sich an Hand der so genannten ‚Hygiene Hypothese‘ durch die Verschiebung der TH1/TH2-Balance als Resultat einer modifizierten mikrobiellen Stimulation des Immunsystems beschreiben.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war die Charakterisierung der lokalen lymphozytären Immunantwort in der Nasenschleimhaut durch direkte ex-vivo Durchflusszytometrie. Im Vordergrund stand die Bestimmung des Aktivierungszustandes und des Differenzierungsgrades der mukosalen T- und B-Lymphozyten. Durch einen direkten Vergleich zwischen Allergikern und Nichtallergikern wurde die lokale Immunantwort mittels moderner durchflusszytometrischer Techniken analysiert.

Der zweite Aspekt der vorliegenden Arbeit untersucht die immunmodulatorische Kompetenz apathogener *Escherichia coli* Nissle (Stamm 1917) auf die allergische Immunantwort. Durch Analyse der allergen-induzierten Immunreaktion bei gleichzeitiger mikrobieller Stimulation wurde die Rolle von *E. coli* Nissle als Probiotikum und dessen potentielle Bedeutung als immunmodulatorisch aktives Bakterium evaluiert.



## 3 Material und Methoden

### 3.1 Materialien

Alle verwendeten Chemikalien wurden verdünnt, gelöst und gelagert wie vom Hersteller angegeben. Alle Materialien wie z. B. Basisreagenzien, Stimulanzen sowie Substanzen zur Pricktestung sind in Tabelle 3 im Materialverzeichnis (siehe Kapitel 7) aufgelistet.

Die verwendeten Antikörper mit den dazugehörigen Isotypenkontrollen sind in Tabelle 4 im Materialverzeichnis (siehe Kapitel 7) zusammengestellt.

Die benötigten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 5 aufgeführt, Laborgeräte und andere Hilfsmittel sind in Tabelle 6 im Materialverzeichnis (siehe Kapitel 7) dargestellt.

#### 3.1.1 Ansätze

##### 3.1.1.1 Kulturmedium

- RPMI 1640 Medium w 2,0 g/l NaHCO<sub>3</sub> w/o L-Glutamin
- 10 % Fetal Calf Serum, 2 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin

##### 3.1.1.2 BSA-PBS

- Phosphate Buffered Saline w/o Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>
- 0,5 % Bovine Serum Albumine

##### 3.1.1.3 FACS-Puffer

- PBS w/o Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>
- 2 % Bovine Serum Albumine
- 0,002 % Natriumazid

##### 3.1.1.4 PFA

- PBS w/o Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>
- 1 % bzw. 2 % Paraformaldehyd

##### 3.1.1.5 TBS-Puffer

- 20 ml TBS
- 980 ml Aqua dest.

##### 3.1.1.6 E.coli-Suspension

Als Bakterien wurden apathogene Escherichia coli Stamm Nissle 1917 verwendet. Die Bakterien wurden von der Firma Ardeypharm als Mutaflor-Kapseln zur Verfügung gestellt. Zur Gewinnung der Bakterien wurde das Pulver aus der Kapsel isoliert und in

25 ml Kulturmedium aufgenommen. Eine Kapsel Mutaflor enthält  $2,5\text{--}25 \times 10^9$  Bakterien. Zur Stimulation der Zellen wurde die gewonnene Bakteriensuspension weiter verdünnt, so dass für die Stimulation von Blutzellen eine Bakterienkonzentration von  $1 \times 10^7$ /ml (Suspension A) und für die Stimulation von Zellen der Nasenschleimhaut eine Bakterienkonzentration von  $1 \times 10^6$ /ml (Suspension B) zur Verfügung standen. Die aliquotierten Bakteriensuspensionen wurden bei  $-80^\circ\text{C}$  kälteinaktiviert und aufbewahrt [62].

### 3.2 Methoden

#### 3.2.1 Patienten

Für die Untersuchungen wurden Patienten der HNO-Abteilung des Bundeswehrkrankenhauses Berlin ausgewählt, 8 weibliche und 32 männliche Probanden im Alter zwischen 19 und 71 Jahren. Die Mehrzahl der Patienten gab Nasenatembeschwerden an. Bei allen Patienten wurde eine Conchotomie entweder aufgrund einer vergrößerten unteren Nasenmuschel oder im Rahmen einer Septumplastik zur Korrektur einer Septumdeviation durchgeführt. Die Einnahme systemischer bzw. lokaler Steroide innerhalb der vorausgegangenen 14 Tage und von Antihistaminika innerhalb der vorausgegangenen drei Tage wurde ausgeschlossen. Zur Abgrenzung von Allergikern und Nichtallergikern erhielten alle Patienten eine Pricktestung (ALK Scherax) mit Gräser-, Birken- und Beifußallergen sowie auf Hausstaubmilben, Katzenhaare und *Alternaria alternata*. Zusätzlich wurden aus Patientenserum Gesamt-IgE und spezifisches IgE für Lieschgras bzw. Birke bestimmt. Anhand der Anamnese, des Ergebnisses des Pricktestes und des Nachweises von spezifischem IgE wurden für die Gruppe der Allergiker 13 Lieschgrasallergiker und zwei Birkenpollenallergiker rekrutiert (Anamnese, Pricktest und sIgE positiv). Die Kontrollgruppe bildeten 25 Nichtallergiker (Anamnese, Pricktest und sIgE negativ).

#### 3.2.2 Serum-IgE

Die Gewinnung von Serum aus Vollblut erfolgte durch Zentrifugation bei 400 g. Das abgenommene Serum wurde bis zur IgE-Bestimmung bei  $-80^\circ\text{C}$  tiefgefroren. Die Ermittlung des Gesamt-IgE und des spezifischen IgE für Lieschgras- bzw. Birkenallergen wurde mittels Pharmacia-CAP-ELISA-System durchgeführt, einem

Fluoreszenz-Enzym-Immuno-Assay. Die IgE Konzentrationen werden in kU/l sowie für die spezifischen IgE-Werte zusätzlich die zugehörige CAP-Klasse angegeben.

### 3.2.3 PBMC-Aufreinigung

Die PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) wurden aus heparinisiertem Vollblut gewonnen. Die Zellisolierung erfolgte bei Raumtemperatur mittels FICOLL-Dichtegradienten-Zentrifugation mit 450 g. Die gewonnenen Zellen wurden dann zweimal mit PBS (phosphate buffered saline) bzw. 2mM EDTA-PBS gewaschen. Alle Waschschriffe erfolgten bei 4°C. Zur Ermittlung der Zellzahl wurden die Zellen mit Trypanblau angefärbt und dann mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt. Die PBMCs wurden im Anschluss in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter in Kulturmedium aufgenommen.

### 3.2.4 WST-Assay und Dosis-Zeit-Kinetiken

Initial wurden Dosis-Wirkungsuntersuchungen anhand der Stimulation mit steigenden Konzentrationen von apathogenen E. coli ( $0,25 \times 10^6$ ,  $0,5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^6$  and  $2 \times 10^6$  E. coli pro  $1 \times 10^6$  Zellen) durchgeführt. Anschließend wurde die geeignete Stimulationsdauer anhand einer Zeitreihenanalyse mit 6 - 18 - 24 - und 48 Stunden mit der optimalen E. coli Konzentration und Allergen (500 SQ Einheiten/ml) ermittelt. Stimulationsbedingungen und durchflusszytometrische Messung mit CD4, CD69, IL-4 und IFN- $\gamma$  bzw. CD20 und CD86 zur Bestimmung des Aktivierungsgrades entsprechen der im Folgenden beschriebenen Protokolle. Für alle Experimente wurde ein unstimulierter Ansatz als Negativkontrolle mitgeführt.

Die mitochondriale Aktivität wurde zur Ermittlung der Zellvitalität nach 18-stündiger Stimulation unstimuliert, mit Allergen 500 SQ Einheiten/ml, SEB 1  $\mu$ g/ml und E. coli  $1 \times 10^6$  auf je  $1 \times 10^6$  PBMCs durch Zugabe von 10  $\mu$ l WST-1 Reagenz (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) zu je 100  $\mu$ l Zell-Stimulanzien-Ansatz gemessen. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mit E. coli  $1 \times 10^6$  ohne PBMC-Zugabe verwendet. Die Messung erfolgte halbstündlich über insgesamt vier Stunden mittels spektrophotometrischer Quantifizierung bei 450nm.

### 3.2.5 Stimulation der PBMCs

Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. Zur Inkubation wurden die PBMCs mit einer Zelldichte von 1x10<sup>6</sup>/ml in 24-Well-Kulturplatten in 1 bzw. 2 ml Endvolumen stimuliert. Die Stimulanzen wurden unmittelbar vor der Zelleinsaat dazugegeben. Zur Stimulation der Zellen wurden Gräser- bzw. Birkenallergen, E. coli Stamm Nissle 1917 und eine Kombination eingesetzt. Das Allergen wurde mit einer Konzentration von 500 SQ Einheiten/ml verwendet. Jeder Stimulation mit Allergen wurde anti-CD28 als Kofaktor mit einer Konzentration von 0,5 µg/ml, bei der Stimulation der Zellen zur Intrazellulär-Färbung 1 µg/ml zugesetzt. Die Stimulation mit E. coli erfolgte mit 100 µl E. coli-Suspension A pro Milliliter Gesamtvolumen. Als Vergleichsstimulationen wurden je ein Well unstimulierter Zellen als Negativkontrolle sowie SEB-stimulierter Zellen als Positivkontrolle mitgeführt. Für die Positivkontrolle wurde eine SEB-Konzentration von 1 µg/ml mit zusätzlich 500 SQ Einheiten Gräser- bzw. Birkenallergen pro Milliliter und anti-CD28 in einer Konzentration von 0,5 bzw. 1 µg/ml eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug für die Zellen zur Oberflächenfärbung 18 Stunden, für Zellen zur Intrazellulär-Färbung 16 Stunden. Die jeweilige Stimulationsdauer wurde anhand der o.g. Zeitkinetik ermittelt.

### 3.2.6 Gewinnung von Lymphozyten aus der Nasenschleimhaut

Die Gewinnung von Zellen der Nasenschleimhaut erfolgte aus Conchotomiematerial. Das Muschelmaterial wurde bis zur Aufbereitung in Kulturmedium bei 4°C aufbewahrt. Alle im Folgenden beschriebenen Schritte wurden ebenfalls bei 4°C bzw. auf Eis durchgeführt. Nach der Entfernung von Knochen und Knorpel wurde die übrige Schleimhaut in Fragmente von ca. 2x2 mm zerteilt. Für die mechanische Zerkleinerung wurden ca. 5 - 10 Stücke in ein Medicon gegeben und mit etwa 1ml Kulturmedium aufgefüllt. Der zirka zweiminütige Zerkleinerungsvorgang in einer *Medimachine* erfolgte bei 100 rpm. Im Anschluss wurde die Mischzellsuspension aus den Medicon abgesaugt, durch ein Filter mit einer Porengröße von 50 µm gepresst und das Medicon zweimal mit Kulturmedium nachgespült. Nach Säuberung des Medicons von den restlichen Schleimhautstücken wurde der Zerkleinerungsvorgang so oft wiederholt, bis das gesamte Muschelmaterial aufgebraucht war. Die gewonnenen Zellen konnten dann abzentrifugiert und mit PBS gewaschen werden. Das Pellet wurde einer einminütigen Erythrolyse mit 0,2%iger Natriumchloridlösung unterzogen; lysierte Erythrozyten und

anderer Zelldetritus wurden dann nach Zugabe von 1,6%iger Natriumchloridlösung und PBS abzentrifugiert. Die so gewonnenen Schleimhautzellen wurden in 4 ml Kulturmedium aufgenommen.

### **3.2.7 Stimulation der gewonnenen Zellen aus der Nasenschleimhaut**

Zur Stimulation der gewonnenen Zellen aus der Nasenschleimhaut wurden jeweils 600 µl Zellsuspension in 2 ml Endvolumen auf einer 24-Well-Kulturplatte bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Die Stimulation erfolgte vergleichbar zu den PBMCs mit Gräser- bzw. Birkenpollenallergen, E. coli Stamm Nissle 1917 sowie mit beiden Substanzen gleichzeitig. (siehe Kapitel 3.2.5). Zur Stimulation mit E. coli wurden pro Ansatz 150 µl der E. coli-Suspension B eingesetzt. Positiv- und Negativkontrolle wurde analog der PBMC-Stimulation mitgeführt (siehe Kapitel 3.2.5). Die Inkubationsdauer betrug 18 Stunden.

### **3.2.8 Durchflusszytometrie**

Zur Untersuchung der Zelleigenschaften vor und nach Stimulation wurden die gewonnenen Zellen mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern angefärbt und dann durchflusszytometrisch gemessen. Die zur Färbung verwendeten Antikörper wurden vor Untersuchungsbeginn austitriert und die so ermittelten Mengen zur Färbung eingesetzt. Es wurde eine Drei- bzw. Vierfachfärbung durchgeführt, als Negativkontrolle wurden Antikörper mit den entsprechenden Isotypenkontrollen bzw. ungefärbte Zellen verwendet. Die Analyse erfolgte an einem FACScalibur Durchflusszytometer von Becton Dickinson.

#### **3.2.8.1 Oberflächen-FACS-Färbung des Ausgangswertes und der stimulierten Zellen**

Für die Färbung der PBMCs wurden pro Färbung  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzt; die Mischzellsuspension aus der Nasenschleimhaut wurde zur Färbung auf die Färberöhrchen aufgeteilt. Vor dem Beginn der Färbung erfolgte ein Waschschriff mit PBS. Die Zellen wurden dann in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und mit 3 - 10 µl Beriglobin für 10 Minuten geblockt. Im Anschluss wurden zum Ausgangswert sowie zu den Zellen jedes Stimulationsansatzes folgende Antikörper pro Färbung hinzugegeben: für die Färbung der B-Zellen 10 µl CD23-FITC, 5 µl CD80-PE, 5 µl CD20-PerCP und 5

$\mu\text{l}$  CD86-APC; für die Färbung der T-Zellen 5  $\mu\text{l}$  CLA-FITC, 5  $\mu\text{l}$  CD152-PE, 10  $\mu\text{l}$  CD4-PerPC und 2,5  $\mu\text{l}$  CD69-APC. Im Ausgangswert erfolgte zusätzlich zu den oben genannten Färbungen eine Färbung der B-Lymphozyten mit 2,5  $\mu\text{l}$  IgE-FITC, 10  $\mu\text{l}$  CD138-PE und 5  $\mu\text{l}$  CD20-PerCP sowie der T-Lymphozyten mit je 10  $\mu\text{l}$  CD45 RO-FITC, CD45 RA-PE und CD4-PerCP. Die Färbung der mukosalen Lymphozyten erfolgte analog in Abhängigkeit von den Zellzahlen. Abschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 2 % PFA fixiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die als Negativkontrolle mitgeführten Zellen jedes Stimulationsansatzes wurden allen Färbeschritten mit Ausnahme der Antikörperzugabe unterzogen.

### 3.2.8.2 Intrazelluläre FACS-Färbung der stimulierten PBMCs

Drei Stunden vor Ablauf der 16-stündigen Inkubation wurden 2  $\mu\text{l}$  Brefeldin A zu jedem Stimulationsansatz hinzugefügt. Nach Inkubationsende wurden  $1 \times 10^6$  Zellen aus jedem Stimulationsansatz pro Färbung überführt, die Zellen zweimal mit PBS bei 4°C und 250 g gewaschen und mit 500  $\mu\text{l}$  1%igem PFA 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach weiteren zwei Waschschritten mit PBS wurden die Zellen in 100  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer resuspendiert und mit 5  $\mu\text{l}$  Beriglobin 10 min geblockt. Im Anschluss wurden die Zellen mit 10  $\mu\text{l}$  CD4-PerCP und 2,5  $\mu\text{l}$  CD69-APC für 20 - 30 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit PBS wurden die Zellen 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 500  $\mu\text{l}$  FACS-Permeabelizing Solution permeabilisiert, dann mit FACS-Puffer bei 250 g erneut gewaschen und wiederum in 100  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer resuspendiert. Im nächsten Schritt erfolgte die intrazelluläre Färbung mit 10  $\mu\text{l}$  IFN $\gamma$ -FITC und IL-4-PE 20 - 30 Minuten bei 4°C. Die markierten Zellen wurden dann mit PBS gewaschen und in 500  $\mu\text{l}$  2%igem PFA bis zur durchflusszytometrischen Messung fixiert. Für jeden Färbeansatz wurde als Negativkontrolle eine Färbung mit gleichem Procedere mit den entsprechenden Isotypenkontrollen anti-IgG2b-FITC, anti-IgG1-PE, anti-IgG1-PerCP und anti-IgG1-APC durchgeführt. Die Isotypenkontrollen wurden in äquivalenten Konzentrationen zu den Färbeantikörpern eingesetzt.

### 3.2.9 Immunhistochemische Färbung der Nasenschleimhaut

Conchotomiematerial - exemplarisch von zwei Allergikern und zwei Nichtallergikern - wurde unmittelbar nach der Gewinnung in Tissue Freezing Medium mit flüssigem



Stickstoff kryofixiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die im Kryotom angefertigten Kryoschnitte haben eine Schnittdicke von ca.  $5\ \mu\text{m}$ . Die Schnitte wurden zunächst mit 3% BSA in TBS-Puffer für drei Stunden geblockt, nach dreimaligem, je 5-minütigem Waschen mit TBS-Puffer für 2 Stunden mit dem CD4 (1:3000) und CD20 (1:300) Antikörper inkubiert. Jeweils nach erneutem Waschschrift (s.o.) erfolgte schrittweise die Inkubation mit dem ChemMate Detection Kit: biotinylierter Link für 15 min, Streptavidin-Alkalische-Phosphatase für 10 min sowie Substrat-Chromogen-Lösung für 6 min. Nach erneutem Waschschrift erfolgte die Kernfärbung mit Papanicolaous 1:4 für 30 s mit anschließendem Bläuen in Leitungswasser. Die gefärbten Schnitte wurden mit Glycerin eingedeckelt.

### **3.3 Statistik**

Für die Berechnung der statistischen Signifikanz wurden die Rangvarianzanalyse nach Brunner für nicht-parametrische Daten und zur Analyse der Ausgangswerte der Wilcoxon-Test für den Gruppenvergleich und der Mann-Whitney-U-Test für den Vergleich von Blut und Nasenschleimhaut verwendet. Deskriptive Statistiken, Tabellenkalkulationen und Diagramme wurden mit Excel 2000, GraphPad Prism 4 bzw. SPSS 11.0 erstellt.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 IgE-Bestimmung

Der Gesamt-IgE-Spiegel lag bei den Allergikern im Mittel bei 268,1 kU/l, bei Nichtallergikern bei 68,3 kU/l. Damit zeigte die Gruppe der Allergiker signifikant höhere Gesamt-IgE-Spiegel als die Kontrollgruppe ( $p=0,02$ ).

Die Bestimmung des spezifischen IgE für Lieschgras ergab bei allen Nichtallergikern Werte unter 0,35 kU/l, d.h. CAP-Klasse 0. In der Gruppe der Allergiker erreichten 6,7% CAP-Klasse 6, 20% CAP-Klasse 5, 46,7% CAP-Klasse 3, 13% CAP-Klasse 2 sowie jeweils 6,7% CAP-Klasse 1 bzw. 4. Dabei wurde spezifisches IgE für Lieschgras bei den Patienten bestimmt, die auch im Pricktest positiv auf Gräser reagierten, und sIgE für Birke bei den Patienten, die im Pricktest negativ auf Gräser, aber positiv auf Birkenallergen reagierten. Der Titer für spezifisches IgE Gräser lag bei den Allergikern im Mittel bei 25,32 kU/l.

### 4.2 Pricktestung

Die Pricktestung ergab bei allen getesteten Patienten mit Histamin eine Positivquaddel  $\geq 3$  mm sowie keine Quaddelbildung im Natriumchlorid-Prick (Negativkontrolle).

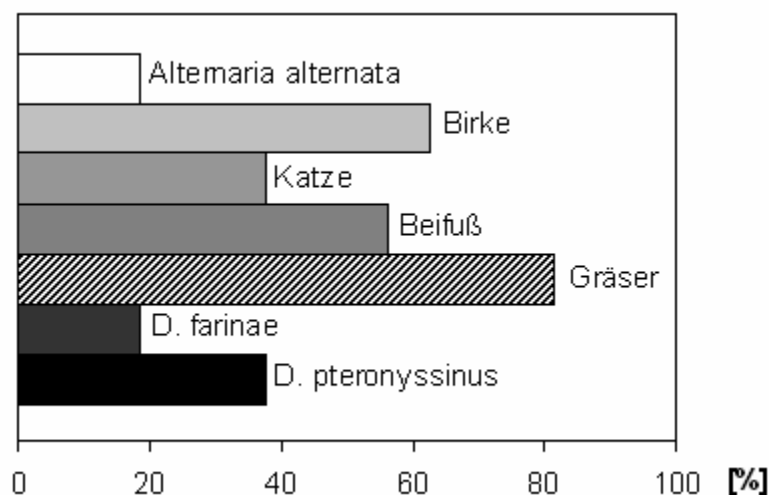


Abbildung 5 Resultate der positiven Pricktestungen in der Gruppe der Allergiker (Angabe in %)

Die Allergikergruppe zeigte positive Testergebnisse auf Gräser in 81,25 %, auf Birke in 62,5 %, auf Beifuß in 56,25 %, auf Katze und Dermatophagoides pteronyssinus in je 37,5 % sowie auf Dermatophagoides farinae und Alternaria alternata in je 18,75 % (siehe Abbildung 5). In der Gruppe der Nichtallergiker waren sämtliche getestete Allergene negativ.

### **4.3 Phänotyp der lymphozytären Zellen in Blut und Nasenschleimhaut**

Zur Charakterisierung der T- und B-Lymphozyten aus dem peripheren Blut und der Nasenschleimhaut wurden die Zellen direkt ex vivo durchflusszytometrisch untersucht. Im Vordergrund standen der Phänotyp der Lymphozyten von Allergikern und Nichtallergikern sowie der direkte Vergleich von Lymphozyten des peripheren Blutes mit den mukosalen Lymphozyten aus dem Infiltrat der Nasenschleimhaut.

#### **4.3.1 T-Lymphozyten**

Zur Charakterisierung der T-Lymphozyten wurde die CD4-positive Fraktion der PBMCs sowie der mukosalen Zellen identifiziert und durchflusszytometrisch die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle untersucht. Die Charakterisierung der T-Lymphozyten erfolgte hinsichtlich der Expression von CD69, CD152 (CTLA-4), CLA (cutaneous lymphocyte-associated antigen) sowie CD45RO und CD45RA.

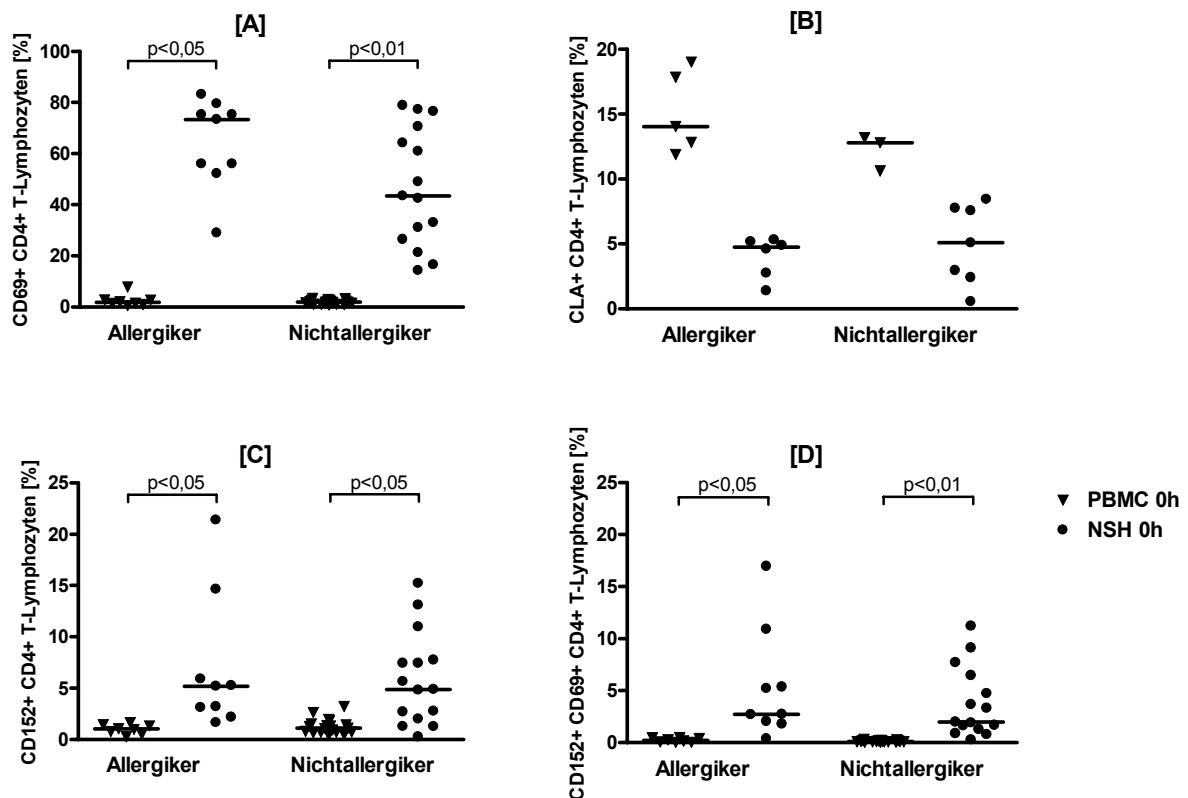
##### **4.3.1.1 Expression von CD69, CTLA-4 und CLA auf CD4-positiven T-Lymphozyten**

Sowohl in der Gruppe der Allergiker (Median 1,8 %) als auch der Nichtallergiker (Median 1,9 %) zeigte sich bei den peripheren T-Lymphozyten eine geringe basale CD69-Expression (Abbildung 6A).

Dagegen fand sich trotz großer interindividueller Unterschiede eine ausgeprägte CD69-Expression auf mukosalen T-Lymphozyten (14 – 83 % CD69-positiver T-Zellen). Hier zeigten sich in der Gruppe der Allergiker (Median 73,4 %) deutlich mehr aktivierte T-Zellen als bei den Nichtallergikern (Median 43,4 %).

Im Vergleich der peripheren und der mukosalen T-Lymphozyten fand sich gleichermaßen bei Allergikern und Nichtallergikern eine signifikant höhere Expression

des Aktivierungsmarkers auf T-Lymphozyten der Nasenschleimhaut ( $p_{NA}=0,003$ ;  $p_A=0,028$ ; siehe Abbildung 6A).



### Abbildung 6 Aktivierungsprofil CD4-positiver peripherer und mukosaler T-Lymphozyten

Darstellung der Expression von CD69 [A], CLA [B], CD152 (CTLA-4) [C] und CD69+CD152 [D] Gruppenvergleich Allergiker und Nichtallergiker, Angabe in Prozent der CD4-positiven Zellen

Die basale Expression von CLA (cutaneous lymphocyte-associated antigen) auf peripheren T-Lymphozyten lag bei Nichtallergikern im Median bei 12,8 % und bei Allergikern vergleichbar bei 14 % der CD4-positiven T-Lymphozyten.

In der Nasenschleimhaut ließen sich für die CLA-Expression auf CD4-positiven Lymphozyten ebenfalls keine relevanten Unterschiede zwischen Allergikern (Median 4,8 %) und Nichtallergikern (Median 5,1 %) erkennen. Wie in Abbildung 6B dargestellt ist, zeigten sich für die Expression von CLA im Vergleich zwischen mukosalen und peripheren T-Lymphozyten geringere Werte in beiden Gruppen. Die geringen Fallzahlen ergeben sich aus der initialen Verwendung eines Antikörpers, mit dem keine ausreichende Zahl von CLA-positiven Zellen detektierbar war.

Die CLA-Expression auf CD69-positiven T-Lymphozyten zeigte eine vergleichbare Verteilung bei Allergikern und Nichtallergikern auf mukosalen und peripheren T-Lymphozyten (Daten nicht dargestellt). Der Vergleich CLA-positiver aktivierter mukosaler und peripherer T-Lymphozyten ergab, dass nur 1,3 – 1,5 % der peripheren CLA-positiven T-Lymphozyten, jedoch 34,1 – 37,1 % der mukosalen CLA-exprimierenden T-Lymphozyten CD69-positiv waren.

Die in Abbildung 6C dargestellte Expression des kostimulatorischen Moleküls CD152 (CTLA-4) auf peripheren T-Zellen war sehr gering und lag basal in beiden Gruppen im Median bei ca. 1 %.

Die CD152-Bestimmung auf T-Lymphozyten der Nasenschleimhaut ergab ebenfalls eine geringe Expression und zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Allergikern (Median 5,2 %) und Nichtallergikern (Median 4,9 %).

T-Lymphozyten der Nasenschleimhaut exprimierten CTLA-4 signifikant mehr als periphere CD4-Zellen (in der Gruppe der Allergiker ( $p_A=0,043$ ) als auch der Nichtallergiker ( $p_{NA}=0,010$ )). Insgesamt fand sich eine starke Variation der Einzelwerte für die CD152-Expression auf mukosalen T-Lymphozyten (1,7 – 21,4 % der CD4-Zellen bei Allergikern, 0,3 – 15,2 % bei Nichtallergikern).

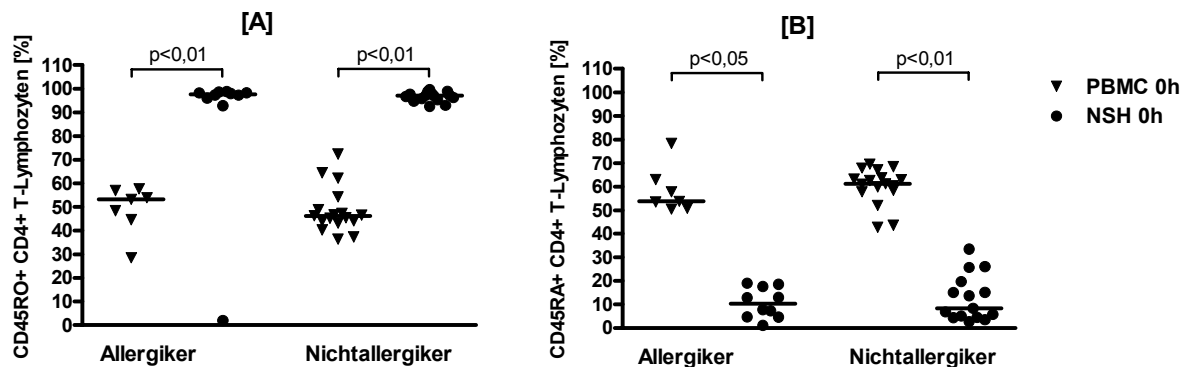
Vergleichbare Expressionsprofile zeigten sich auch für die CD152-Expression auf CD69-aktivierten T-Lymphozyten (siehe Abbildung 6D).

### **4.3.1.2 Expression von CD45RO und CD45RA auf CD4-positiven T-Lymphozyten**

Die in Abbildung 7 gezeigte Untersuchung von CD45RO und CD45RA auf CD4-positiven T-Lymphozyten des peripheren Blutes ergab eine vergleichbare Expression beider Marker sowie eine vergleichbare Verteilung bei Allergikern und Nichtallergikern. Der Median in der Gruppe der Nichtallergiker lag für CD45RO bei 46,3 %, für CD45RA bei 61,2 %; die Allergiker zeigten CD45RO-Werte von median 53,2 % sowie CD45RA von 53,8 % der CD4-positiven T-Lymphozyten.

In der Nasenschleimhaut exprimierten die CD4-positiven T-Lymphozyten in beiden Gruppen vornehmlich CD45RO, für die Nichtallergiker ergab sich ein Median von 97,2 %, für die Allergiker von 97,7 %. Die CD45RA-Expression unterschied sich mit einem Median von 10,4 % bei Allergikern nur unwesentlich von der Gruppe der Nichtallergiker mit einem Median von 8,4%.

Bei Gegenüberstellung von mukosalen und peripheren T-Lymphozyten ließ sich in beiden Gruppen eine stärkere Expression von CD45RO (Abbildung 7A) in der Nasenschleimhaut nachweisen ( $p=0,005$ ), wohingegen die ermittelten Werte für CD45RA (Abbildung 7B) auf peripheren T-Lymphozyten ein signifikant höheres Niveau als in der Nasenschleimhaut in beiden Gruppen zeigten ( $p_A=0,043$ ;  $p_{NA}=0,005$ ).



**Abbildung 7 Expression von CD45RO [A] und CD45RA [B] auf CD4-positiven T-Lymphozyten**

Darstellung der CD45 RO/RA Expression auf mukosalen und peripheren T-Lymphozyten, Vergleich der Gruppen Nichtallergiker und Allergiker, Angabe in Prozent der CD4-positiven Zellen

#### 4.3.2 B-Lymphozyten

Zur Identifizierung der B-Lymphozyten wurden die PBMCs und Einzelzellsuspensionen der Nasenschleimhaut mit anti-CD20 gefärbt. Die phänotypische Charakterisierung der B-Lymphozyten erfolgte ausgehend von der CD20-Population, es wurden durchflusszytometrisch die basale Expression von CD23 (FcεRII) und IgE sowie die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 untersucht.

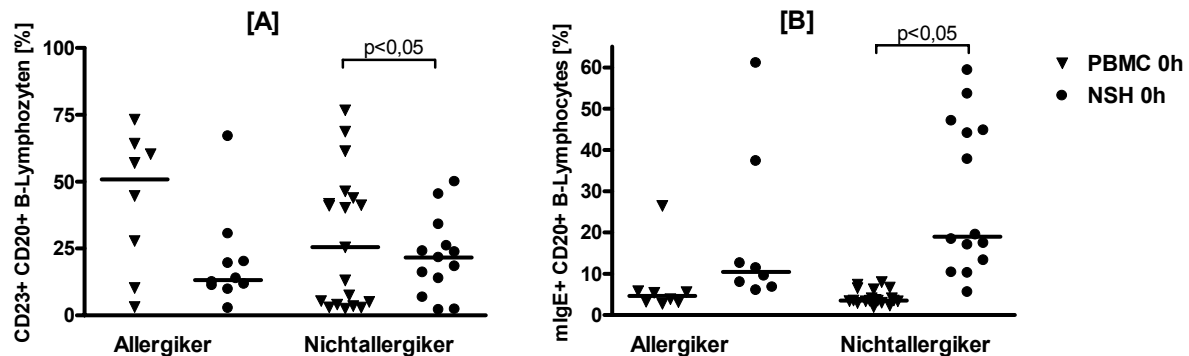
##### 4.3.2.1 Expression von CD23 und mIgE auf CD20-positiven B-Lymphozyten

Die Expression von CD23 auf peripheren B-Lymphozyten zeigte in beiden Gruppen große interindividuelle Schwankungen (ca. 3 – 73 % in beiden Gruppen), so dass sich trotz deutlich niedrigerer Expression in der Gruppe der Nichtallergiker (Median 25,5 %) keine Signifikanz im Vergleich zur Gruppe der Allergiker (Median 50,8 %) bestimmen ließ.

## Ergebnisse

In der Nasenschleimhaut fand sich eine geringere interindividuelle Varianz, der Median der Nichtallergiker lag mit 21,7 % leicht oberhalb von dem der Allergiker mit 13,2 % der CD20-positiven Zellen.

Der in Abbildung 8A dargestellte Vergleich mukosaler und peripherer B-Lymphozyten zeigt eine weitaus geringere CD23-Expression in der Nasenschleimhaut ( $p_{NA}=0,036$ ).



**Abbildung 8 Expression von CD23 [A] und mIgE [B] auf CD20-positiven B-Lymphozyten**

Darstellung der CD23 und mIgE Expression auf mukosalen und peripheren B-Lymphozyten, Vergleich der Gruppen Nichtallergiker und Allergiker, Angabe in Prozent der CD4-positiven Zellen

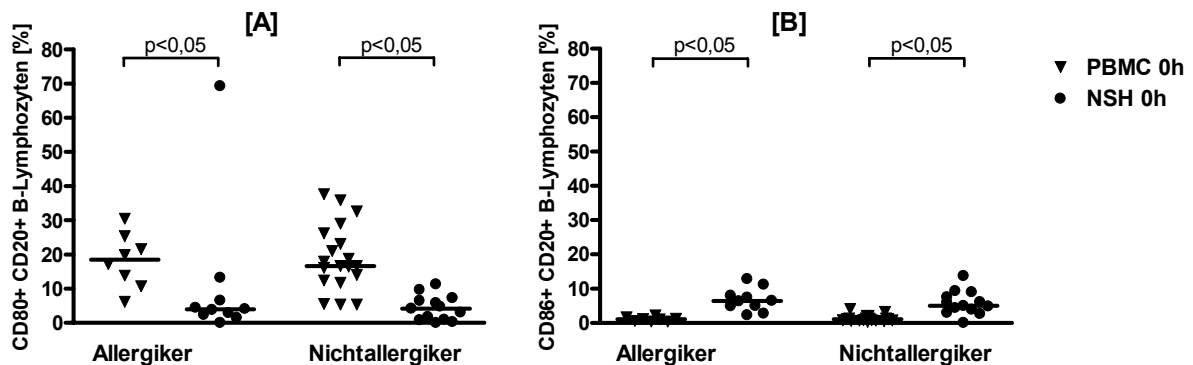
Die Untersuchung der mIgE-Expression auf peripheren B-Lymphozyten ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe der Allergiker (Median 4,6%) und der Nichtallergiker (Median 3,5 %) und ist in Abbildung 8B abgebildet.

Die Expression von mIgE auf CD20-positiven B-Lymphozyten der Nasenschleimhaut war individuell sehr unterschiedlich (Allergiker 6,1 – 61,1 %; Nichtallergiker (5,6 % - 59,3 %)). Im Gruppenvergleich fanden sich keine signifikanten Unterschiede, interessanterweise zeigten Nichtallergiker (Median 19,0 %) tendenziell höhere Werte als Allergiker (Median 10,5 %). Auf mukosalen B-Lymphozyten konnten bezüglich der mIgE-Expression in beiden Gruppen höhere Werte als im Blut gemessen werden ( $p_{NA}=0,011$ ).



#### 4.3.2.2 Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf CD20-positiven B-Lymphozyten

Die in Abbildung 9 dargestellte Expression von CD80 und CD86 zeigte in beiden untersuchten Kompartimenten, d.h. peripheres Blut versus Nasenschleimhaut, keine deutlichen Gruppenunterschiede.



**Abbildung 9 Expression von CD80 [A] und CD86 [B] auf CD20-positiven B-Lymphozyten**

Darstellung der CD80/CD86 Expression auf mukosalen und peripheren B-Lymphozyten, Vergleich der Gruppen Nichtallergiker und Allergiker, Angabe in Prozent der CD20-positiven Zellen

Im Vergleich konnten auf CD20-positiven B-Lymphozyten des Blutes sowohl in der Gruppe der Allergiker (Median 18,5 %) als auch der Nichtallergiker (Median 16,6 %) für die CD80-Expression höhere Werte als für die CD86-Expression (Median A/NA 1,1 %) ermittelt werden. Auch die CD80- sowie CD86-Expression auf mukosalen B-Lymphozyten war in beiden Gruppen vergleichbar (CD80 Median A 4,0 %; NA 4,2 % und CD86 Median A 6,4%; NA 5,0%). CD80 war in beiden Gruppen auf peripheren B-Lymphozyten im Vergleich zur Nasenschleimhaut signifikant höher exprimiert ( $p_{NA}=0,012$ ;  $p_A=0,028$ ), während CD86 in beiden Gruppen signifikant stärker auf B-Lymphozyten der Nasenschleimhaut exprimiert wurde ( $p_{NA}=0,017$ ;  $p_A=0,028$ ).

### 4.4 Einfluss von apathogenen *E. coli* Nissle 1917 auf die peripheren lymphozytären Zellen

#### 4.4.1 Auswertung des WST-Assays und der Dosis-Zeit-Kinetiken

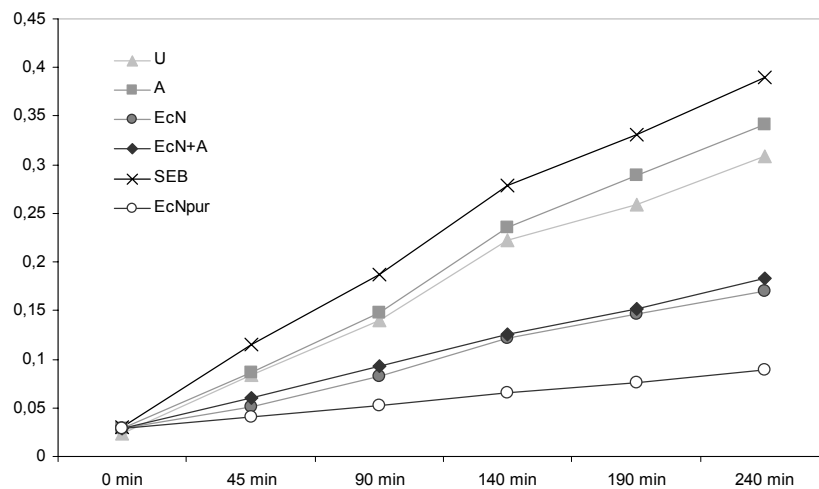
Die Dosis-Wirkungsuntersuchungen ergaben eine Zunahme der B-Zell-Aktivierung mit zunehmender Bakterienkonzentration (CD23: [U] 1,55 %; [EcN]<sub>4:1</sub> 6,3 %; [EcN]<sub>1:1</sub> 9,1 %), wohingegen die CD69 Expression auf CD4 T-Lymphozyten ab einer Konzentration von 1:1 (EcN-PBMC Ratio) eine Zunahme zeigte ( [U] 1,5 %; [EcN]<sub>1:1</sub> 2 %; [EcN]<sub>1:2</sub> 0,5%).

Die Zeitreihenanalyse zeigte nach Stimulation mit *E. coli* und Allergen hohe T-Zellaktivierung nach 24 Stunden (CD69: 6h 10,3 %; 24h 15,1 %; 48h 9,15 %), bei B-Lymphozyten fand sich die maximale CD86-Aktivierung bereits nach 18 Stunden Inkubation mit EcN und Allergen (CD86: 6h 9,8 %, 18h 29,1 %, 24h 23,5 %).

Die intrazelluläre Bestimmung von IL-4 und IFN- $\gamma$  ergab optimale Werte nach 16 Stunden Stimulationszeit mit EcN und Allergen (IL-4: 4h 0,04 %; 6h 0,11 %; 10h 0,04 %, 16h 0,18 %; IFN- $\gamma$ : 4h 0,09 %; 6h 0,35 %; 10h 0,26 %, 16h 0,49 %).

In Bezug auf die Zellvitalität (siehe Abbildung 10) kam es durch Stimulation mit *E. coli* zu einer Reduktion der mitochondrialen Aktivität (240 min: OD<sub>[EcN]</sub> 0,17; OD<sub>[EcN+A]</sub> 0,18) verglichen mit der SEB- (240 min: OD<sub>[SEB]</sub> 0,39) und Allergenstimulation (240 min: OD<sub>[A]</sub> 0,34) sowie der unstimulierten Zellen (240 min: OD<sub>[U]</sub> 0,31). Die Inkubation von *E. coli* allein zeigte keinen Effekt auf die mitochondriale Aktivität, da hier keine Mitochondrien vorhanden sind (Negativkontrolle).

Entsprechend der Dosis-Wirkungsuntersuchungen und der Zeitreihenanalyse erfolgten alle Versuche mit einer 1:1 Ratio *E. coli* zu PBMCs bei einer Inkubationsdauer von 18 Stunden für die Oberflächenfärbung und 16 Stunden zur Intrazellulärmessung.

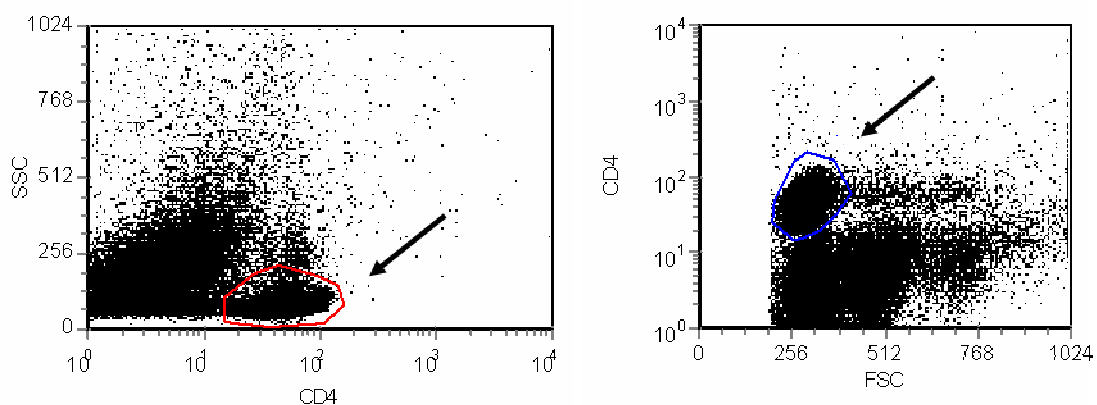


**Abbildung 10 Darstellung des WST-Assays**

Darstellung der photometrischen Messung (Mittelwerte) nach enzymatischer Umsetzung des WST-1 Reagenzes nach 0, 45, 90, 140, 190 und 240 min; Stimulation der PBMCs mit Allergen, SEB und EcN

#### 4.4.2 Oberflächenfärbung peripherer T-Lymphozyten

Nach 18-stündiger Inkubation der PBMCs mit Gräser- oder Birkenallergen, E. coli Nissle 1917 (EcN) bzw. einer Kombination von Allergen und EcN im Vergleich zu den Kontrollansätzen ohne Stimulus (unstimuliert) bzw. mit SEB wurden die Zellen zur Untersuchung der T-Lymphozyten mit CD4 angefärbt. Ausgehend von der so ermittelten Zellpopulation (siehe Abbildung 11) erfolgte die Untersuchung der CD69-, CD152- und CLA-Expression unter Stimulationsbedingungen.

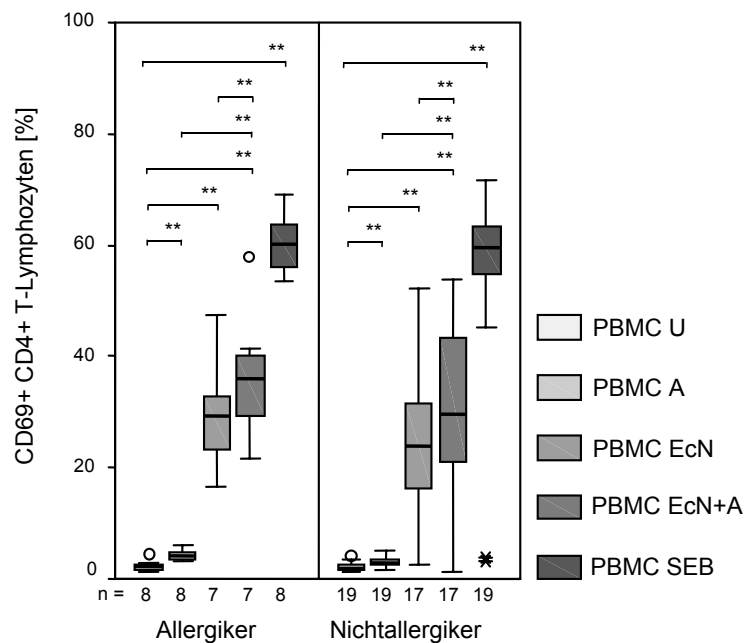


**Abbildung 11 Identifizierung der CD4-positiven T-Lymphozyten (→) im Scatter-Plot**

### 4.4.2.1 Expression von CD69 unter Stimulationsbedingungen

Die Inkubation der PBMCs mit SEB führte in beiden Gruppen zu einer signifikanten Heraufregulation von CD69 auf T-Lymphozyten im Vergleich zur unstimulierten Zellfraktion (Median [U] ca. 2 %;  $p_{NA}=0,00$ ;  $p_A=0,0004$ ). Die Werte für CD69 erreichten dabei in beiden Gruppen unter SEB-Stimulation einen Median von 60 % der CD4-positiven T-Lymphozyten.

Die Allergenstimulation bewirkte in beiden Gruppen ebenfalls eine signifikante Heraufregulation von CD69, in der Gruppe der Allergiker (Median 4,1 %) wurden höhere Werte als in der Gruppe der Nichtallergiker (Median 2,9 %) gemessen.



**Abbildung 12 Expression von CD69 auf CD4-positiven T-Lymphozyten unter Stimulationsbedingungen**

Darstellung der Expression auf peripheren T-Lymphozyten, Angabe der Stimulationen in der Legende, Vergleich der Gruppen Nichtallergiker und Allergiker, Angabe in Prozent der CD4-positiven Zellen  
 [\* Extremwerte, o Ausreißer, \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ]

Wie in Abbildung 12 dargestellt führte die Inkubation mit E. coli sowie E. coli und Allergen in Kombination zu einem signifikanten Anstieg der CD69-Expression auf CD4-positiven T-Lymphozyten. Dabei bewirkte die Kombination beider Stimulanzen signifikant höhere Werte als die alleinige Stimulation mit E. coli ( $p_{NA}=0,01$ ;  $p_A=0,004$ ) und mit Allergen ( $p=0,00$ ). In der Gruppe der Allergiker konnten im Vergleich zur

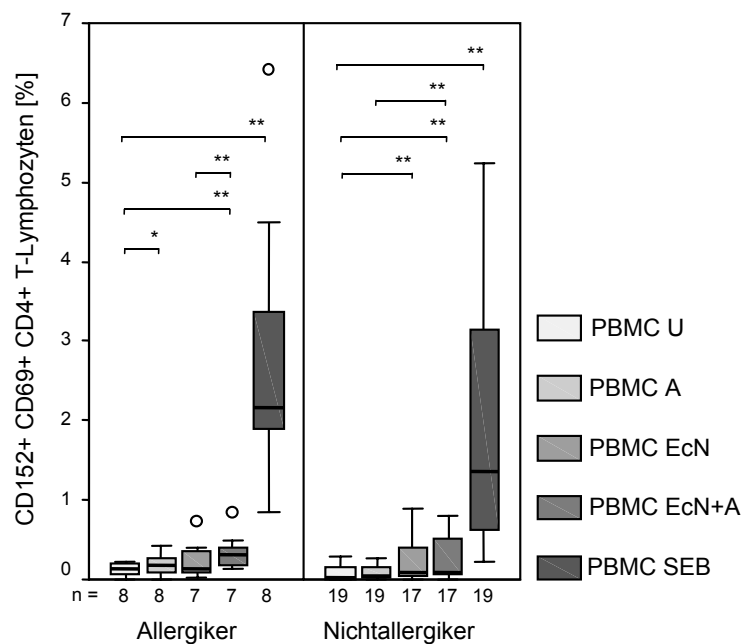
Gruppe der Nichtallergiker jeweils höhere Prozentzahlen ermittelt werden (Median  $[EcN]_{NA}$  23,8 %,  $[EcN]_A$  29,2 % sowie Median  $[EcN+A]_{NA}$  29,5 %,  $[EcN+A]_A$  36 % der CD4-positiven T-Lymphozyten).

#### 4.4.2.2 Expression von CD152 und CLA unter Stimulationsbedingungen

Die Untersuchung von CD152 auf CD4-positiven T-Lymphozyten nach Inkubation zeigte eine geringe Expression des Oberflächenmarkers. Lediglich die Stimulation mit SEB führte in beiden Gruppen zu einer signifikanten Heraufregulation im Vergleich zur unstimulierten Zellfraktion, dabei wurden ausgehend von einem Median von 0,6 % der CD-4-positiven Zellen im unstimulierten Zustand Werte von 3,5 % bei Nichtallergikern und 3,8 % bei Allergikern erreicht.

Weder die Inkubation mit Allergen noch mit *E. coli* führte zu einer signifikanten Veränderung der CTLA-4-Expression, die Mediane beider Gruppen lagen für diese Stimulationen in einem Bereich zwischen 0,6 % und 0,7 % der CD-4-positiven T-Lymphozyten. In der Gruppe der Nichtallergiker stieg die Expression von CD152 unter *E. coli*-Allergen-Stimulation im Median auf 1,0 % an (Daten nicht dargestellt).

Die in Abbildung 13 gezeigte Betrachtung der CD69-CD152 doppelt-positiven T-Lymphozyten ergab dagegen für die Inkubation mit Allergen in der Gruppe der Allergiker eine signifikante Erhöhung der doppelt-positiven Zellen, der Median stieg von [U] 0,1 % auf [A] 0,2 % der CD4-positiven Zellen ( $p_A=0,03$ ). Unter Stimulation mit *E. coli* konnte in der Gruppe der Nichtallergiker eine Zunahme der doppelt-positiven Zellen verzeichnet werden (Median  $[EcN]_{NA}$  0,1 % ;  $p_{NA}=0,0004$ ). Die Inkubation mit Allergen und *E. coli* zeigte dagegen in beiden Gruppen einen signifikanten Anstieg im Vergleich zur unstimulierten Zellfraktion (Median  $[EcN+A]_{NA}$  0,1 % ;  $p_{NA}=0,0001$ ;  $[EcN+A]_A$  0,3 % ;  $p_A=0,006$ ), in der Gruppe der Nichtallergiker auch im Vergleich zur Allergenstimulation ( $p_{NA}=0,001$ ).



**Abbildung 13 Expression von CD152 auf CD69-positiven T-Lymphozyten unter Stimulationsbedingungen**

Darstellung der Expression auf peripheren T-Lymphozyten, Angabe der Stimulationen in der Legende, Vergleich der Gruppen Nichtallergiker und Allergiker, Angabe in Prozent der CD4-positiven Zellen [⊛ Extremwerte, ○ Ausreißer, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ]

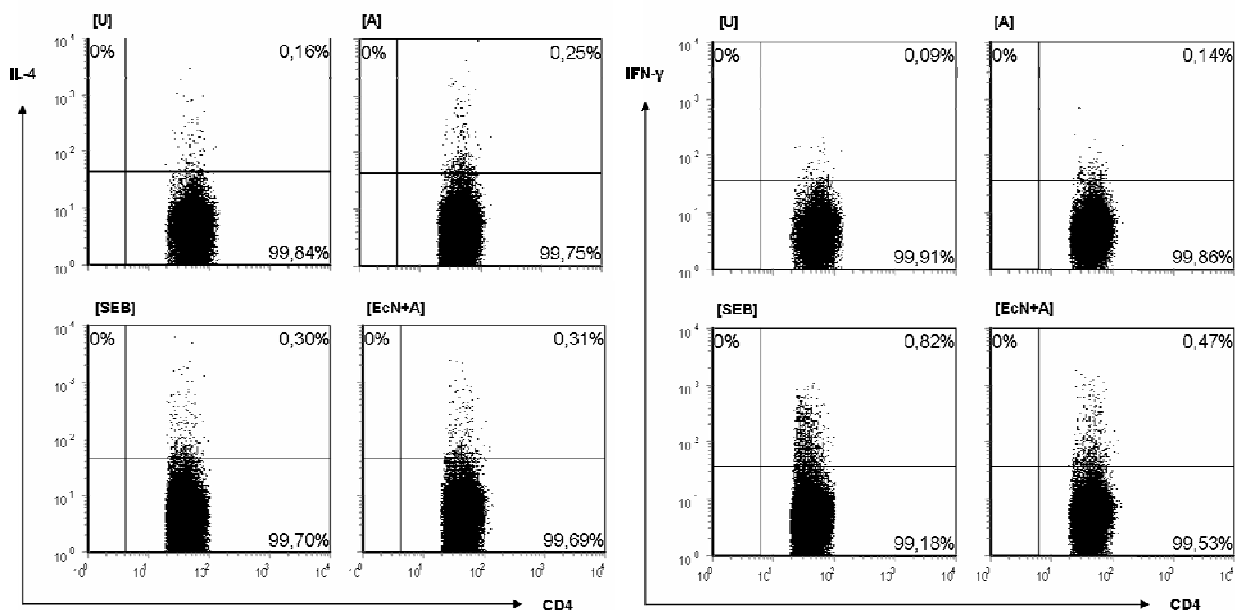
Interessanterweise konnte in der Gruppe der Allergiker eine signifikante Zunahme der doppelt positiven CD4-Zellen durch Allergenzugabe zur E. coli-Stimulation erzielt werden (Median [EcN]<sub>A</sub> 0,14 %;  $p_A = 0,04$ ). Hier verdoppelte sich auch die von CD152-Expression auf den CD69-positiven Zellen. Die SEB-Stimulation führte zu einer signifikanten Zunahme der CD152-Expression (Median [SEB]<sub>NA</sub> 1,4 %;  $p_{NA} = 0,00$ ; [SEB]<sub>A</sub> 2,2 %;  $p_A = 0,001$ ).

Die nach Inkubation ermittelten Daten zur CLA-Expression auf peripheren T-Lymphozyten zeigen wie bereits bei den basalen Bestimmungen geringe Fallzahlen. Die für die CLA-Expression im unstimulierten Zustand ermittelten Mediane (Nichtallergiker 11,0 %, Allergiker 12,0 %) lagen in beiden Gruppen höher als nach Stimulation, einzig durch Inkubation mit E. coli konnte eine geringfügige Erhöhung erzielt werden. Die Stimulation der peripheren T-Lymphozyten mit SEB zeigte einen

signifikanten Abfall der CLA-Expression gegenüber dem unstimuliert gemessenen Wert ( $p_A=0,043$ ; Daten nicht dargestellt).

#### 4.4.3 Intrazelluläre Färbung peripherer T-Lymphozyten

Zur Untersuchung der Zytokinmuster der T-Lymphozyten wurden die Zellen nach 16-stündiger Inkubation mittels CD4-Färbung charakterisiert und der Aktivierungszustand durch Messung der oberflächlichen CD69-Expression bestimmt. Die Zytokinbestimmung erfolgte ebenfalls durchflusszytometrisch durch intrazelluläre Färbung mit IL-4 und IFN- $\gamma$  (siehe Abbildung 14). Aufgrund der geringen Frequenzen der mukosalen T-Lymphozyten konnte die Bestimmung nur auf peripheren T-Lymphozyten erfolgen.



**Abbildung 14 Exemplarisches Beispiel der durchflusszytometrischen Bestimmung der Produktion der Zytokine IL-4 und IFN- $\gamma$  nach Stimulation mit Allergen [A], und E. coli Nissle plus Allergen [EcN+A], SEB und unstimuliert [U]**

##### 4.4.3.1 Oberflächliche CD69-Expression nach 16-stündiger Inkubation

Die Bestimmung der CD69-Expression auf CD4-positiven T-Lymphozyten nach 16 Stunden stellte sich vergleichbar zur Messung nach 18 Stunden dar und ist bereits in Kapitel 4.4.2.1 beschrieben worden.

Abgesehen von den Werten nach SEB-Stimulation lag nach 16 Stunden die Expression von CD69 jedoch in einem geringeren Bereich. Die stimulationsbedingten

Veränderungen der CD69-Expression zeigten aber die bereits zuvor erläuterten Tendenzen.

### 4.4.3.2 IL-4-Produktion peripherer T-Lymphozyten nach Inkubation

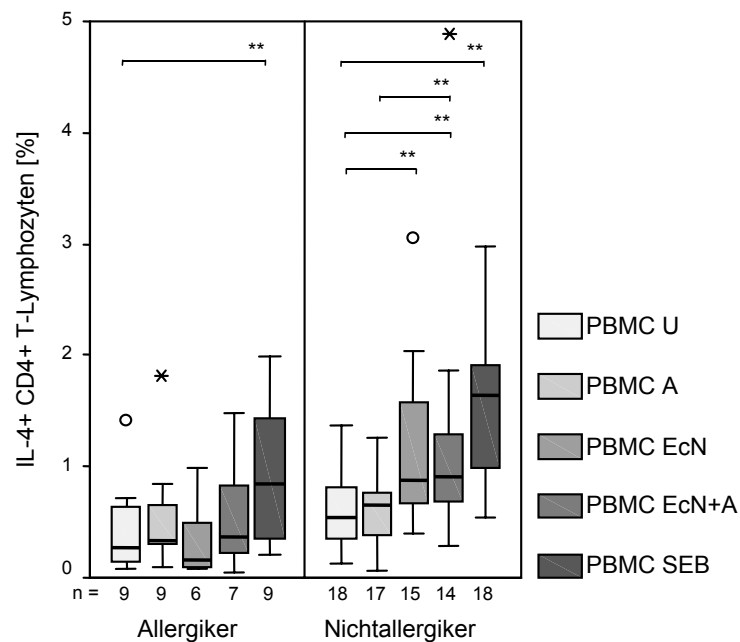
Die in Abbildung 15 dargestellte intrazelluläre Untersuchung der T-Lymphozyten bezüglich ihrer IL-4-Produktion zeigte, dass sich insgesamt weniger als 2 % IL-4-Positive unter den CD4-exprimierenden T-Zellen fanden.

Die Anzahl von IL-4-positiven T-Lymphozyten ließ sich in beiden Gruppen durch Stimulation mit SEB im Vergleich zum unstimulierten Zustand signifikant steigern (Median  $[SEB]_A$  0,84 %;  $p_A=0,0003$ ;  $[SEB]_{NA}$  1,64 %;  $p_{NA}=0,00$ ).

Bei der Inkubation mit Allergen zeigte weder die Gruppe der Allergiker noch die der Nichtallergiker signifikante Veränderungen, die Produktion von IL-4 stieg in beiden Gruppen um etwa 20% des unstimuliert gemessenen Wertes (Median  $[U]_{NA}$  0,55 %,  $[U]_A$  0,27 %;  $[A]_{NA}$  0,66 %,  $[A]_A$  0,34 % der CD4-positiven T-Lymphozyten).

In der Gruppe der Nichtallergiker führte die Inkubation mit E. coli zu einer signifikanten Erhöhung IL-4 positiver Zellen im Vergleich zur unstimulierten Zellfraktion (Median  $[EcN]_{NA}$  0,88 %;  $p_{NA}=0,0001$ ); mit E. coli und Allergen konnte ein signifikanter Anstieg im Vergleich zu unstimulierten und Allergen-stimulierten Zellen nachgewiesen werden ( $[EcN+A]_{NA}$  0,91 %;  $p_{[U-EcN]}=0,003$ ;  $p_{[A-EcN]}=0,0001$ ). Die Gruppe der Allergiker zeigte hingegen nach Stimulation mit E. coli eine Reduktion der IL-4-Produktion (Median  $[EcN]_A$  0,17 %;  $[EcN+A]_A$  0,37 %).





**Abbildung 15 Nachweis von intrazellulärem IL-4 bei CD4-positiven T-Lymphozyten unter Stimulationsbedingungen**

Darstellung der Expression auf peripheren T-Lymphozyten, Angabe der Stimulationen in der Legende, Vergleich der Gruppen Nichtallergiker und Allergiker, Angabe in Prozent der CD4-positiven Zellen [✱ Extremwerte, o Ausreißer, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ]

Bei der Untersuchung CD69-positiver Zellen hinsichtlich ihrer IL-4-Produktion (Daten nicht dargestellt) lag in der Gruppe der Nichtallergiker die Anzahl doppelt-positiver Zellen im unstimulierten Zustand und unter Allergenstimulation unterhalb der Nachweisgrenze.

Die Messung der IL-4-positiven aktivierten T-Lymphozyten nach SEB-Stimulation ergab in beiden Gruppen einen signifikanten Anstieg im Vergleich zum unstimuliert gemessenen Wert ( $p_{NA} = 0,00$ ;  $p_A = 0,0001$ ).

Die Inkubation der PBMCs mit E. coli sowie E. coli und Allergen bewirkte in beiden Gruppen eine signifikante Zunahme IL-4-positiver aktivierter T-Lymphozyten ( $p_{NA[U-EcN]} = 0,00$ ;  $p_{A[U-EcN]} = 0,01$ ;  $p_{[U-EcN+A]} = 0,00$ ), die Zweifachstimulation mit E. coli und Allergen erhöhte die Zahl der IL-4-produzierenden CD69-positiven T-Lymphozyten nochmals signifikant gegenüber den Einzelstimulationen mit E. coli bzw. Allergen ( $p_{NA[EcN-EcN+A]} = 0,02$ ;  $p_{A[EcN-EcN+A]} = 0,00$ ).

4.4.3.3 IFN- $\gamma$ -Produktion peripherer T-Lymphozyten nach Inkubation

In Abbildung 16 ist die Produktion von IFN- $\gamma$  durch periphere T-Lymphozyten unter Stimulationsbedingungen dargestellt. In den Untersuchungen zeigte sich eine im Vergleich zum unstimulierten Zustand (Median [U]<sub>NA</sub> 0,31 %, [U]<sub>A</sub> 0,10 %) signifikant erhöhte Anzahl der IFN- $\gamma$ -produzierenden T-Lymphozyten nach Inkubation mit SEB (Median [SEB]<sub>NA</sub> 2,92 %; [SEB]<sub>A</sub> 1,73 %; p=0,00) sowie mit E. coli und Allergen in Kombination (Median [EcN+A]<sub>NA</sub> 0,80 %; [EcN+A]<sub>A</sub> 0,57 %; p<sub>NA</sub>=0,00; p<sub>A</sub>=0,004). Dieses Muster war in beiden Gruppen nachweisbar.

Die Stimulation mit Allergen hingegen verursachte keine relevanten Veränderungen der IFN- $\gamma$ -Produktion bei T-Lymphozyten (Median [A]<sub>NA</sub> 0,43 %; [A]<sub>A</sub> 0,16 %). Bei Inkubation der Lymphozyten mit E. coli hingegen konnte nur in der Gruppe der Nichtallergiker ein signifikanter Anstieg gegenüber dem unstimulierten Wert nachgewiesen werden (Median [EcN]<sub>NA</sub> 0,70 %; [EcN]<sub>A</sub> 0,14 %; p<sub>NA</sub>=0,00). Nur die Allergikergruppe zeigte zwischen den Stimulationen E. coli und E. coli plus Allergen einen signifikanten Unterschied (p<sub>A</sub>=0,005).

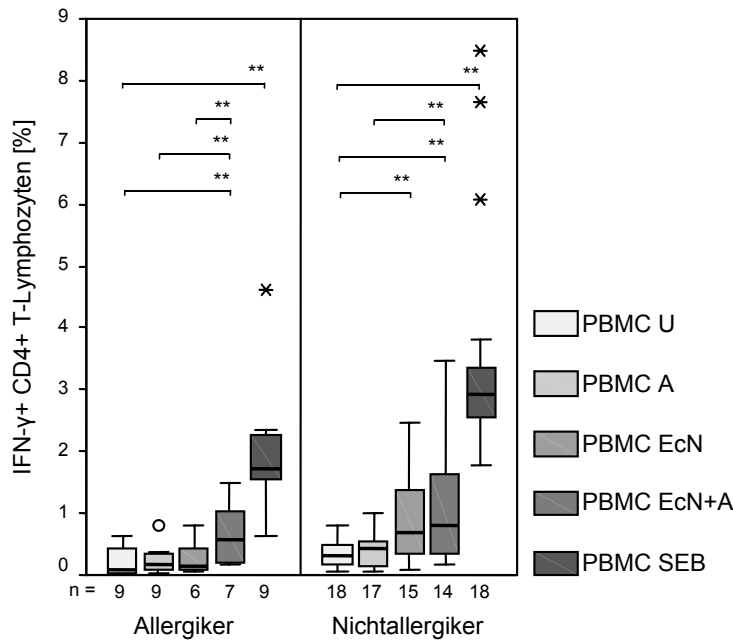


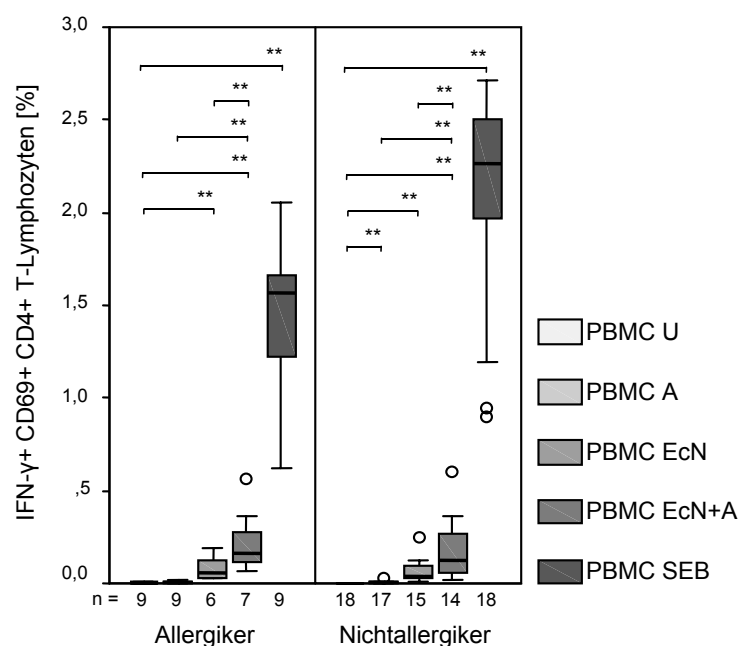
Abbildung 16 Nachweis von intrazellulärem IFN- $\gamma$  bei CD4-positiven T-Lymphozyten unter Stimulationsbedingungen

Darstellung der Expression auf peripheren T-Lymphozyten, Angabe der Stimulationen in der Legende, Vergleich der Gruppen Nichtallergiker und Allergiker, Angabe in Prozent der CD4-positiven Zellen [⊛ Extremwerte, ⊛ Ausreißer, \* p<0,05; \*\* p<0,01]

Unter den CD69-positiven T-Lymphozyten war im unstimulierten Zustand kein IFN- $\gamma$ -Nachweis möglich. Allein in der Gruppe der Nichtallergiker führte die Stimulation mit Allergen zu einem signifikanten Anstieg der doppelt positiven Zellen ( $p_{NA}=0,01$ ).

Abbildung 17 zeigt weiterhin einen deutlichen Anstieg der doppelt-positiven T-Lymphozyten nach Stimulation mit SEB, E. coli und Allergen/E. coli im Vergleich zu unstimulierten Zellen in beiden Gruppen ( $p=0,00$ ). Ein signifikanter Anstieg war ebenfalls unter Inkubation mit E. coli/Allergen gegenüber der Allergenstimulation zu beobachten ( $p=0,00$ ).

Anders als die IFN- $\gamma$ -positive T-Zellen insgesamt zeigten die aktivierten T-Lymphozyten im Vergleich zur E. coli-Stimulation eine signifikant erhöhte Anzahl IFN- $\gamma$ -produzierender Zellen nach Inkubation mit E. coli plus Allergen in beiden Gruppen ( $p=0,00$ ).



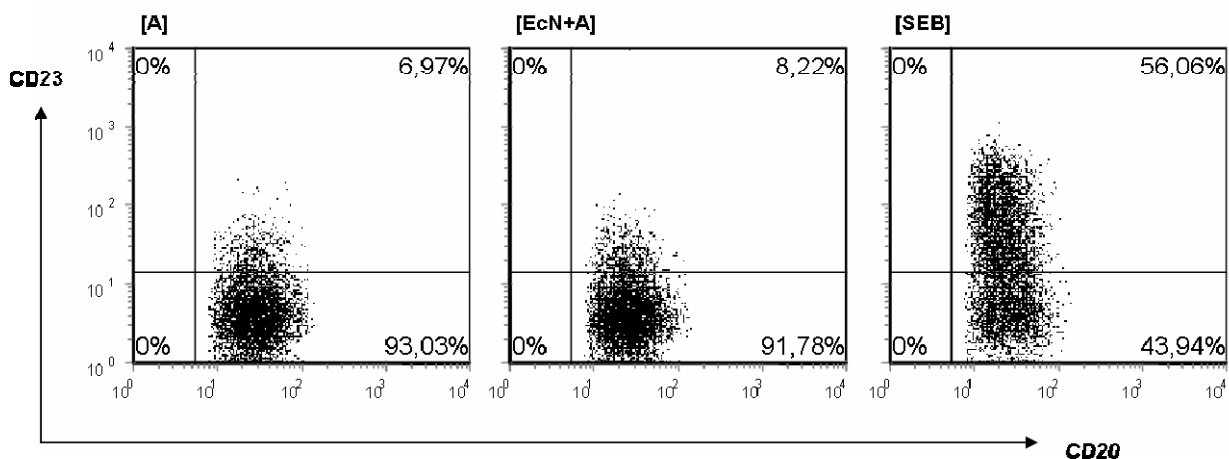
**Abbildung 17 Nachweis von intrazellulärem IFN- $\gamma$  bei CD69-positiven T-Lymphozyten unter Stimulationsbedingungen**

Darstellung der Expression auf peripheren T-Lymphozyten, Angabe der Stimulationen in der Legende, Vergleich der Gruppen Nichtallergiker und Allergiker, Angabe in Prozent der CD4-positiven Zellen [✱ Extremwerte, o Ausreißer, \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ]

### 4.4.4 Oberflächenfärbung peripherer B-Lymphozyten

Nach Inkubation wurden die B-Lymphozyten mittels CD20-Färbung identifiziert und dann hinsichtlich der Expression von CD23 (siehe Abbildung 18) sowie der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 (siehe Abbildung 20) untersucht.

#### 4.4.4.1 Expression von CD23 unter Stimulationsbedingungen



**Abbildung 18 Exemplarisches Beispiel der durchflusszytometrischen Bestimmung von CD23 auf CD20+ B-Lymphozyten nach Stimulation mit Allergen [A], und E. coli Nissle plus Allergen [EcN+A] und SEB**

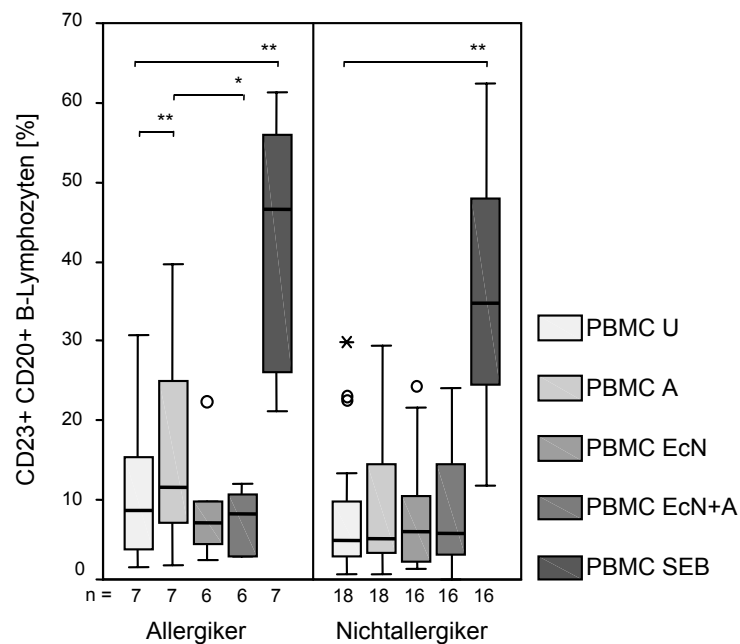
Die in Abbildung 19 dargestellte Expression von CD23 unter Stimulationsbedingungen zeigte große interindividuelle Schwankungen, besonders in der Gruppe der Allergiker auf unstimulierten Zellen (1,5 – 30,7 %, Median [U]<sub>A</sub> 8,7 %; [U]<sub>NA</sub> 5,0 %) sowie in beiden Gruppen nach Inkubation mit Allergen und SEB (um 25 - 55 %).

Die Stimulation mit SEB ergab in beiden Gruppen einen signifikanten Anstieg der CD23-Expression im Vergleich zu den unstimulierten Werten (Median [SEB]<sub>NA</sub> 34,9 %; [SEB]<sub>A</sub> 46,6 %; p=0,00).

Anders als die Gruppe der Nichtallergiker zeigte die Gruppe der Allergiker eine signifikante Erhöhung der CD23-Expression nach Allergenstimulation (Median [A]<sub>A</sub> 11,6 %; [A]<sub>NA</sub> 5,1 %; p<sub>A</sub>=0,008).

Die Inkubation der B-Lymphozyten mit E. coli bewirkte in beiden Gruppen keine relevanten Veränderungen bezogen auf die unstimuliert gemessenen Werte, es zeigte sich ein geringer Anstieg in der Nichtallergiker-Gruppe (Median [EcN]<sub>NA</sub> 6,0 %) und ein

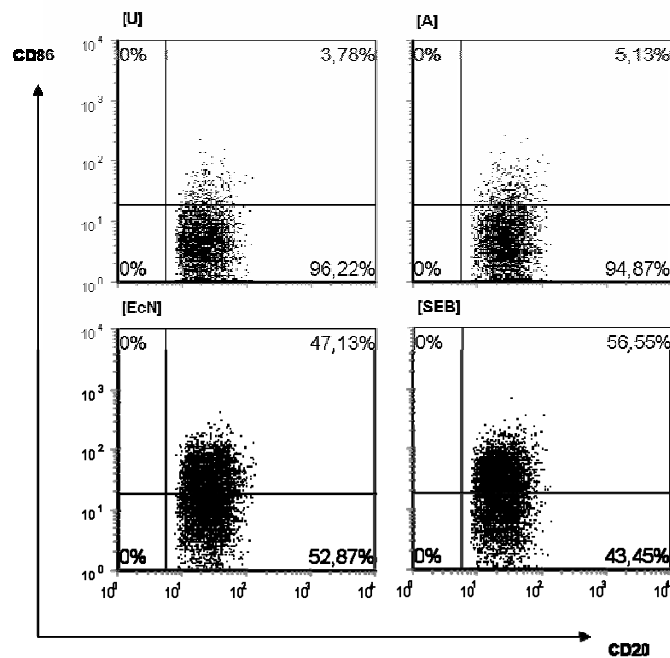
geringer Abfall in der Allergiker-Gruppe (Median  $[EcN]_A$  7,2 %). Verglichen mit den Werten nach Allergen-Stimulation kam es bei den Allergikern nach Inkubation mit Allergen und E. coli zu einem signifikanten Abfall (Median  $[EcN+A]_{NA}$  5,7 %;  $[EcN+A]_A$  8,2 %;  $p_A=0,03$ ). B-Zellen der Nichtallergiker zeigten somit eine vergleichbare Expression des niedrigaffinen IgE-Rezeptors nach Stimulation mit Allergen, E. coli oder der Kombination.



**Abbildung 19 Expression von CD23 auf CD20-positiven B-Lymphozyten unter Stimulationsbedingungen**

Darstellung der Expression auf peripheren B-Lymphozyten, Angabe der Stimulationen in der Legende, Vergleich der Gruppen Nichtallergiker und Allergiker, Angabe in Prozent der CD20-positiven Zellen [✱ Extremwerte, ○ Ausreißer, \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ]

#### 4.4.4.2 Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 unter Stimulationsbedingungen



**Abbildung 20 Exemplarisches Beispiel der durchflusszytometrischen Bestimmung von CD86 auf CD20+ B-Lymphozyten nach Stimulation mit Allergen [A], und E. coli Nissle [EcN], SEB und unstimuliert [U]**

Abbildung 21A stellt die Expression von CD80 auf peripheren B-Lymphozyten dar, die große interindividuelle Schwankungen zeigt.

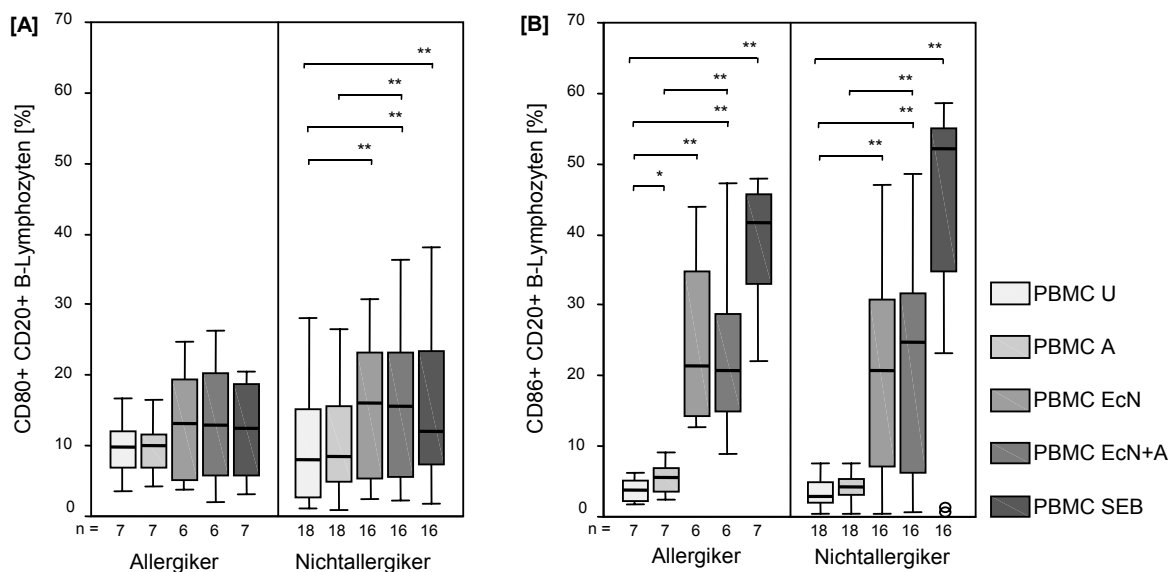
In der Gruppe der Nichtallergiker konnte im Vergleich zum unstimulierten Wert (Median [U]<sub>NA</sub> 7,9 %) eine signifikante Heraufregulation von CD80 auf den B-Lymphozyten nach Stimulation mit SEB (Median [SEB]<sub>NA</sub> 12,1 %), E. coli (Median [EcN]<sub>NA</sub> 16,0 %) sowie der Kombination E. coli/Allergen (Median [EcN+A]<sub>NA</sub> 15,6 %) gemessen werden ( $p_{[U-SEB]}=0,00001$ ;  $p_{[U-EcN]}=0,0004$ ;  $p_{[U-EcN+A]}=0,00003$ ).

In der Gruppe der Allergiker waren keine relevanten Unterschiede zwischen den Stimulationen messbar (Median [U]<sub>A</sub> 9,8 %; [A]<sub>A</sub> 10,0 %; [EcN]<sub>A</sub> 13,2 %; [EcN+A]<sub>A</sub> 13,0 %; [SEB]<sub>A</sub> 12,4 %).

Die CD86-Expression (siehe Abbildung 21B) wies vergleichbare Tendenzen in der Gruppe der Allergiker und Nichtallergiker auf. Im Unterschied zu CD80 zeigten hier beide Gruppen eine signifikante Erhöhung der CD86-Expression nach Inkubation mit SEB (Median [SEB]<sub>NA</sub> 52,1 %; [SEB]<sub>A</sub> 41,7 %), E. coli (Median [EcN]<sub>NA</sub> 20,7 %; [EcN]<sub>A</sub> 21,5 %) sowie E. coli-Allergen-Kostimulation (Median [EcN+A]<sub>NA</sub> 24,8 %; [EcN+A]<sub>A</sub> 20,7

%) verglichen mit den Werten der unstimulierten Zellen (Median  $[U]_{NA}$  2,8 %;  $[U]_A$  3,8 %;  $p=0,00$ ) sowie im Vergleich von Allergen- mit Allergen-E. coli-Stimulation ( $p_{NA}=0,00$ ,  $p_A=00002$ ).

Nach Allergenstimulation zeigte nur die Gruppe der Allergiker eine signifikante Heraufregulation von CD86 (Median  $[A]_{NA}$  4,2 %;  $[A]_A$  5,6 %;  $p=0,03$ ).



**Abbildung 21 Expression von CD80 [A] und CD86 [B] auf CD20-positiven B-Lymphozyten unter Stimulationsbedingungen**

Darstellung der Expression auf peripheren B-Lymphozyten, Angabe der Stimulationen in der Legende, Vergleich der Gruppen Nichtallergiker und Allergiker, Angabe in Prozent der CD20-positiven Zellen [✱ Extremwerte, ○ Ausreißer, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ]

Bei der Betrachtung der CD80-exprimierenden CD23-positiven Zellen konnte in beiden Gruppen unter SEB- und E. coli-Stimulation eine signifikante Zunahme der doppelt-positiven B-Lymphozyten ermittelt werden ( $p_{[U-SEB]}=0,00$ ;  $p_{NA[U-EcN]}=0,001$ ;  $p_{A[U-EcN]}=0,02$ ).

Für die Gruppe der Nichtallergiker wurde auch nach Inkubation mit E. coli und Allergen eine signifikante Erhöhung der doppelt-positiven B-Lymphozyten nachgewiesen ( $p_{[U-EcN+A]}=0,002$ ;  $p_{[A-EcN+A]}=0,03$ ). Die Allergikergruppe zeigte hingegen eine signifikante Reduktion der doppelt-positiven Zellen sowohl nach Einzelstimulation mit E. coli als auch nach Kostimulation ( $p_{EcN+A}=0,045$ ).

### 4.5 Einfluss der Stimulation auf die Funktion der lymphozytären Zellen aus der Nasenschleimhaut

#### 4.5.1 Stimulation mukosaler T-Lymphozyten

Die phänotypische Untersuchung der CD4-positiven T-Lymphozyten aus der Nasenschleimhaut (siehe Abbildung 22) erfolgte wie bei den T-Zellen des peripheren Blutes in Bezug auf CD69-, CD152- und CLA-Expression nach Stimulation mit Allergenen, EcN, und SEB und ist in Tabelle 1 dargestellt.

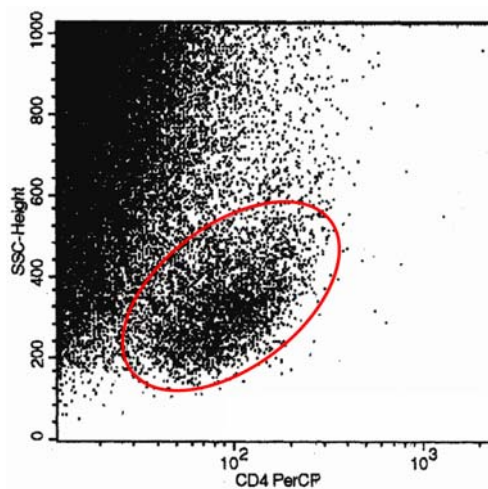


Abbildung 22 Identifizierung der mukosalen CD4-positiven T-Lymphozyten im Scatter-Plot

##### 4.5.1.1 Mukosale Expression von CD69

Die Expression von CD69 auf mukosalen T-Lymphozyten zeigt sehr starke interindividuelle Schwankungen. Die hohe Expression von CD69, die bereits im Ausgangswert deutlich wurde, fand sich in allen Stimulationen wieder. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Stimulationen war lediglich in der Gruppe der Allergiker zwischen E. coli/Allergen und E. coli allein messbar ( $p=0,03$ ; siehe Tabelle 1).

##### 4.5.1.2 Mukosale Expression von CD152

Die Messung der CD152-Expression auf mukosalen CD4-positiven T-Lymphozyten zeigte, verglichen mit den Nichtallergikern im unstimulierten Zustand eine höhere Expression in der Gruppe der Allergiker. Nach Stimulation mit SEB und E. coli stieg die Expression von CTLA-4 signifikant in der Gruppe der Nichtallergiker ( $p_{[U-SEB]}=0,00004$ ;



$p_{[U-EcN]}=0,006$ ). Die Inkubation mit E. coli und Allergen in Kombination führte im Gegensatz zu der Gruppe der Nichtallergiker zu einer signifikanten Reduktion der Expression im Vergleich zu den unstimulierten Werten ( $p=0,008$ ).

In beiden Gruppen lag die CD152-Expression nach Inkubation mit E. coli und Allergen unterhalb der Werte nach Stimulation mit E. coli und Allergen allein ( $p_{NA[EcN-EcN+A]}=0,0002$ ). Die geschilderten Zusammenhänge sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

		U	A	EcN	EcN+A	SEB
CD69	A	52,8 ± 21,1	54,6 ± 20,7	52,7 ± 24,6	55,7 ± 25,4	55,0 ± 20,0
	NA	38,6 ± 21,4	38,3 ± 23,8	44,4 ± 16,2	45,9 ± 22,8	40,5 ± 22,4
CD152	A	6,6 ± 4,9	6,0 ± 5,5	4,5 ± 4,0	3,2 ± 3,1	6,4 ± 3,3
	NA	3,9 ± 4,3	4,1 ± 4,6	5,5 ± 3,6	2,7 ± 1,9	6,4 ± 5,3
CLA	A	7,7 ± 4,5	7,4 ± 4,9	7,7 ± 5,4	6,0 ± 7,1	6,7 ± 4,9
	NA	4,7 ± 4,9	4,8 ± 3,7	7,5 ± 4,2	3,6 ± 3,5	5,0 ± 3,5

**Tabelle 1 Expression von CD69, CD152 und CLA bei Allergikern (A) und Nichtallergikern (NA) in Prozent der CD4 positiven Zellen, Angabe von Mittelwert und Standardabweichung**

#### 4.5.1.3 Mukosale Expression von CLA

Die CLA-Expression auf mukosalen T-Lymphozyten zeigte in der Gruppe der Allergiker insgesamt höhere Werte als in der Gruppe der Nichtallergiker. Allein in der Nichtallergikergruppe kam es zu einem deutlichen Anstieg der CLA-Expression unter Stimulation mit E. coli ( $p=0,043$ ).

#### 4.5.2 Stimulation mukosaler B-Lymphozyten

Die Untersuchung der CD20-positiven B-Lymphozyten erfolgte auch hier im Vergleich zu peripheren B-Zellen in Bezug auf die Expression von CD23 (FcεRII) sowie der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86.

##### 4.5.2.1 Mukosale Expression von CD23

Die CD23-Expression auf mukosalen B-Lymphozyten nahm in der Gruppe der Allergiker im Vergleich zum unstimulierten Zustand nach Inkubation mit SEB ( $p=0,02$ ), E. coli

## Ergebnisse

( $p=0,003$ ) sowie E. coli und Allergen ( $p=0,02$ ) signifikant zu. Die zuvor genannten Stimulationen wiesen jedoch große interindividuelle Schwankungen auf.

Der Vergleich zwischen Allergen mit E. coli plus Allergen Kostimulation zeigte in beiden Gruppen ein gegensätzliches Verhalten, in der Nichtallergikergruppe kam es zu einer Reduktion der CD23-Expression, in der Allergiker-Gruppe zu einer Zunahme. Die Einzelwertzusammenfassungen sind in Tabelle 2 dargestellt.

		U	A	EcN	EcN+A	SEB
CD23	A	8,1 ± 4,5	10,5 ± 2,5	14,2 ± 7,6	17,0 ± 11,3	17,8 ± 8,2
	NA	8,3 ± 6,7	8,7 ± 5,6	10,9 ± 7,2	5,8 ± 2,5	12,1 ± 5,1
CD80	A	9,3 ± 3,9	7,5 ± 3,8	12,5 ± 5,8	12,6 ± 11,1	6,9 ± 5,0
	NA	9,7 ± 5,2	7,7 ± 3,9	11,1 ± 6,0	11,2 ± 1,6	10,0 ± 5,1
CD86	A	15,2 ± 17,0	3,9 ± 2,4	9,4 ± 3,7	9,1 ± 5,6	8,0 ± 4,0
	NA	8,0 ± 7,6	7,1 ± 4,4	9,0 ± 5,2	11,3 ± 2,2	7,6 ± 5,8

**Tabelle 2 Expression von CD23, CD80 und CD86 bei Allergikern (A) und Nichtallergikern (NA) in Prozent der CD20 positiven Zellen, Angabe von Mittelwert und Standardabweichung**

### 4.5.2.2 Mukosale Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86

Die Expression von CD80 und CD86 auf CD20-positiven B-Lymphozyten der Nasenschleimhaut zeigt Tabelle 2.

Nach Stimulation mit Allergen wurde eine Reduktion der CD80-Expression im Vergleich zum unstimulierten Zustand beobachtet, die in beiden Gruppen nachweisbar war.

Die Inkubation mit SEB führte in der Gruppe der Allergiker zu einer Abnahme der CD80-Expression, die Nichtallergiker zeigten trotz großer Schwankungsbreite eine leichte Zunahme der CD80-Expression. Der Vergleich von E. coli-Stimulation mit der E. coli und Allergen Stimulation ergab in beiden Gruppen gleich bleibende Werte.

Die Expression von CD86 war in den Untersuchungsgruppen unterschiedlich. In der Gruppe der Allergiker führte die Inkubation mit Allergen zu einer signifikanten Abnahme der CD86-Expression im Vergleich zu den nicht stimulierten Ansätzen ( $p=0,01$ ), während bei den Nichtallergikern keine Veränderung auftrat.

In der Gruppe der Nichtallergiker zeigte sich nach Stimulation mit E. coli und Allergen ein signifikanter Anstieg der CD86-Expression ( $p_{[U-EcN+A]}=0,02$ ), während in der Allergikergruppe ein Abfall der CD86-Expression auftrat.

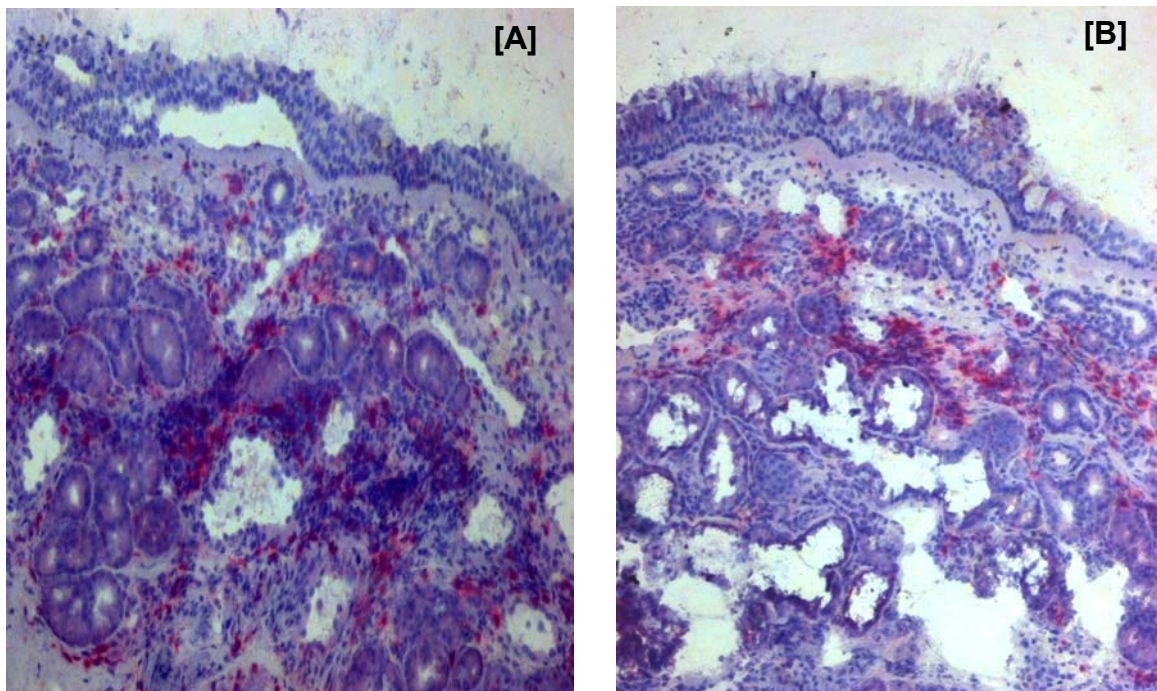
In beiden Gruppen konnte ein signifikanter Anstieg der CD86-Expression nach Inkubation mit E. coli und Allergen im Vergleich zur Allergen-Stimulation ermittelt werden ( $p_{NA}=0,048$ ;  $p_A=0.00005$ ).

Die Untersuchung CD23-CD80 doppelt-positiver B-Lymphozyten zeigte keine relevanten Unterschiede zwischen den Stimulationen. Die geschilderten Tendenzen für die CD80-Expression lassen sich auch für das Verhalten der doppelt-positiven B-Lymphozyten nachweisen. CD23 und CD86 doppelt-positiv B-Lymphozyten stellen in der Gruppe der Nichtallergiker einen sehr geringen Anteil der B-Lymphozyten (0 – 0,4 % der CD20-positiven Zellen).

In der Gruppe der Allergiker konnte dagegen eine Zunahme der doppelt-positiven Zellen nach Inkubation mit SEB (Median 0,7 %), E. coli (Median 0,9 %) sowie E. coli und Allergen (Median 1,5 %) ermittelt werden. Dabei kam es durch Stimulation mit E. coli und Allergen erneut zu einem Anstieg im Vergleich zur E. coli- und Allergen-Stimulation ( $p_{[A-EcN+A]}= 0,00$ ) (Daten nicht gezeigt).

### 4.6 Darstellung und Lokalisation der Lymphozyten in der Nasenschleimhaut

Die immunhistochemische Untersuchung der Nasenschleimhaut zeigt exemplarisch das Vorkommen der untersuchten Zellen, CD20-positiver B- und CD4-positiver T-Lymphozyten. Hier lässt sich eine unterschiedliche Verteilung der beiden Zellpopulationen darstellen.



**Abbildung 23 Exemplarisches Beispiel der immunhistochemischen Bestimmung der Lokalisation CD4 [A] und CD20 [B] positiven Lymphozyten in der Nasenschleimhaut**

Die B-Lymphozyten sind hauptsächlich im subepithelialen und submukosalen Bereich sowie im Bereich der Drüsenstrukturen und perivaskulär lokalisiert. Im Gegensatz hierzu finden sich die T-Lymphozyten vermehrt subepithelial sowie im Übergangsbereich zwischen Epithel und Submukosa und nur vereinzelt perivaskulär und periglandulär. Das Verhältnis von T- zu B-Lymphozyten ist deutlich zu Gunsten der T-Lymphozyten verschoben (10:1), was sich auch in den Frequenzen der CD20-positiven B-Lymphozyten bei der durchflusszytometrischen Analyse widerspiegelte.

## 5 Diskussion

### 5.1 Charakterisierung mukosaler und peripherer Lymphozyten – mukosale Lokalinflammation im Sinne einer Entopie?

Betrachtet man die dargestellten Ergebnisse zur Charakterisierung der Lymphozyten in Nasenschleimhaut und peripherem Blut, so ist die Diskussion von zwei Aspekten bedeutsam. Einerseits zeigen die Untersuchungen klare Unterscheidungsmerkmale im Phänotyp mukosaler und peripherer B- und T-Lymphozyten, andererseits finden sich für bestimmte Marker keine signifikanten phänotypischen Unterschiede zwischen allergischen und nichtallergischen Individuen. Dieses erscheint zunächst nicht plausibel. Die Auswahl der Allergiker erfolgte über den Nachweis von systemischem allergenspezifischen IgE und eines positiven Haut-Pricktests. Berücksichtigt man aber die Tatsache, dass alle ausgewählten Patienten eine Conchotomie aufgrund beeinträchtigter Nasenatmung mit z. T. bestehender rhinitischer Symptomatik erhielten, so muss die Frage diskutiert werden, ob die fehlende phänotypische Unterscheidung zwischen Allergikern und Nichtallergikern bei mukosalen Lymphozyten auch durch das Vorliegen einer lokalisierten mukosalen allergischen Inflammation erklärbar wäre. Dies hätte beispielsweise anhand eines nasalen Provokationstests bei Nichtallergikern verifiziert werden können.

Die in der Nasenschleimhaut nachweisbaren CD4-positiven T-Lymphozyten zeigen analog vorausgegangener Untersuchungen einen Gedächtniszell-Phänotyp [63]. Im Gegensatz zu einem ausgewogenen Verhältnis von CD45RA- und RO-positiven T-Lymphozyten im peripheren Blut dominiert mukosal der CD45RO-Phänotyp. Dies ist vergleichbar zu vorausgegangenen immunhistochemischen Untersuchungen [64]. Gedächtnis-T-Lymphozyten benötigen zur Aktivierung nur geringe Antigenstimuli und sind unabhängiger von kostimulatorischen Signalen als CD45RA-positive T-Zellen [65, 66]. Durch einen somit deutlich effizienteren Aktivierungsweg lässt sich die in der vorliegenden Untersuchung gemessene starke Expression des CD69-Oberflächenantigens erklären, das auf den mukosalen T-Lymphozyten signifikant vermehrt im Vergleich zu den peripheren T-Lymphozyten nachweisbar war. Der Aktivierungsgrad der T-Zellen ist jedoch nicht allein durch den CD45RO-Status erklärbar, da aus dem peripheren Blut isolierte CD45RO-positive T-Lymphozyten der gleichen Patientenauswahl keine vergleichbare Aktivierung zeigen. Bei den peripheren

T-Lymphozyten war diese verstärkte CD69-Expression nicht nachweisbar und es wurde bereits in früheren Untersuchungen gezeigt, dass der CD69-Aktivierungsstatus keinen Einfluss auf die Migrationsfähigkeit der T-Lymphozyten in die Nasenschleimhaut zu haben scheint. Vorausgegangene Untersuchungen zeigten, dass die Stärke der CD69-Expression keine Unterscheidung zwischen migrierenden und nicht-migrierenden Gedächtnis-T-Zellen erlaubt [67]. Vielmehr wird die Expression des CD69-Aktivierungsmarkers durch lokale Aktivierungsreize getriggert [68]. Dementsprechend konnte bei mukosalen T-Lymphozyten eine vermehrte CD69-Expression nachgewiesen werden.

Zu den für die T-Zell-Migration beschriebenen Faktoren zählt der T-Ligand des vaskulären Adhäsionsmoleküls E-Selektin, das *cutaneous lymphocyte antigen* (CLA). Eine Heraufregulation von E-Selektin auf dem Endothel kann durch Histamin auch in der Nasenschleimhaut auftreten [69]. Das für die Migration von Gedächtnis-T-Zellen in Entzündungsprozessen der Haut nachgewiesene CLA [20] spielt offenbar für die Migration in die nasale Mukosa eine untergeordnete Rolle, da sich in der vorliegenden Untersuchung auf mukosalen T-Lymphozyten eine geringe Expression von CLA zeigt, die unter den Werten der peripheren T-Zellen liegt. Hierfür spielen die eingeschränkte Bindungsfähigkeit von Selektinmolekülen für TH2-Lymphozyten und ihre Herunterregulation durch TH2-Zytokine eine wichtige Rolle [69]. Stattdessen konnten in vorausgegangenen Untersuchungen Liganden der TH2-spezifischen Chemokinrezeptoren CCR3 und CCR4 in der nasalen Mukosa von Patienten mit allergischer Rhinitis nachgewiesen werden [70, 71], die mit der Migration allergenspezifischer T-Lymphozyten in die Nasenschleimhaut assoziiert sind.

Die Interaktion über die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf B-Lymphozyten mit den T-lymphozytären Gegenspielern CD152 und CD28 ist für die Initiierung der T-Zell-abhängigen und somit auch der allergenspezifischen Immunantwort ein in vorausgegangenen Studien gut charakterisierter Faktor [72, 73]. In der vorliegenden Untersuchung wurden übereinstimmend mit der vorliegenden Literatur ähnlich hohe basale Expressionswerte von CD80 und CD152 auf Blut- und Nasenschleimhautzellen von Allergikern und Nichtallergikern gemessen [74]. Im Vergleich lag jedoch die Expression von CD152 in der Nasenschleimhaut signifikant über den auf peripheren Lymphozyten bestimmten Werten. Da das T-Zell-spezifische CTLA-4 hauptsächlich auf aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird [75] und als T-Zell-

aktivierungshemmender Regulationsfaktor wirkt [76, 77], lässt sich über den hohen Aktivierungsgrad der mukosalen T-Lymphozyten die starke CD152-Expression erklären. Im Gegensatz hierzu findet sich eine geringe CD86-abhängige Aktivierung der mukosalen, aber auch peripheren B-Lymphozyten bei Allergikern und Nichtallergikern. Die Heraufregulation von CD86 wird nach selektiver und antigenspezifischer Stimulation nachweisbar [25] und ist als kostimulatorischer Bindungspartner von CD28 für die allergenspezifische T-Zellproliferation und Zytokinexpression erforderlich [22].

Analog vorausgegangener Studien zeigt sich auf peripheren B-Lymphozyten von Allergikern eine höhere Expression des niedrigaffinen IgE-Rezeptors CD23 als bei Nichtallergikern [78]. Dieser IgE-abhängige und durch die allergietypischen IL-4/IFN- $\gamma$ -Imbalance beeinflusste Expressionsunterschied lässt sich im vorliegenden Versuch auf B-Lymphozyten der nasalen Mukosa nicht reproduzieren. Hier findet sich wie auch für die Expression membrangebundenen IgEs eine vergleichbare Verteilung beider Oberflächenmoleküle auf den mukosalen B-Lymphozyten bei Allergikern und Nichtallergikern.

Folgende Aspekte können in diesem Zusammenhang diskutiert werden. Einerseits fanden Davidsson et al. bei immunhistochemischen Untersuchungen, dass auf mukosalen B-Lymphozyten von Patienten mit allergischer Rhinitis die CD23-Expression nach Allergenstimulation reduziert wird. Dies lässt sich durch einen Switch der CD23-positiven B-Lymphozyten in Richtung Gedächtniszell-Phänotyp mit konsekutivem Verlust der CD23-Expression erklären [79]. Die nachgewiesene starke CD45RO-Expression auf mukosalen T-Lymphozyten in der vorliegenden Untersuchung weist indirekt auch auf eine stattgehabte Differenzierung der B-Lymphozyten in lokal IgE-produzierende Gedächtniszellen hin.

Andererseits könnte der fehlende Gruppenunterschied bezüglich der Expression der untersuchten Oberflächenmoleküle auch auf eine lokalisierte mukosale Allergieantwort bei fehlendem systemischen Nachweis atopischer Merkmale hindeuten. Hinzu kommt, dass sich in den gewonnenen Schleimhautproben der Kontrollgruppe zum Teil ausgeprägte lymphozytäre Infiltrate, vergleichbar mit denen der allergischen Gewebeproben, möglicherweise im Sinne aktivierter Gedächtnis-T-Lymphozyten und CD23- und IgE-positiver B-Lymphozyten nachweisen ließen.

Untersuchungen von Huggins et al. 1975 konnten bereits spezifische IgE-Antikörper im nasalen Sekret bei fehlendem systemischen Nachweis von spezifischem IgE messen

[80]. Zusätzlich war es durch nasale Allergenprovokationen möglich, bei Patienten mit „idiopathischer“ Rhinitis vergleichbare Reaktionen zu denen allergischer Rhinitiker zu ermitteln [81]. Letztendlich konnte bei immunhistochemischen Untersuchungen zur idiopathischen Rhinitis gezeigt werden, dass in der untersuchten nasalen Mukosa Infiltrate bestehend aus Mastzellen, Eosinophilen und IgE-positiven Zellen sowie bei 30% eine Bindung von Allergenen analog der allergischen Vergleichsgruppe nachweisbar waren [82, 83].

Die Auswahl der beschriebenen Untersuchungen zusammen mit den vorliegenden Ergebnissen unterstützen das Konzept der so genannten „Entopie“ [83], der lokalisierten nasalen Allergieantwort. Fraglich ist die klinische Relevanz in Bezug auf die Durchführung erweiterter diagnostischer Tests bzw. der Einleitung einer nasalen antihistaminergen Therapie. Hierzu sind sicherlich weitere, insbesondere klinische Untersuchungen erforderlich.

### **5.2 Methodik der Zellgewinnung aus der Nasenschleimhaut – Vergleich mit anderen Verfahren**

Die Charakterisierung des mukosalen lymphozytären Infiltrates in der Nasenschleimhaut kann mittels verschiedener Verfahren erfolgen. In der vorliegenden Untersuchung wurden die Zellen unmittelbar postoperativ nach Zerteilung aus der nasalen Mukosa der Concha nasalis inferior durch mechanische Zerkleinerung gewonnen. Nach wiederholten Spülungen und Filterschritten konnte die so gewonnene Zellsuspension zur durchflusszytometrischen Analyse bzw. für die Stimationsansätze eingesetzt werden. Horiguchi et al. verwendeten zur Charakterisierung der CD23-Oberflächenexpression eine analoge Methode und konnten durch Poolen der von verschiedenen Patienten gewonnenen Zellen durchflusszytometrisch höhere Zellzahlen erzielen. Durch einen zusätzlichen Ficollschritt wurde die Reinheit verbessert [84]. Der Vorteil der Zellgewinnung zur durchflusszytometrischen Untersuchung liegt klar in der gleichzeitigen Beurteilungsfähigkeit verschiedener Oberflächen- und intrazellulärer Moleküle einer Zelle, wobei für die Validität der Durchflusszytometrie eine Mindestzellzahl erreicht werden sollte, die in den vorliegenden Stimationsversuchen nicht immer gewährleistet war.



Die Charakterisierung intranasaler Infiltrate ist valide auf immunhistochemischem Wege möglich, in den exemplarisch durchgeführten histologischen Schnitten wurde mit Hilfe der spezifischen Antikörper gegen CD4 und CD20 das Vorkommen und die Verteilung der T- und B-Lymphozyten dargestellt. Hierbei zeigt sich analog der vorliegenden Literatur ein T-zellulär dominiertes lymphozytäres Infiltrat bei bestehender allergischer Rhinitis, wobei die Infiltrate der B-Lymphozyten im Unterschied zu den T-Lymphozyten hauptsächlich subepithelial lokalisiert waren und T-Lymphozyten sich hingegen auch in der Epithelschicht und vor allem der Lamina propria nachweisen lassen [85, 86].

Zur Durchführung von Stimulationsversuchen bei mukosalen Lymphozyten eignet sich die Gewinnung einer Einzelzellsuspension, wie es in der vorliegenden Untersuchung erfolgt ist. Zu in vorausgegangenen Studien verwendeten Methoden zählt z. B. die Messung von Mediatoren im nasalen Sekret vor und nach in-vivo-Stimulation [87] oder für in vitro durchgeführte Stimulationsversuche die Zytokin- und Mediatorbestimmung in Überständen nach Inkubation kompletter nasaler Gewebeproben [71]. Die in der vorliegenden Untersuchung weiterentwickelte Stimulation einer isolierten nasalen Zellsuspension stellt eine interessante Alternative für die Charakterisierung mukosaler Lymphozyten im Einzelzellformat dar. Aufgetretene Grenzfälle bezüglich der gewonnenen Zellzahlen und der Reinheit der Zellsuspensionen könnten mit Folgeexperimenten durch eine Optimierung der Methode verbessert werden. Die vorliegenden Daten bezüglich der Stimulationsversuche mit mukosalen Lymphozyten sind aufgrund der geschilderten Problematik kritisch zu bewerten. Für die nachstehende Diskussion der Daten aus den Stimulationsversuchen mit Allergen und *Escherichia coli* Stamm Nissle wird daher der Schwerpunkt auf die Modulation der Immunantwort der peripheren B- und T-Lymphozyten gelegt.

### **5.3 Einfluss von *E. coli* Nissle 1917 auf die TH1/TH2 – Balance**

Epidemiologische und experimentelle Daten stützen die Hypothese, dass spezielle mikrobielle Produkte über die Stimulation des Immunsystems für die Prävention und Therapie allergischer Erkrankungen einen bedeutenden Faktor darstellen [41]. Hierbei lässt sich vor allem ein Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung der Darmflora und dem Auftreten von Allergien nachweisen, wobei der direkte Beweis dieser Wechselwirkungen anhand der durchgeführten Untersuchungen bisher nicht erbracht

werden konnte. Für die frühe Stimulation des Immunsystems beim Neugeborenen spielt die Gruppe der Enterobacter eine bedeutende Rolle, die erst im Laufe des Lebens durch den Einfluss anaerober Komponenten ergänzt wird [88]. Lodinova-Zadnikova et al. konnten durch gezielte Kolonisation des Darmes nach der Geburt mit dem apathogenen *Escherichia coli* vom Serotyp 083:K24:H31 eine Reduktion in der Häufigkeit von Allergien noch nach 10 bzw. 20 Lebensjahren nachweisen [61]. Interessant für die vorliegende Untersuchung ist der Effekt apathogener *E. coli*, hier Stamm Nissle Serotyp O6:K5:H1 in Bezug auf die Ausprägung der TH2-Antwort bei Allergikern und Nichtallergikern.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass nach Allergenstimulation eine Zunahme der IL-4-Produktion durch T-Lymphozyten bei Allergikern auftrat. Die intrazellulär ermittelten IFN- $\gamma$ -Werte zeigen nach Allergenstimulation keine Veränderung, so dass sich für die IFN- $\gamma$ /IL-4-Ratio eine deutliche TH2-Antwort erkennen lässt, die sich in der Fraktion der CD69-aktivierten T-Lymphozyten noch klarer abzeichnet (Ratio<sub>A</sub> IFN- $\gamma$ /IL-4 0,2).

Nach Zugabe von EcN sowie nach alleiniger Stimulation mit EcN kommt es zu einem klaren Shift in die TH1-Richtung, was durch die signifikante Zunahme der IFN- $\gamma$ -Produktion erklärbar ist. Wieder findet sich bei Betrachtung der CD69-aktivierten T-Lymphozyten eine Bestätigung dieses Effekts (Ratio<sub>A</sub> IFN- $\gamma$ /IL-4 2).

Dieser deutliche Shift in der TH1/TH2-Balance demonstriert die mögliche therapeutische Potenz der beschriebenen Bakterien und ist gleichermaßen nach paralleler Allergenstimulation nachweisbar (Ratio<sub>A</sub> IFN- $\gamma$ /IL-4 4). Obgleich in einigen Studien die Dichotomie der TH1- und TH2-Antwort gemäß ihrer Zytokinmuster in Frage gestellt wird [12], so scheint hier die analysierte Zytokinantwort das Überwiegen des einen Signalweges mit konsekutiver Suppression des anderen zu bestätigen. In vorausgegangenen Kulturversuchen mit Nasenschleimhaut und LPS, dem Oberflächenantigen der gramnegativen EcN, konnte eine Zunahme von IL-12 und IFN- $\gamma$ -positiven Zellen bei fehlendem Effekt auf die IL-4- und IL-13-Produktion gemessen werden [89]. Die ermittelten Daten in der Nasenschleimhaut deuten analog der vorliegenden Ergebnisse aus dem peripheren Blut auf die Bedeutung von EcN respektive LPS für die Induktion einer TH1-dominierten Immunantwort bei einem bestehenden atopischen Phänotyp hin.

Betrachtet man die klinische Datenlage, so liegt die Bedeutung der Probiotika vor allem in der präventiven Anwendung. Analog der Hygienehypothese führt eine Reduktion der

mikrobiellen Belastung zum Lebensanfang zu einer Triggerung der TH2-Antwort mit verminderter Deviation in die TH1-Richtung, welche sich mit zunehmendem Lebensalter manifestieren würde [29]. Über die Erkennung des LPS-Oberflächenmoleküls durch die „Toll-like-Rezeptoren“ (TLR) kann die angeborene Immunität beeinflusst werden und zur Modulation der Allergieantwort führen [90]. Bashir et al. konnten am Mausmodell mit TLR-4-knockout-Mäusen zeigen, dass die Suszeptibilität gegenüber Allergenen bei fehlendem TLR-4 erhöht ist [91]. TLR-4 spielt eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion durch die in der Darmflora überwiegenden gram-negativen Bakterien.

Unklar bleibt, ob die beobachtete TH1-Antwort unter EcN-Stimulation einen dauerhaften Einfluss auf die Entwicklung des vorliegenden Immunstatus im Erwachsenenalter zeigt oder ob die beobachteten Effekte nach Expositionsende reversibel sind. Untersuchungen von Tulic et al. zeigen, dass die LPS-Stimulation mukosaler Lymphozyten eine unterschiedliche Immunantwort bei atopischen Kindern und Erwachsenen induziert. Eine Zunahme CD4-, CD25-positiver sowie TLR-4- und IL10-positiver Zellen in kindlicher Nasenschleimhaut nach LPS-Stimulation scheint hierbei Ausdruck der schnellen angeborenen Immunantwort mit Vermeidung der Entwicklung des allergischen Phänotyps, wohingegen bei atopischen Erwachsenen nur eine geringe TLR4-Expression ermittelt werden konnte [92]. In der Tat konnte bei Erwachsenen über die Blockierung des CD14/TLR4-Signalweges der Nachweis erbracht werden, dass im Gegensatz zu Kindern hier ein alternativer Aktivierungsweg möglich ist [93]. TLR-4 scheint jedoch auch für die TH2-Differenzierung eine Rolle zu spielen, da im Mausmodell die Inhalation von LPS in hoher Dosis eine TH1-Antwort induziert, wohingegen niedrige LPS-Dosen zu einer TH2-Antwort führen [94].

Neben den TH1- und TH2-Zellen wird aktuell die Bedeutung eines dritten Subtyps, der regulatorischen T-Lymphozyten (Treg), diskutiert. Diese heterogene Gruppe von T-Lymphozyten spielt eine Rolle für die Regulation der Immunantwort und die Hemmung der TH2-Immunantwort [95]. Dementsprechend führt eine reduzierte mikrobielle Belastung zu einer reduzierten Aktivität von Treg Zellen und nicht zu einer reduzierten Produktion von TH1-polarisierenden Zytokinen [96]. Die Verbindung zwischen Treg und Stimulation der TLR durch Mikroorganismen bleibt unklar. Studien zeigen jedoch, dass die TLR-Induktion durch Bakterien den hemmenden Effekt von CD4+ CD25+ Treg

Zellen blockiert und damit die Aktivierung einer pathogen-spezifischen adaptiven Immunantwort im Sinne einer TH1-Antwort ermöglicht wird [29].

Die beschriebenen Untersuchungen liefern Ansätze für den beobachteten Shift der allergen-induzierten TH2-Antwort in eine TH1-Antwort durch EcN. Die zugrunde liegenden Mechanismen bedürfen weiterer Versuche insbesondere unter Berücksichtigung der spezifischen modulierenden Aktivität der apathogenen *E. coli* Nissle.

### **5.4 Modulation des „allergischen“ Phänotyps durch *E. coli* Nissle 1917**

Für die Differenzierung der T-Helferzellen in die TH1- bzw. TH2-Richtung spielt die Interaktion der T-Lymphozyten mit B-Lymphozyten über kostimulatorische Moleküle eine entscheidende Rolle. Betrachtet man die beschriebene Modulation der TH1/2-Balance durch den Einfluss von Allergen im Vergleich zur Stimulation mit *E. coli* Nissle (EcN), so sind auch für den lymphozytären Phänotyp der allergischen und nichtallergischen Individuen entsprechend Veränderungen zu erwarten. Daher war es Ziel der vorliegenden Untersuchungen, periphere und mukosale Lymphozyten bezüglich der Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CTLA-4 sowie ihres Aktivierungsstatus über CD23 und CD69 unter allergener und probiotischer Stimulation zu charakterisieren.

Analog vorausgegangener Untersuchungen kam es bei Allergikern unter Allergeneinfluss zu einer Zunahme der Expression von CD23 und CD86 auf peripheren B-Lymphozyten, die sich durch den gleichzeitigen signifikanten Anstieg der IL-4 Produktion erklären lässt [24, 28]. Die Expression von CD80 blieb unter Allergenstimulation unverändert im Vergleich zum Ausgangswert.

Dagegen konnte nach Stimulation mit apathogenen EcN eine signifikante Reduktion der CD23-Expression im Vergleich zur Allergenstimulation beobachtet werden. Cross et al. demonstrierten anhand der Analyse der Zytokinproduktion der monozytären J774A.1 Zelllinie unter Stimulation mit EcN eine deutliche Induktion der Produktion von IL-10 bei gleichzeitiger Zunahme der IL-12- und TNF- $\alpha$  Produktion [97]. Der im vorliegenden Versuch gemessene signifikante Anstieg der IFN- $\gamma$ -Produktion durch T-Lymphozyten zusammen mit der beschriebenen IL-10-Induktion kann die beobachtete

Herabregulation von CD23 bewirken; die immunmodulatorische Kapazität beider Zytokine bezüglich der CD23-Expression war in vorangegangenen Untersuchungen bereits gezeigt worden [98]. Dieser Effekt war auch bei gleichzeitiger Stimulation mit EcN und Gräserallergen deutlich ausgeprägt, was einen Hinweis auf die Wirksamkeit der EcN auch unter Allergenreiz darstellen könnte.

Auch in der Nasenschleimhaut konnte nach allergener Stimulation die beschriebene Heraufregulation von CD23 bei Allergikern beobachtet werden [84], EcN führte hingegen nur in der Gruppe der Nichtallergiker zu einer verminderten CD23-Expression. In der Gruppe der Allergiker jedoch war nach EcN-Stimulation CD23 stärker exprimiert als nach allergener Stimulation. Kausal muss ein Aktivierungsartefakt der mukosalen B-Lymphozyten als Korrelat zu der ebenfalls starken CD69-Expression auf T-Lymphozyten diskutiert werden. Besonders unter EcN-Einfluss muss die statistische Aussagekraft durch reduzierte mukosale Zellzahlen nach Stimulation kritisch betrachtet werden, da hier verbunden mit der niedrigen n-Zahl und der hohen Einzelwertstreuung die durchflusszytometrische Analyse in ihrer Validität reduziert ist. Der nachgewiesene Effekt in der Gruppe der Nichtallergiker könnte jedoch auch als Indiz für die vorliegende allergische Lokalreaktion gewertet werden, sollte sich dann aber auch in der Gruppe der Allergiker zeigen lassen.

Die Bedeutung der Kostimulation zwischen CD80 und CD86 mit CD28 für die allergische Immunantwort konnte in vorausgegangen Untersuchungen bestätigt werden. Hierbei gelang eine Blockierung der IgE-Synthese tonsillärer B-Lymphozyten durch den Einsatz von anti-CD28-Antikörpern trotz Stimulation mit T-Zellen und IL-4 [99]. Da sowohl CD80 als auch CD86 mit CD28 interagiert, wurden beide Moleküle unter der Annahme untersucht, unterschiedliche Signale an die T-Lymphozyten zu vermitteln und darüber die Entwicklung der verschiedenen TH-Phänotypen zu beeinflussen. Im Mausversuch konnten Kuchroo et al. zeigen, dass eine Behandlung mit anti-CD86 zur Ausbildung des TH1-Phänotyps führte, wohingegen anti-CD80 in einer Generierung des TH2-Phänotyp resultierte [100]. Im Gegensatz dazu zeigten nachfolgende Untersuchungen eine quantitativ vergleichbare kostimulatorische Potenz für beide Moleküle. Sowohl nach Kostimulation mit CD86 als auch CD80 konnte eine Zunahme der IL-4 Produktion durch aktivierte, murine T-Lymphozyten ermittelt werden, so dass sich hier Hinweise entgegen dem zuvor postulierten TH2-direktiven Effekt für CD86 allein ergaben [101].

Die selektive Heraufregulation von CD86 nach Allergenstimulation wurde erstmalig durch Hofer et al. bei Asthmatikern [24], aber auch bei Patienten mit allergischer Rhinitis [102] gezeigt und lässt sich im vorliegenden Stimulationsversuch reproduzieren. Die verstärkte Expression von CD86 lässt sich auf den Einfluss von IL-4, aber auch IL-13 zurückführen, da beide Zytokine die Expression von CD86 induzieren können und ihre Sekretion durch den Allergenstimulus über die Expansion von TH2-Zellen verstärkt wird [24]. Van Neerven et al. beschreiben die CD28-CD86 Kostimulation andererseits als wichtige Voraussetzung für die allergenspezifische T-Zell-Proliferation und Zytokinexpression [22]. Humane CTLA-4-Ig-Fusionsproteine hingegen hemmen die T-Zellantwort gegenüber Allergenen, was die Rolle der CD28-CD86 Kostimulation auf die Ausbildung der TH2-Antwort unterstreicht [22]. Die Induktion der IL-4-Produktion durch T-Lymphozyten in vitro [103] sowie eine Zunahme des Ansprechens von TH2-Zellen auf IL-4 belegen die Bedeutung dieses Signalweges für die Allergieantwort [104].

Auf die Expression von CD80 zeigt sich kein Effekt durch die Stimulation mit Gräserallergen, mit EcN lässt sich eine schwache Heraufregulation beobachten. Vorausgegangene Untersuchungen zeigen, dass die speziell unter EcN heraufregulierten Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-12 keine Veränderung der CD80-Expression bewirken, wodurch sich die im vorliegenden Versuch nahezu unveränderte Expression von CD80 unabhängig von der Höhe der IFN- $\gamma$ -Level und somit der Art des Stimulationsreizes begründen lässt [24]. CD80 scheint im Rahmen der Kostimulation als eher neutrales Differenzierungssignal zu funktionieren, wenngleich Carratelli et al. durch Stimulation mit LPS dosisabhängig eine Heraufregulation von CD80 induzieren konnten [105].

Demgegenüber wurde in den vorliegenden Versuchen unter EcN-Einfluss eine signifikante Heraufregulation der CD86-Expression ermittelt, die auch nach Kostimulation mit Allergen messbar ist. Dieser Effekt war auch in früheren Untersuchungen durch Stimulation mit gram-negativen *S. typhimurium* nachweisbar und ist deutlich stärker im Vergleich zu CD80 [105]. Untersuchungen bestätigen weiterhin, dass CD86 auch ein kostimulatorisches Signal für die IL-2- und IFN- $\gamma$ -Produktion darstellt und neben der IL-4-Induktion auch für die TH1-direktive Kostimulation eine Rolle spielt [76]. Untersuchungen zeigen weiterhin, dass durch die intestinale Kolonisation mit EcN bei Neugeborenen eine allgemeine Stimulation des B-Zell-

Systems mit Erhöhung des EcN-spezifischen IgAs sowie der Immunglobuline vom IgM-Typ induziert werden kann [60].

Analog der gezeigten selektiven und antigenspezifischen CD86-Heraufregulation auf peripheren B-Lymphozyten bei Allergikern konnte auch in der Nasenschleimhaut mittels immunhistochemischer Analysen eine Induktion von CD86 durch Allergenstimulus trotz basal erhöhter Expression in der Allergikergruppe ermittelt werden [25]. In der vorliegenden Untersuchung lässt sich diese basale Differenz zwischen Allergiker- und Kontrollgruppe in der durchflusszytometrischen Analyse der CD86-Expression nicht reproduzieren, was über die eingangs diskutierte These der Entropie der Nasenschleimhaut in der untersuchten Kontrollpopulation erklärbar wäre. Unter Stimulationsbedingungen mit Allergen und EcN bleibt eine Änderung der CD86-Expression auf mukosalen B-Lymphozyten aus, die durchflusszytometrisch hohe Schwankungsbreite der ermittelten Werte bei signifikanter Reduktion der Zellzahlen unter Stimulation mit EcN deuten hier auf eine erhöhte Apoptoserate mukosaler Lymphozyten und damit auf ein methodisches Defizit hin.

Die Untersuchung der Expression des T-Zell-spezifischen Markers CTLA-4 (CD152) auf peripheren T-Lymphozyten zeigte keine signifikanten Veränderungen unter dem Einfluss von Allergen und EcN. Im Unterschied zur Kostimulation über CD80/CD86 mit CD28 als Positivsignal fungiert die Kostimulation über CD152 im Sinne eines Negativsignals, d.h. es kommt zur Herabregulation der Immunreaktion [106]. Anders als CD28 wird CTLA-4 auf aktivierten T-Lymphozyten exprimiert und spielt eine Rolle bei der Hemmung verschiedener T-Zell-Funktionen. Der Nachweis einer erhöhten lymphoproliferativen Aktivität in CTLA-4-knockout-Mäusen weist auf eine Bedeutung für die T-Zell-Homöostase hin [107]. In in-vitro-Versuchen konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe von humanem CTLA-4-Ig-Fusionsprotein die Produktion der mRNA für sowohl Typ-1 (IL-2, IFN- $\gamma$ ) als auch Typ-2 Zytokine (IL-4, IL-5) blockiert werden kann und somit durch die Inhibition der kostimulatorischen Signale eine Hemmung der allergen-spezifischen T-Zell-Antwort erzielt wird [22]. Im Gegensatz hierzu werden die Signale der Kostimulation über CD28 für die IL-4-Produktion durch T-Lymphozyten und die Verstärkung der Empfindlichkeit gegenüber IL-4 benötigt [22]. Weiterhin konnte auch in Stimulationsversuchen mit Porinen von *S. typhimurium*, einem gram-negativen Bakterium, keine Modulation der CD152-Expression erzielt werden [105].

In der Nasenschleimhaut findet sich in der Gruppe der Allergiker insgesamt eine höhere Expression von CD152 als in der Gruppe der Nichtallergiker, unter Stimulationsbedingungen kommt es zu keiner signifikanten Veränderung der Expression. In immunhistochemischen Untersuchungen von Hattori et al. konnte nachgewiesen werden, dass auch hier im allergischen Phänotyp basal eine deutlich höhere CD152-Expression vorlag, die unter Allergenstimulation zunahm [108].

Des Weiteren scheint die Kostimulation über CTLA-4 insbesondere für die T-Zell-abhängige Immunantwort während der initialen *Priming*-Phase eine Bedeutung zu besitzen, die Funktion für die fortlaufende Immunantwort ist hingegen weniger präzise charakterisiert [109]. Versuche haben gezeigt, dass sich ein Großteil der durch Aktivierung der B-Zelle heraufregulierten CTLA-4-Moleküle intrazellulär nachweisen lässt, so dass die für die inhibierende Kostimulation verantwortliche oberflächlich exprimierte Fraktion im vorliegenden Versuch keine vorzeitige Beendigung der induzierten Aktivierung bewirkt [110]. Die geringe Expression deutet daher auf eine untergeordnete Rolle der CTLA-4 Inhibition für die untersuchte Phase der TH-2-Antwort durch Allergen als auch TH1-Antwort durch EcN hin.

Anhand der Bestimmung der Expression von CD69, einem frühen Aktivierungsmarker, erfolgte der Nachweis der Aktivierung der T-Lymphozyten über TCR/CD3 durch die verwendeten Stimulanzien [17]. Hierbei zeigte sich sowohl eine Zunahme der Aktivierung durch Allergen in der Gruppe der Allergiker, aber auch hoch signifikant durch EcN in beiden Gruppen. Vorausgegangene Untersuchungen bestätigen, dass insbesondere LPS, das Oberflächenmolekül gram-negativer Bakterien, für diese signifikante Zunahme der CD69-Expression unter EcN-Stimulation eine Rolle spielt [111].

### **5.5 Ausblick - Bedeutung von E. coli Nissle 1917 als Antiallergikum**

In der vorliegenden in-vitro-Untersuchung zum Einfluss von apathogenen EcN auf die allergen-induzierte TH2-Antwort bestätigt sich eine deutliche immunmodulatorische Kompetenz, die sich durch einen TH1- Shift mit Zunahme der IFN- $\gamma$  Produktion der T-Lymphozyten und der Expression von CD86 sowie durch eine Abnahme der CD23-Expression auf B-Lymphozyten zeigt. Epidemiologische Studien konnten beweisen, dass der frühe Kontakt mit Endotoxinen, den Lipopolysaccharidbausteinen der Zellwand



gram-negativer Bakterien, protektiv auf die Entwicklung einer Atopie wirkt [112]. Dieser Endotoxinkontakt kann einerseits durch den Lebensraum des entsprechenden Individuums beeinflusst werden, könnte aber auch durch eine orale Substitution mit apathogenen EcN über die Darmschleimhaut oder bei stillenden Müttern über die Muttermilch vermittelt werden. Die intestinale Mikroflora, die während der frühen Kindheit aufgebaut wird, wirkt als wichtiger Einflussfaktor auf die Ausrichtung der Immundeviation ein und beeinflusst damit auch die Entwicklung von allergischen Erkrankungen. Vorausgegangene Untersuchungen zeigen bereits, dass E. coli nach oral induzierter Kolonisation geeignet ist, über viele Monate nach der Geburt im Darm zu verbleiben und hierüber zu einer reduzierten Inzidenz von Allergien im späteren Leben beizutragen [61]. Auch für andere probiotische Bakterien, wie z. B. Lactobacillus GG konnte diese Tendenz nachgewiesen werden [50].

Um den Einfluss auf die bereits ausgeprägte Immunantwort, d.h. auf den allergischen Phänotyp nachzuweisen, kann die hier vorliegende Untersuchung an PBMCs von erwachsenen allergischen Individuen verwendet werden. Diese Zellen exprimieren den TLR-2 und-4 Rezeptor und können eine Immunmodulation durch mikrobielle Komponenten vermitteln. Hierfür lässt sich die Hygiene Hypothese um die therapeutische Kompetenz der mikrobiellen Stimulation erweitern. Dies zeigt sich insbesondere in der vorliegenden Untersuchung durch die Tatsache, dass auch unter Allergenpräsenz bei Allergikern durch EcN eine TH1-Antwort induziert werden kann. Nachfolgende klinische Studien müssen zeigen, ob diese in-vitro-Veränderungen auch in vivo erzielt werden können. Für die Modulation der TH-Balance ist in vorausgegangenen Studien bereits ermittelt worden, dass IFN- $\gamma$ -Effekte allein keine ausreichende Wirkung besitzen, da z. B. die Verabreichung von IFN- $\gamma$  bei atopischer Dermatitis zu keiner Verbesserung des Hautzustandes führte [113, 114]. EcN ist als probiotisches Bakterium jedoch aufgrund der guten Verträglichkeit und wegen der gram-negativen Zelleigenschaften als potenzielles Antiallergikum auch zukünftig von besonderem Interesse.



### 6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit behandelt zwei entscheidende Aspekte der allergischen Rhinitis: Erstens werden bei Allergikern lokale lymphozytäre Infiltrate ex vivo durchflusszytometrisch charakterisiert und zweitens wird die immunmodulatorische Kompetenz apathogener *Escherichia coli* Nissle 1917 in Bezug auf diese lymphozytären Infiltratzellen und peripheren Lymphozyten untersucht.

Die durchflusszytometrische Einzelzell-Charakterisierung von Lymphozyten aus der nasalen Mukosa zeigte signifikante phänotypische Unterschiede gegenüber peripheren Lymphozyten. Hierbei fanden sich in der Nasenschleimhaut hochgradig aktivierte Gedächtnis-T-Lymphozyten, wohingegen im peripheren Blut bei geringer Aktivierung ein ausgewogenes Verhältnis von naivem und Gedächtniszell-Phänotyp vorherrschte. Mukosale B-Lymphozyten exprimierten verstärkt IgE und CD86 als Ausdruck einer allergenspezifischen Aktivierung, aber nur gering CD23 und CD80 im Vergleich zu den Zellen aus dem peripheren Blut. Fehlende phänotypische Unterschiede zwischen Allergikern und Nichtallergikern deuten darauf hin, dass bei Patienten mit Nasenatembeschwerden ohne systemischen Nachweis einer allergischen Komponente - entsprechend dem untersuchten Nichtallergiker-Kollektiv - die allergische Lokalreaktion im Sinne einer ‚Entopie‘ pathogenetisch eine Rolle spielt.

Der zweite Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der Untersuchung des Einflusses der apathogenen *Escherichia coli* Nissle 1917 auf den Phänotyp und die Funktion von peripheren und mukosalen T- und B-Lymphozyten. T-Lymphozyten zeigten eine starke Zunahme der CD69-Aktivierung, die B-Lymphozyten eine Zunahme der CD80- und CD86-Expression im Vergleich zur Stimulation mit Allergen. *E. coli* Nissle führten außerdem zu einer signifikanten CD23-Reduktion auf peripheren B-Lymphozyten. Die Analyse der Zytokinproduktion durch T-Lymphozyten des peripheren Blutes zeigte eine deutliche TH1-direktive Modulation der IL-4- und IFN- $\gamma$ -Antwort nach *E. coli* Nissle-Stimulation im Vergleich zum TH2-Phänotyp nach allergener Stimulation. Zusammen mit den vorliegenden epidemiologischen Daten lassen sich so Hinweise auf eine präventive Potenz der probiotischen *E. coli* Nissle ermitteln. Der Nachweis einer TH1-Antwort bei gleichzeitig bestehender Allergenstimulation impliziert auch den möglichen Einsatz im therapeutischen Bereich im Sinne eines „Antiallergikums“.



## 7 Materialverzeichnis

Tabelle 3 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Aceton zur Analyse	MERCK, Darmstadt
Albumin Bovin Fracture V pH 7,0	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
ALK Lancet Sterile Disposable	ALK Abello, Hørsholm, Dänemark
ALK-lyophilisiert SQ 108 Birke	ALK Scherax, Wedel
ALK-lyophilisiert SQ 225 Wiesenlieschgras	ALK Scherax, Wedel
ALK-lyophilisiert SQ 555 Katzenhaare	ALK Scherax, Wedel
ALK-Prick N 402 Alternaria alternata	ALK Scherax, Wedel
ALK-Prick Negativkontrolle	ALK Scherax, Wedel
ALK-Prick Positivkontrolle	ALK Scherax, Wedel
ALK-Prick SQ 108 Birke	ALK Scherax, Wedel
ALK-Prick SQ 299 Gräsermischung	ALK Scherax, Wedel
ALK-Prick SQ 312 Beifuß	ALK Scherax, Wedel
ALK-Prick SQ 503 Hausstaubmilbe	ALK Scherax, Wedel
ALK-Prick SQ 504 Milbe	ALK Scherax, Wedel
ALK-Prick SQ 555 Katzenhaare	ALK Scherax, Wedel
Ampuwa für Spülzwecke	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Antibody Diluent	DakoCytomation GmbH, Hamburg
anti-CD28 1mg/ml	BD PharMingen, Heidelberg
Beriglobin	Aventis-Behring, Marburg
Biocoll seperating solution	Biochrom KG, Berlin
Brefeldin A	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco`s phosphate buffered saline (1x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
FACS Lysing Solution	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Permeabilising	BD Biosciences, Heidelberg

## Materialverzeichnis

Foetal bovine serum (mycoplasma/virus screened)	GIBCO BRL Life Technologies, Eggenstein
Jung Tissue Freezing Medium	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch
K 0676 ChemMate Detection Kit	DakoCytomation GmbH, Hamburg
Kaisers Glyceringelatine f. Mikroskopie	MERCK, Darmstadt
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom AG, Berlin
Mutaflor 100 mg N1 Kapseln	Ardeypharm, Herdecke
Natriumazid reinst $\text{NaN}_3$	MERCK, Darmstadt
Natriumchlorid	MERCK, Darmstadt
Papanicolaous Lösung 1a Harris' Hämatoxylinlösung	MERCK, Darmstadt
Paraformaldehyd reinst	MERCK, Darmstadt
Penicillin 10000 U/ml, Streptomycin 10000 $\mu\text{g/ml}$	Biochrom AG, Berlin
RPMI 1640 Medium (1x) w 2,0 g/l $\text{NaHCO}_3$ w/o L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Staphylokokken enterotoxin B (SEB)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Titriplex III $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2$	Sigma Aldrich, Taufkirchen
TRIS-gepuffertes Kochsalz-Konzentrat (TBS) pH 7,6	BIOCYC GmbH & CO. KG, Luckenwalde
Trypanblau 0,18 % in PBS w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	Biochrom AG, Berlin
Venimmun N	Aventis Behring, Frankfurt
WST-1 Reagenz	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

**Tabelle 4 Antikörper**

Antikörper	Spezifität / Markierung	Hersteller
mouse anti human	CD4 PerCP	Becton Dickinson, Heidelberg
mouse anti human	CD8 PerCP	Becton Dickinson, Heidelberg
mouse anti human	CD14 PerCP	Becton Dickinson, Heidelberg

mouse anti human	CD19 FITC	Biosource GmbH, Solingen
mouse anti human	CD20 PerCP	Becton Dickinson, Heidelberg
mouse anti human	CD20 FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
mouse anti human	CD23 FITC	Biosource GmbH, Solingen
mouse anti human	CD38 FITC	Immunotech, Marseille, Frankreich
mouse anti human	CD54 FITC	Biosource GmbH, Solingen
mouse anti human	CD54 APC	BD Pharmingen, San Diego, USA
mouse anti human	CD79a PerCP-Cy5.5	Becton Dickinson, Heidelberg
mouse anti human	CD86 APC	BD Pharmingen, San Diego, USA
mouse anti human	CD152 PE (CTLA-4)	BD Pharmingen, San Diego, USA
mouse anti human	CLA FITC	BD Pharmingen, San Diego, USA
mouse anti human	IgG FITC	BD Pharmingen, San Diego, USA
mouse anti human	IgM FITC	BD Pharmingen, San Diego, USA
mouse anti human	ÎL4 PE	Becton Dickinson, Heidelberg
mouse anti human	IFN-γ FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
mouse anti human	CD45RO FITC	Immunotech, Marseille, Frankreich
mouse anti human	CD45RA PE	Immunotech, Marseille, Frankreich
mouse anti human	CD138 PE	DIAClone Research, Besançon, Frankreich
mouse anti human	CD 69 APC	Becton Dickinson, Heidelberg
mouse anti human	CD23 PE	Biosource GmbH, Solingen
mouse anti human	CD20	Dako, Hamburg
mouse anti human	CD4	Dako, Hamburg
mouse isotypic control	IgG1 PE	Becton Dickinson, Heidelberg
mouse isotypic control	IgG2b FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
mouse isotypic control	IgG1 PerCP	Becton Dickinson, Heidelberg
mouse isotypic control	IgG1 FITC	BD Pharmingen, San Diego, USA
mouse isotypic control	IgG1 PE	BD Pharmingen, San Diego, USA
mouse isotypic control	IgG1 APC	BD Pharmingen, San Diego, USA
mouse isotypic control	IgM FITC	Dako, Hamburg
mouse isotypic control	IgG2a PE	BD Pharmingen, San Diego, USA

## Materialverzeichnis

mouse isotypiccontrol	IgG2a FITC	Diaclone Research, Besançon, Frankreich
rat isotypic cotrol	IgM FITC	BD Pharmingen, San Diego, USA

**Tabelle 5 Verbrauchsmaterialien**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Blue Max 50 ml Polypropylene Conical Tube	Falcon – BD Bioscience, San Jose, USA
Blue Max Jr. 15 ml Polypropylene Conical Tube	Falcon – BD Bioscience, San Jose, USA
CA und GF-Vorfilter 0,20 µm steril	Sarstedt, Nümbrecht
Combitips 2,5;5;12,5;50 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Cryomold Biopsy	Tissue Tek, Sakura, USA
Filcons 050-47S 50 µm, syringe-fitting	Dako, Glostrup, Dänemark
Lamelles couvre-objects Menzel Gläser	Menzel GmbH + Co KG, Braunschweig
Medicons 79400S 50 µm, Syringe	Dako, Glostrup, Dänemark
Multiwell 24 well Polystyrene Platten non-Tissue Culture Pl.	Falcon – BD Bioscience, San Jose, USA
Petrischalen 94/16 mm non-TC steril	Greiner Bio-One GmbH, Solingen
Pippettenspitzen 1ml, 0,2 ml,	Sarstedt, Nümbrecht
Pippettenspitzen epT.I.P.S Standard 0,5-20 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Polystyrene Round Bottom Tube 5ml	Falcon – BD Bioscience, San Jose, USA
Safe Lock 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Safe Lock 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Safe Lock 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Serological Pipet 2,5,10,25 ml	Falcon – BD Bioscience, San Jose, USA
Super Frost Plus Objektträger	R. Langenbrinck, Teningen



Transferpipette 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
------------------------	---------------------

**Tabelle 6 Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Akku Pipettusboy	Hirschmann-Laborgeräte, Eberstadt
Axioplan Light Microscope	Zeiss, Berlin
Brutschrank hera cell	Heraeus Instruments, Osterode
FACScalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Finnpipette 0,5-10 µl; 200-1000 µl	Labsystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Finnpipette digital ACL 40-200, 100-1000 µl	Labsystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
IKA-VIBRAX-VXR Electronix Schüttler Typ VX7	Innogenetics, Gent, Belgien
Medimachine 79200	Dako, Glostrup, Dänemark
Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments, Osterode
Minifuge RF	Heraeus Sepatech, Osterode
Multipipette	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Eppendorf Reference 10-100 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Research 10 µl; 10-100 µl; 20-200 µl; 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Shandon Cryotome FSE	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Varifuge	Heraeus Sepatech, Osterode
Vortexer REAX 2000	Heidolph, Schwabach



## 8 Abkürzungsverzeichnis

A	Allergen/Allergiker
APC	Allophycocyanin
APZ	Allergen-Präsentierende Zelle
CCR	CC-Chemokinrezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CLA	Cutaneous lymphocyte antigen
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4
EcN	Escherichia coli Nissle 1917
EcN+A	Escherichia coli Nissle 1917 plus Allergen
ECP	Eosinophile cationic protein
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter
H	Histamin
HNO	Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LGG	Lactobacillus GG
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Leukotrien
MBP	Major basic protein
MHC	Major histocompatibility complex
NA	Nichtallergiker
NK	natürliche Killer (-Zellen)
NSH	Nasenschleimhaut
PAF	Platelet activating factor
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline

## Abkürzungsverzeichnis

---

PCDB	Placebo-controlled double-blind
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-a-Protein
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prostaglandin
R	Rezeptor
RANTES	Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted
SEB	Staphylococcal Enterotoxin B
SSC	Side Scatter
STAT	Signal transducer and activation of the transcription
TCR	T-Zell-Rezeptor
TH	T-Helfer-Zelle
TLR	Toll like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
Treg	Regulatorische T-Zellen
U	unstimuliert
VLA	Very late antigen 4 (Integrin alpha 4)

## 9 Literaturverzeichnis

- 1 Schönbauer L. Das medizinische Wien. Berlin, Wien, Urban & Schwarzenberg, 1944. 433.
- 2 Bennich HH, Ishizaka K, Johansson SG, et al. Immunoglobulin E. A new class of human immunoglobulin. *Immunochemistry* 1968;5(4):327-8.
- 3 Gould HJ, Sutton BJ, Beavil AJ, Beavil RL, McCloskey N, Coker HA, Fear D, et al. The biology of IgE and the basis of allergic disease. *Annu Rev Immunol* 2003;21:579-628.
- 4 Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, et al. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 2001;56(9):813-24.
- 5 Naclerio R, Rosenwasser L, Ohkubo K. Allergic rhinitis: current and future treatments. *Clin Exp All Rev* 2002;2(4):137-147.
- 6 Bousquet J. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA). *Clin Exp All Rev* 2003;3(1):43-45.
- 7 Baraniuk JN. Pathogenesis of allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99(2):S763-72.
- 8 Dykewicz MS. Rhinitis and sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(Suppl 2):S520-29.
- 9 Pawankar R. Preface to proceedings. *Clin Exp All Rev* 2003;3(1):1-2.
- 10 Haas H, Falcone FH, Holland MJ, et al. Early interleukin-4: its role in the switch towards a Th2 response and IgE-mediated allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;119(2):86-94.
- 11 Romagnani S. Understanding the role of Th1/Th2 cells in infection. *Trends Microbiol* 1996;4(12):470-3.
- 12 Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 2003;8(3):223-46.
- 13 Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383(6603):787-93.
- 14 Gajewski TF, Pinnas M, Wong T, et al. Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen-presenting cell populations. *J Immunol* 1991;146(6):1750-8.

- 15 Kalinski P, Hilkens CM, Snijders A, et al. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J Immunol* 1997;159(1):28-35.
- 16 Huang JL, Ou LS, Tsao CH, et al. Reduced expression of CD69 and adhesion molecules of T lymphocytes in asthmatic children receiving immunotherapy. *Pediatr Allergy Immunol* 2002;13(6):426-33.
- 17 Testi R, Phillips JH, Lanier LL. T cell activation via Leu-23 (CD69). *J Immunol* 1989;143(4):1123-8.
- 18 Hall SR, Heffernan, B. M., Thompson, N. T., Rowan, W. C. CD4+CD45RA+ and CD4+CD45RO+ T cells differ in their TCR-associated signaling responses. *Eur J Immunol* 1999;29:2098-106.
- 19 Akdis M, Klunker S, Schliz M, et al. Expression of cutaneous lymphocyte-associated antigen on human CD4(+) and CD8(+) Th2 cells. *Eur J Immunol* 2000;30(12):3533-41.
- 20 Santamaria Babi LF, Picker LJ, Perez Soler MT, et al. Circulating allergen-reactive T cells from patients with atopic dermatitis and allergic contact dermatitis express the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen. *J Exp Med* 1995;181(5):1935-40.
- 21 Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996;14:233-58.
- 22 Van Neerven RJ, Van de Pol MM, Van der Zee JS, et al. Requirement of CD28-CD86 costimulation for allergen-specific T cell proliferation and cytokine expression. *Clin Exp Allergy* 1998;28(7):808-16.
- 23 Thompson CB. Distinct roles for the costimulatory ligands B7-1 and B7-2 in T helper cell differentiation? *Cell* 1995;81(7):979-82.
- 24 Hofer MF, Jirapongsananuruk O, Trumble AE, et al. Upregulation of B7.2, but not B7.1, on B cells from patients with allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101(1):96-102.
- 25 Nakada M, Nishizaki K, Yoshino T, et al. CD86 (B7-2) antigen on B cells from atopic patients shows selective, antigen-specific upregulation. *Allergy* 1998;53(5):527-31.
- 26 Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, et al. Role of interleukin-4 and interleukin-13 in synthesis of IgE and expression of CD23 by human B cells. *Allergy* 1994;49(8):576-86.
- 27 Tsicopoulos A, Joseph M. The role of CD23 in allergic disease. *Clin Exp Allergy* 2000;30:602-5.

- 28 Corominas M, Mestre M, Bas J, et al. Distinct modulation by interferon-gamma (IFN-gamma) of CD23 expression on B and T lymphocytes of atopic subjects. *Clin Exp Immunol* 1998;112(2):276-80.
- 29 Romagnani S. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology*. 2004;112(3):352-63.
- 30 Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989;299(6710):1259-60.
- 31 Strachan DP. Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax* 2000;55(Suppl 1):S2-10.
- 32 Paunio M, Heinonen OP, Virtanen M, et al. Measles history and atopic diseases: a population-based cross-sectional study. *JAMA* 2000;283(3):343-6.
- 33 Martinez FD. Role of viral infections in the inception of asthma and allergies during childhood: could they be protective? *Thorax* 1994;49(12):1189-91.
- 34 Nilsson L, Kjellman NI, Bjorksten B. Allergic disease at the age of 7 years after pertussis vaccination in infancy: results from the follow-up of a randomized controlled trial of 3 vaccines. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2003;157(12):1184-9.
- 35 Strannegard IL, Larsson LO, Wennergren G, et al. Prevalence of allergy in children in relation to prior BCG vaccination and infection with atypical mycobacteria. *Allergy* 1998;53(3):249-54.
- 36 Matricardi PM, Rosmini F, Ferrigno L, et al. Cross sectional retrospective study of prevalence of atopy among Italian military students with antibodies against hepatitis A virus. *BMJ* 1997;314(7086):999-1003.
- 37 Matricardi PM, Bonini S. High microbial turnover rate preventing atopy: a solution to inconsistencies impinging on the Hygiene hypothesis? *Clin Exp Allergy* 2000;30(11):1506-10.
- 38 Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science*. 1965;147:747-8.
- 39 Parker R. Probiotics, the other half of the story. *Anim Nutr Health* 1974;29:4-8.
- 40 Schrezenmeir J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 2001;73(2 Suppl):361S-364S.
- 41 Matricardi PM, Bjorksten B, Bonini S, et al. Microbial products in allergy prevention and therapy. *Allergy* 2003;58(6):461-71.

- 42 Matricardi PM, Rosmini F, Riondino S, et al. Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *BMJ* 2000;320(7232):412-7.
- 43 Bjorksten B. The gastrointestinal flora and the skin--Is there a link? *Pediatr Allergy Immunol.* 2001;12(Suppl 14):51-5.
- 44 Hesse C, Hanson LA, Wold AE. Lactobacilli from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12 production. *Clin Exp Immunol.* 1999;116(2):276-82.
- 45 Wheeler JG, Shema SJ, Bogle ML, et al. Immune and clinical impact of *Lactobacillus acidophilus* on asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997;79(3):229-33.
- 46 Dugas B, Mercenier A, Lenoir-Wijnkoop I, et al. Immunity and probiotics. *Immunol Today.* 1999;20(9):387-90.
- 47 Majamaa H, Isolauri E. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;99(2):179-85.
- 48 Aldinucci C, Bellussi L, Monciatti G, et al. Effects of dietary yoghurt on immunological and clinical parameters of rhinopathic patients. *Eur J Clin Nutr* 2002;56(12):1155-61.
- 49 Van de Water J, Keen CL, Gershwin ME. The influence of chronic yogurt consumption on immunity. *J Nutr.* 1999;129(7 Suppl):S1492-5.
- 50 Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, et al. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2001;357(9262):1076-9.
- 51 Riedler J, Eder W, Oberfeld G, et al. Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization. *Clin Exp Allergy.* 2000;30(2):194-200.
- 52 Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol.* 1995;154(10):5071-9.
- 53 von Mutius E, Braun-Fahrlander C, Schierl R, et al. Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clin Exp Allergy* 2000;30(9):1230-4.
- 54 Loew D. Leben und Werk von Alfred Nissle. in *4. Interdisziplinäres Symposium: Darmflora in Symbiose und Pathogenität.* 2000. Hagen.



- 
- 55 Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 2004;53(11):1617-23.
- 56 Fric P, Zavoral M. The effect of non-pathogenic *Escherichia coli* in symptomatic uncomplicated diverticular disease of the colon. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2003;15(3):313-5.
- 57 Schutz E. The treatment of intestinal diseases with Mutaflor. A multicenter retrospective study. *Fortschr Med*. 1989;107(28):599-602.
- 58 Malchow H SU, Greinwald R, Korner A. Colonization of adults by an apathogenic *E. coli* strain administered after gut decontamination. *Gastroenterology* 1995;108(4, S3):A869.
- 59 Westendorf AM, Gunzer F, Deppenmeier S, et al. Intestinal immunity of *Escherichia coli* NISSLE 1917: a safe carrier for therapeutic molecules. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;43(3):373-84.
- 60 Cukrowska B, LodInova-Zadnlkova R, Enders C, et al. Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with nonpathogenic probiotic *E. coli* strain Nissle 1917. *Scand J Immunol* 2002;55(2):204-9.
- 61 Lodinova-Zadnikova R, Cukrowska B, Tlaskalova-Hogenova H. Oral administration of probiotic *Escherichia coli* after birth reduces frequency of allergies and repeated infections later in life (after 10 and 20 years). *Int Arch Allergy Immunol* 2003;131(3):209-11.
- 62 Baati L, Fabre-Gea C, Auriol D, et al. Study of the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus*: effect of culture and freezing conditions on the viability and cellular protein levels. *Int J Food Microbiol* 2000;59(3):241-7.
- 63 Pawankar RU, Okuda M, Okubo K, et al. Lymphocyte subsets of the nasal mucosa in perennial allergic rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152(6 Pt 1):2049-58.
- 64 Powe DG, Huskisson RS, Carney AS, Jenkins D, McEuen AR, Walls AF, Jones NS. Mucosal T-cell phenotypes in persistent atopic and nonatopic rhinitis show an association with mast cells. *Allergy* 2004;59(2):204-12.
- 65 Croft M, Bradley LM, Swain SL. Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells. *J Immunol*. 1994;152(6):2675-85.
- 66 Dubey C, Croft M, Swain SL. Naive and effector CD4 T cells differ in their requirements for T cell receptor versus costimulatory signals. *J Immunol*. 1996;157(8):3280-9.

- 67 Brezinschek RI, Lipsky PE, Galea P, et al. Phenotypic characterization of CD4+ T cells that exhibit a transendothelial migratory capacity. *J Immunol.* 1995;154(7):3062-77.
- 68 Sanchez-Segura A, Brieva JA, Rodriguez C. T lymphocytes that infiltrate nasal polyps have a specialized phenotype and produce a mixed TH1/TH2 pattern of cytokines. *J Allergy Clin Immunol.* 1998;102(6):953-60.
- 69 Lukacs NW. Migration of helper T-lymphocyte subsets into inflamed tissues. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106(S5):S264-9.
- 70 Kanaizumi E, Shirasaki H, Sato J, et al. Establishment of animal model of antigen-specific T lymphocyte recruitment into nasal mucosa. *Scand J Immunol.* 2002;56(4):376-82.
- 71 Till S, Jopling L, Wachholz P, et al. T cell phenotypes of the normal nasal mucosa: induction of Th2 cytokines and CCR3 expression by IL-4. *J Immunol.* 2001;166(4):2303-10.
- 72 June CH, Bluestone JA, Nadler LM, et al. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today.* 1994;15(7):321-31.
- 73 Azuma M, Ito D, Yagita H, et al. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature.* 1993;366(6450):76-9.
- 74 Hattori H, Okano M, Yoshino T, et al. Expression of costimulatory CD80/CD86-CD28/CD152 molecules in nasal mucosa of patients with perennial allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy.* 2001;31(8):1242-9.
- 75 Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity.* 1994;1(5):405-13.
- 76 Freeman GJ, Boussiotis VA, Anumanthan A, et al. B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity.* 1995;2(5):523-32.
- 77 Bluestone JA. New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation. *Immunity.* 1995;2(6):555-9.
- 78 Corominas M, Mestre M, Bas J, Verdaguer J, Valls A, Romeu A, E B. CD23 expression on B-lymphocytes and its modulation by cytokines in allergic patients. *Clin Exp Allergy* 1993;23(7):612-7.
- 79 Davidsson A, Karlsson MG, Hellquist HB. Allergen-induced changes of B-cell phenotypes in patients with allergic rhinitis. *Rhinology* 1994;32(4):184-90.
- 80 Huggins KG, Brostoff J. Letter: Local IgE antibodies in allergic rhinitis. *Lancet.* 1975;2(7935):618.

- 81 Carney AS, Powe DG, Huskisson RS, Jones NS. Atypical nasal challenges in patients with idiopathic rhinitis: more evidence for the existence of allergy in the absence of atopy? *Clin Exp Allergy* 2002;32(10):1436-40.
- 82 Powe DG, Huskisson RS, Carney AS, Jenkins D, Jones NS. Evidence for an inflammatory pathophysiology in idiopathic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2001;31(6):864-72.
- 83 Powe DG, Jagger C, Kleinjan A, et al. 'Entopy': localized mucosal allergic disease in the absence of systemic responses for atopy. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(10):1374-9.
- 84 Horiguchi S, Okamoto Y, Chazono H, et al. Expression of membrane-bound CD23 in nasal mucosal B cells from patients with perennial allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2005;94(2):286-91.
- 85 Calderon MA, Lozewicz S, Prior A, Jordan S, Trigg CJ, Davies RJ. Lymphocyte infiltration and thickness of the nasal mucous membrane in perennial and seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1994;93(3):635-43.
- 86 KleinJan A, Vinke JG, Severijnen LW, Fokkens WJ. Local production and detection of (specific) IgE in nasal B-cells and plasma cells of allergic rhinitis patients. *Eur Respir J* 2000;15(3):491-7.
- 87 Watelet JB, Gevaert P, Holtappels G, et al. Collection of nasal secretions for immunological analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2004;261(5):242-6.
- 88 Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr*. 1999;69(5):S1035-1045.
- 89 Tulic MK, Manoukian JJ, Eidelman DH, et al. T-cell proliferation induced by local application of LPS in the nasal mucosa of nonatopic children. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110(5):771-6.
- 90 Fiset PO, Tulic MK, Hamid Q. Toll-like receptors and atopy. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116(2):467-70.
- 91 Bashir ME, Louie S, Shi HN, et al. Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. *J Immunol*. 2004;172(11):6978-87.
- 92 Tulic MK, Fiset PO, Manoukian JJ, et al. Role of toll-like receptor 4 in protection by bacterial lipopolysaccharide in the nasal mucosa of atopic children but not adults. *Lancet*. 2004;363(9422):1689-97.
- 93 Cohen L, Haziot A, Shen DR, et al. CD14-independent responses to LPS require a serum factor that is absent from neonates. *J Immunol*. 1995;155(11):5337-42.

- 94 Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, et al. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med*. 2002;196(12):1645-51.
- 95 Akdis M, Blaser K, Akdis CA. T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116(5):961-8.
- 96 Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science*. 2002;296(5567):490-4.
- 97 Cross ML, Ganner A, Teilab D, et al. Patterns of cytokine induction by gram-positive and gram-negative probiotic bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004;42(2):173-80.
- 98 Roever AC, Heine G, Zuberbier T, et al. Allergen-mediated modulation of CD23 expression is interferon-gamma and interleukin-10 dependent in allergic and non-allergic individuals. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(11):1568-75.
- 99 Life P, Aubry JP, Estoppey S, et al. CD28 functions as an adhesion molecule and is involved in the regulation of human IgE synthesis. *Eur J Immunol*. 1995;25(2):333-9.
- 100 Kuchroo VK, Das MP, Brown JA, et al. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell*. 1995;80(5):707-18.
- 101 Natesan M, Razi-Wolf Z, Reiser H. Costimulation of IL-4 production by murine B7-1 and B7-2 molecules. *J Immunol*. 1996;156(8):2783-91.
- 102 Morikawa H, Nagashima S. The role of costimulatory molecules (B7-1 and B7-2) on allergen-stimulated B cells in cedar pollinosis subjects. *Clin Exp Allergy* 2000;30(3):383-92.
- 103 de Boer M, Kasran A, Kwekkeboom J, et al. Ligation of B7 with CD28/CTLA-4 on T cells results in CD40 ligand expression, interleukin-4 secretion and efficient help for antibody production by B cells. *Eur J Immunol*. 1993;23(12):3120-5.
- 104 Webb LM, Feldmann M. Critical role of CD28/B7 costimulation in the development of human Th2 cytokine-producing cells. *Blood*. 1995;86(9):3479-86.
- 105 Galdiero M, Pisciotta MG, Galdiero E, et al. Porins and lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium* regulate the expression of CD80 and CD86 molecules on B cells and macrophages but not CD28 and CD152 on T cells. *Clin Microbiol Infect*. 2003;9(11):1104-11.
- 106 Samoilova EB, Horton JL, Zhang H, et al. CTLA-4 is required for the induction of high dose oral tolerance. *Int Immunol*. 1998;10(4):491-8.

- 107 Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science*. 1995;270(5238):985-8.
- 108 Hattori H, Okano M, Yoshino T, Akagi T, Nakayama E, Saito C, Satoskar AR, et al. Expression of costimulatory CD80/CD86-CD28/CD152 molecules in nasal mucosa of patients with perennial allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2001;31(8):1242-9.
- 109 Sato J, Asakura K, Murakami M, et al. Topical CTLA4-Ig suppresses ongoing mucosal immune response in presensitized murine model of allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999;119(3):197-204.
- 110 Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol*. 2001;1(3):220-8.
- 111 Moniuszko T, Rutkowski R, Tatarczuk-Krawiel A, et al. The role of monocytes stimulated with LPS on CD69 expression in T lymphocytes of patients with non-atopic asthma. *Pol Merkur Lekarski*. 2002;12(69):181-4.
- 112 Eder W, von Mutius E. Hygiene hypothesis and endotoxin: what is the evidence? *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2004;4(2):113-7.
- 113 Hanifin JM, Schneider LC, Leung DY, et al. Recombinant interferon gamma therapy for atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 1993;28(2 Pt 1):189-97.
- 114 Reinhold U, Kukel S, Brzoska J, et al. Systemic interferon gamma treatment in severe atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 1993;29(1):58-63.



## 10 Erklärung an Eides Statt

„Ich, Claudia Rasche, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Phänotyp mukosaler und peripherer Lymphozyten von Allergikern und funktionelle Immunmodulation durch apathogene Escherichia coli Nissle 1917“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

---



### 11 Danksagung

In erster Linie gebührt Frau Prof. Dr. med. Margitta Worm besonderer Dank für das Überlassen des Themas und für ihr großes Engagement während der Durchführung der Arbeit sowie für die ständige Bereitschaft, bei Fragen und Problemen weiterzuhelfen. Ihre wertvollen Anregungen waren eine bedeutende Hilfe bei der inhaltlichen Ausgestaltung der Arbeit.

Herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Michael Wahls und den Kollegen der HNO des Bundeswehrkrankenhauses sowie insbesondere bei OP-Schwester Monika für ihre große Unterstützung bei der Materialgewinnung bedanken.

Insbesondere gilt Christin Wolfram Dank, die mir in unserem gemeinsamen Laboralltag und mit ihrer Freundschaft immer wieder Motivation gegeben hat. Aufgrund unserer kritischen Diskussionen haben sich viele neue Gesichtspunkte eröffnet, die unsere Arbeit stetig vorangebracht haben.

Großen Dank schulde ich darüber hinaus Frau Susanne Lescau und allen Mitarbeitern des Labors der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte für ihre fachkundige Unterstützung, Beratung und Geduld.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Frau Dr. Brigitte Wegner vom Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie für ihren Beitrag bei der Durchführung der statistischen Auswertung.

Weiterhin danke ich meiner Familie und meinen lieben Freunden, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Besonders Andreas danke ich für seine Unterstützung und seinen unerschütterlichen Glauben an mich und in meine Arbeit.



## 12 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.