Aus dem Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

UNTERSUCHUNGEN ZUM OXIDATIVEN STOFFWECHSEL MEHRFACH UNGESÄTTIGTER FETTSÄUREN IN MONOZYTEN VON PATIENTEN MIT ATOPISCHEN ERKRANKUNGEN

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Andrea Kalledat, geb. Schröter

aus Nyiregyháza/Ungarn

Datum der Promotion: 26.02.2016

"Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen, dass die Dinge sind wie sie sind." Aristoteles

"Bei Erweiterung des Wissens macht sich von Zeit zu Zeit eine Umordnung nötig; sie geschieht meistens nach neueren Maximen, bleibt aber immer provisorisch." Goethe

INHALTSVERZEICHNIS

| AĿ | BILDUNG | <i>SVERZEICHNIS</i> | 6 |
|--|------------|---|----|
| TABELLENVERZEICHNIS ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | | 7 | |
| | | 8 | |
| AĿ | STRAKT | | 9 |
| 1. | Einleitun | g | 13 |
| | 1.1. Atop | ie | 13 |
| | 1.1.1. Al | lergie und Atopie: Definition und Abgrenzung | 13 |
| | 1.1.2. Pa | thogenese allergischer Erkrankungen vom Soforttyp | 14 |
| | 1.1.2.1. | Die Rolle von Monozyten in der Genese der Atopie | 14 |
| | 1.1.2.2. | T-Zell-Antwort | 15 |
| | 1.1.2.3. | Interleukine: die besondere Rolle von IL-4 für atopische Erkrankungen | 16 |
| | 1.1.2.4. | Immunglobulin E | 17 |
| | 1.1.2.5. | Die Rolle von Mastzellen in der Effektorphase des atopischen Reaktion | 19 |
| | 1.1.3. Ep | idemiologie atopischer Erkrankungen | 20 |
| | 1.1.4. Ge | enetische Prädisposition | 21 |
| | 1.2. ALO | X15 | 22 |
| | 1.2.1. Bi | ologie der humanen Lipoxygenasen | 22 |
| | 1.2.2. Ro | lle der ALOX15 im inflammatorischen Geschehen | 24 |
| | 1.2.2.1. | Aktivierung der ALOX15-Expression in Monozyten | 24 |
| | 1.2.2.2. | Reaktivität der ALOX15 | 25 |
| | 1.2.2.3. | HETE, Leukotriene und Lipoxine | 27 |
| | 1.2.3. Ro | lle der ALOX15 in der Genese atopischer Erkrankungen | 28 |
| 2. | Gegensta | nd der Arbeit | 30 |
| | 2.1. Ziels | etzung | 30 |
| | 2.2. Stud | iendesign | 31 |
| | 2.2.1. Pa | tientenpanel | 31 |
| | 2.2.2. Ve | ersuchsplanung | 32 |
| 3. | Material | und Methoden | 33 |
| | 3.1. Mate | erial | 33 |
| | 3.1.1. Ge | eräte und Zubehör | 33 |
| | 3.1.2. Ch | nemikalien | 34 |
| | 3.1.3. En | zyme, Kits und Sonstiges | 36 |

| | 3.1.4. | Soft- | und Hardware | 37 |
|----|---------|---------|--|----|
| | 3.1.5. | Prob | enmaterial und Probengewinnung | 37 |
| , | 3.2. N | /letho(| den | 38 |
| | 3.2.1. | Isolie | erung und Kultur peripherer Blutmonozyten | 38 |
| | 3.2.2. | Indul | ktion der Expression der monozytären ALOX15 mit IL-4 | 39 |
| | 3.2.3. | ALO | X15-Aktivitätsbestimmung | 39 |
| | 3.2.3 | 3.1. | Aktivitätsessay mit Arachidonsäure | 39 |
| | 3.2.3 | 3.2. | Lipidextraktion nach Bligh und Dyer | 40 |
| | 3.2.3 | 3.3. | Alkalische Hydrolyse der Esterlipide | 40 |
| | 3.2.4. | High | -Performance-Liquid-Chromatographie (HPLC) | 41 |
| | 3.2.4 | 4.1. | Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC) | 41 |
| | 3.2.4 | 1.2. | Normalphasen-HPLC (SP-HPLC) | 42 |
| | 3.2.4 | 1.3. | Chiralphasen-HPLC (CP-HPLC) | 43 |
| | 3.2.5. | Quan | tifizierung der Hydroxyfettsäuren | 43 |
| | 3.2.6. | IL-4- | Analyse Biotrak ELISA | 44 |
| | 3.2.7. | Gesa | mt-IgE-Bestimmung IMMULITE-Testsystem | 45 |
| | 3.2.8. | RNA | Präparation | 45 |
| | 3.2.8 | 3.1. | Vorgehensweise mittels RNA Testkit | 45 |
| | 3.2.8 | 3.2. | Quantifizierung der RNA | 46 |
| | 3.2.9. | Reve | orse Transkription | 46 |
| | 3.2.10. | Di | ie Polymerasekettenreaktion (PCR) | 46 |
| | 3.2.1 | 0.1. | Primersequenzen | 47 |
| | 3.2.1 | 0.2. | Qualitative PCR | 47 |
| , | 3.3. S | tatisti | ische Analyse | 49 |
| 4. | Ergeb | nisse | | 50 |
| 4 | 4.1. Z | lusam | menhänge zwischen IgE-, IL-4 und HETE | 50 |
| | 4.1.1. | Mögl | liche Korrelation zwischen IgE- und IL-4-Plasmaspiegeln bei Atopikern und Nichtatopikern | 50 |
| | 4.1.2. | Verg | leichende Untersuchungen zu den IgE- und IL-4-Plasmaspiegel bei Atopikern und | |
| | | Nich | tatopikern | 51 |
| | 4.1.2 | 2.1. | IgE-Analyse | 51 |
| | 4.1.2 | 2.2. | IL-4-Analyse | 52 |
| | 4.1.3. | IgE t | ınd IL-4 bei verschiedenen Entitäten der Atopie | 54 |
| | 4.1.3 | 3.1. | IgE-Analyse bei verschiedenen Entitäten der Atopie | 54 |
| | 4.1.3 | 3.2. | IL-4-Plasmaspiegel bei verschiedenen Entitäten der Atopie | 55 |
| | 4.1.4. | Quan | itifizierung der in vitro-Fettsäureoxygenierungskapazität von peripheren Monozyten von | |
| | | Atop | ikern und nicht-atopischen Kontrollen | 57 |
| | 4.1.4 | 4.1. | Nachweis von HETE über HPLC | 57 |
| | 4.1.4 | 4.2. | Nachweis der ALOX15 mRNA mittels RT-PCR | 60 |

4

| 4.2. Zusammenhänge der Testergebnisse in der Gesamtheit aller Krankheitsbilder (At | | | topiker |
|--|--------|--|---------|
| | I | und Nichtatopiker) | 61 |
| | 4.2.1. | Übersicht IgE, IL-4 und HETE bei Atopikern und Nichtatopikern | 61 |
| | 4.2.2. | Korrelationsanalysen der Plasmaspiegel von IL-4 und IgE | 61 |
| 5. | Disku | ssion | 64 |
| | 5.1. 2 | Zusammenhang zwischen Entitäten der Atopie und IgE- sowie IL-4-Spiegeln | 64 |
| | 5.1.1. | Besonderheiten der Immunabwehr von atopischen Erkrankungen | 64 |
| | 5.1.2. | Beziehung zwischen ALOX15, IL-4 und IgE bei Atopikern und Nichtatopikern | 65 |
| | 5.2. 1 | nduktion der ALOX15 in Monozyten | 68 |
| | 5.2.1. | Regulatorisches Potenzial der ALOX15 | 68 |
| | 5.2.2. | Oxidative Kapazität von Monozyten bei atopischen Erkrankungen | 68 |
| | 5.2.3. | Induktion der ALOX15 durch IL-4 in vivo | 71 |
| EL | DESST | ATTLICHE VERSICHERUNG | 88 |
| LE | EBENSI | AUF | 90 |
| AN | ANHANG | | |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| Abbildung 1: | Globale Struktur der Immunglobuline verschiedener Isotypen | 18 |
|---------------|---|---------------|
| Abbildung 2: | Struktur von IgE. VL= variable light, VH= variable, heavy, CL= constant, light; CH= | constant, |
| | heavy; $C\varepsilon$ = Domänen des Fc-Rezeptors. Quelle: www.mdpi.com | 19 |
| Abbildung 3: | Eisencluster der ALOX15 des Kaninchens. Quelle: Walther 2003 | 23 |
| Abbildung 4: | Mechanismus der durch IL-4 induzierten Expression der ALOX15 in humanen Monozya | ten über den |
| | Jak-Stat-Signalweg, Quelle: Chaitidis 2006 | 25 |
| Abbildung 5: | Kristallstruktur der Kaninchen ALOX15 (PDB 2POM) | 26 |
| Abbildung 6: | Musterchromatogramm zum Nachweis von Hydroxyfettsäuren mttels RP-HPLC | 42 |
| Abbildung 7: | Streudiagramm für die Korrelation zwischen IL-4 und IgE | 50 |
| Abbildung 8: | IgE-Plasmaspiegel bei Atopikern und nicht-atopischen Kontrollprobanden | 52 |
| Abbildung 9: | IL-4-Spiegel bei Atopikern und nicht-atopischen Kontrollprobanden | 53 |
| Abbildung 10: | IgE-Werte bei verschiedenen Entitäten der Atopie | 55 |
| Abbildung 11: | Vergleich der IL-4-Plasmaspiegel von Patienten mit verschiedenen atopischen Krankhe | eitsentitäten |
| | und von nicht-atopischen Normalprobanden | 56 |
| Abbildung 12: | Beispielhafte Darstellung einer RP-HPLC-Analyse HETE eines Atopikers (Rhin all) | 58 |
| Abbildung 13: | In vitro-Bildung von oxygenierten Arachidonsäureisomeren (HETE) | 59 |

TABELLENVERZEICHNIS

| Tabelle 1: | Vergleich der Plasmakonzentrationen von IgE bei Atopikern und nicht-atopischen Kontrollper | sonen 51 |
|------------|---|-----------|
| Tabelle 2: | Vergleich der Plasmakonzentrationen von IL-4 bei Atopikern und nicht-atopischen Kontrollper | rsonen 53 |
| Tabelle 3: | IgE-Plasmaspiegel bei verschiedenen Entitäten der Atopie | 54 |
| Tabelle 4: | IL-4-Werte bei verschiedenen Entitäten der Atopie | 56 |
| Tabelle 5: | In vitro-Bildung von HETE durch isolierte Monozyten, die von Patienten mit verschiedenen En | titäten |
| | atopischer Erkrankungen und nicht-atopischen Normalpersonen präparíert wurden | 59 |
| Tabelle 6: | Übersicht der Analysenergebnisse: Vergleich der Mediane (statistische Signifikanzen im Vergl | eich der |
| | verschiedenen Entitäten mit Nichtatopikern) | 61 |
| Tabelle 7: | Korrelationsprüfungen für einen Zusammenhang zwischen IgE und IL-4 | 62 |
| Tabelle 8: | Korrelationsprüfungen für einen Zusammenhang zwischen IL-4 und HETE-Bildung | 62 |
| Tabelle 9: | Vergleich der IL-4-Konzentrationen in vitro (Studien) und in vivo (Dissertation) zur ALOX15 I | Induktion |
| | | 72 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Die Abkürzungen von Nuklein- und Aminosäuren erfolgten nach dem "Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology" (NC-IUBMB) und der "International Union of Pure and Applied Chemistry" (IUPAC). Die Abkürzungen der Proteine stellen deren Gen-Namen dar und weiterhin gelten auch die Abkürzungen für die SI-Einheiten (Système International d'unités).

| 15S-H(p)ETE | 15R-Hydro(pero)xy-(5Z,8Z,11Z,13E)-eikosatetraensäure |
|------------------|--|
| AA | Arachidonic Acid (Arachidonsäure) |
| ALOX 15 | Arachidonate Lipoxygenase, Genname für 12/15-Lipoxygenase |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin) |
| CD 8 | Cluster of differentiation 8 |
| cDNA | complementary DNA (komplementäre DNA) |
| COX 2 | Cyclooxygenase 2 |
| CysLT1 | Cysteinyl leukotriene receptor 1 |
| DNA | Desoxyribonuclein acid (Desoxyribonukleinsäure) |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| EDTA | Ethylendiaminotetraessigsäure |
| EP | Elutionspuffer |
| FADS | Fatty acid desaturase |
| HBSS | Hanks Balanced Salt Solution |
| HETE | Hydroxy-Eikosatetraensäure |
| HPLC | High Perfomance Liquid Chromatographie (Hochleistungsflüssigchromatographie) |
| IRF3 | Interferon Regulatory Factor 3 |
| IgE | Immunglobulin E |
| IL | Interleukin |
| kDa | Kilodalton |
| LOX | Lipoxygenase |
| МНС | Major Histokompatibility Complex |
| PAZ | Professionell Antigenpräsentierende Zellen |
| qRT-PCR | Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction |
| RAD50-Gen | DNA repair protein RAD50 |
| SRS-A | Slow raction Substance of Anaphylaxis |
| TAE | TRIS-Acetat-EDTA |
| TGF | Transforming Growth Factor |
| T _H 2 | T-Helferzelle 2 |
| TLR | Toll-like receptor |
| TNF-α | Tumornekrosefaktor alpha |
| u.a. | unter anderem |

ABSTRAKT

"Untersuchungen zum oxidativen Stoffwechsel mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Monozyten von Patienten mit atopischen Erkrankungen"

Autor: Andrea Kalledat

Die Expression von Lipoxygenasen wird u.a. durch Zytokine reguliert (z.B. IL-4), welche bei atopischen Erkrankungen verstärkt bzw. vermindert ausgeschüttet werden. Ob die Erhöhung der endogenen IL-4-Plasmaspiegel, wie bei verschiedenen dieser Erkrankungen beschrieben, jedoch ausreicht, um *in vivo* eine Hochregulation der ALOX15 Expression in peripheren Monozyten zu induzieren, war bislang unklar.

Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen bestand darin, zu überprüfen, ob bei Patienten mit einer Atopie die ALOX15 in peripheren Monozyten verstärkt exprimiert wird, um hiermit die folgenden Fragestellungen zu beantworten:

- 1. Kann bei häufig vorkommenden atopischen Erkrankungen ein erhöhter IL-4-Spiegel im Blutplasma nachgewiesen werden?
- 2. Gibt es einen statistischen Zusammenhang zwischen den IgE und IL-4-Plasmaspiegeln?
- 3. Ist die katalytische Aktivität der ALOX15 in den peripheren Monozyten *in vivo* hochreguliert?

Hierzu wurden Blutproben von 81 Patienten mit atopischen Erkrankungen [Asthma bronchiale (20), atopischer Dermatitis (15), Rhinitis allergica (46)] und 44 klinisch unauffälligen Normalpersonen [Nichtatopiker] gesammelt und die Plasmaspiegel von IgE und IL-4 mit Hilfe von Immunassays quantifiziert. Für die Ermittlung der Fettsäureoxygenaseaktivität der Monozyten durch HPLC-Quantifizierung der Arachidonsäureoxygenierungsprodukte in einem *ex vivo* Aktivitätsassay wurden Zellen der Versuchsteilnehmer präpariert. Die dabei erhaltenen Resultate können wie folgt zusammengefasst werden:

- 1. Verglichen mit nicht-atopischen Kontrollprobanden konnten bei Atopikern signifikant erhöhte Plasmaspiegel an IgE und IL-4 festgestellt werden.
- 2. Im Vergleich der Krankheitsentitäten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den IgE-Plasmaspiegeln.
- Die IL-4-Spiegel bei Patienten mit Rhinitis allergica waren im Vergleich mit Nichtatopikern signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu waren die IL-4-Spiegel der Patienten mit Atopischem Ekzem und allergischem Asthma nicht signifikant erhöht.
- 4. Es konnte keine monotone statistische Korrelation zwischen den Plasmaspiegeln von IgE und IL-4 im untersuchten Patientenkollektiv ermittelt werden.
- 5. Obwohl periphere Monozyten von Patienten mit einer atopischen Grunderkrankung eine erhöhte Kapazität zur Arachidonsäureoxygenierung aufwiesen, ergaben sich aufgrund des unspezifischen Musters der Oxygenierungsprodukte keine Anhaltspunkte für eine erhöhte Expression der ALOX15. Dies gilt insbesondere auch für Patienten mit signifikant erhöhten IL-4-Spiegeln (allergische Rhinitis).

Damit kann geschlussfolgert werden, dass bei atopischen Erkrankungen die Expression der ALOX15 in peripheren Monozyten nicht erhöht zu sein scheint. Dies gilt unabhängig davon, ob endogene IL-4-Spiegel krankheitsbedingt erhöht waren oder nicht. Selbst bei Patienten mit allergischer Rhinitis konnte keine erhöhte ALOX15 Aktivität in peripheren Monozyten beobachtet werden. Dabei lagen die bei atopischen Erkrankungen *in vivo* erreichten IL-4-Spiegel deutlich unter den IL-4-Konzentrationen, welche für die *in vitro* Induktion der ALOX15 erforderlich sind.

ABSTRACT

"Investigations of the oxidative metabolism of polyunsaturated fatty acids in monocytes from patients with atopic diseases"

Author: Andrea Kalledat

Expression of lipoxygenase isoforms is regulated by cytokines (e.g., IL-4), which are expressed in allergic diseases. However, it was unclear so far whether or not the increased endogenous IL-4 plasma levels reached *in vivo* in these diseases are sufficient to induce ALOX15 expression in peripheral monocytes.

This research study was aimed at investigating whether ALOX15 in peripheral monocytes is increasingly expressed in patients suffering from an atopic disease. Following questions had to be answered:

- 1. Are the endogenous plasma levels of IL-4 significantly increased in patients suffering from frequently occurring allergic diseases?
- 2. Is there a statistical correlation between IgE and IL-4 plasma levels?
- 3. Is the fatty acid oxygenase activity of peripheral monocytes upregulated in vivo?

To answer these questions blood samples were collected from 81 patients with atopic diseases [bronchial asthma (20), atopic dermatitis (15), allergic rhinitis (46)] and 44 nonatopic individuals and the IgE and IL-4 plasma levels were quantified by immunoassays. In addition, peripheral monocytes were prepared from all individuals and the fatty acid oxygenase activity was quantified employing an *ex vivo* activity assay, which quantified the oxygenase products formed from exogenous arachidonic acid by HPLC. Following results were obtained:

- 1. Significantly increased IgE and IL-4 plasma levels were measured in patients suffering from allergic diseases.
- 2. There were no significant differences in the IgE plasma levels between the different disease entities.
- 3. The IL-4 plasma levels of patients suffering from allergic rhinitis were significantly increased. This was, however, not the case for patients with bronchial asthma and allergic dermatitis.
- 4. There was no monotone statistical correlation between the IgE- and IL-4 levels.
- 5. Although the peripheral monocytes of patients suffering from an atopic disease exhibited a significantly increased arachidonic acid oxygenase activity, analysis of the pattern of the oxygenation products did not provide any evidence for increased levels of ALOX15 expression. This was also the case for patients suffering allergic rhinitis with significantly increased IL-4 levels.

From this data it can be concluded that ALOX15 expression in peripheral monocytes does not seem to be upregulated in allergic diseases, regardless of whether or not elevated endogenous IL-4 plasma levels were present. Even in patients with allergic rhinitis no increased ALOX15 activity could be observed. The IL-4 levels observed *in vivo* in allergic diseases were significantly below the IL-4 concentrations required to induce ALOX15 *in vitro*.

1. EINLEITUNG

1.1. Atopie

1.1.1. Allergie und Atopie: Definition und Abgrenzung

Überschießende Reaktionen des Immunsystems gegen Substanzen, welche normalerweise keine klinischen Symptome hervorrufen, werden als Allergien bezeichnet. Eine Allergie in der ursprünglichen Definition von Pirquet (1906) tritt erst nach Sensibilisierung durch ein Allergen auf. In den letzten Jahrzehnten haben Forschungen gezeigt, dass die Pathogenese überschießender Immunreaktionen nach Sensibilisierungen der Pathogenese einer akuten Entzündung entspricht. Derzeit gilt die von Coombs und Gell aufgestellte Einteilung in vier unterschiedlich vermittelte und sich manifestierende Allergieformen (Gell *et al.* 1963). Eine allergische Reaktion, die unmittelbar nach Kontakt mit sensibilisierenden Substanzen auftritt, stellt per definitionem eine Allergie Typ I vom Soforttyp dar.

In der klinischen Einteilung von Immunreaktionen sind weiterhin der Allergie Typ II als antikörpermediierter, zytotoxischer Typ, unterteilt in den Subtyp II a und II b zu erwähnen, wo Antikörper gegen körperzell-gebundene Antigene gebildet werden, sowie der Allergie Typ III als Antikörperabhängiger Immunkomplextyp, gekennzeichnet durch Antikörper-Bildung gegen lösliche Antigene.

Beim vierten Typ der Nomenklatur handelt es sich um den so genannten Spättyp allergischer Reaktionen, wobei Überempfindlichkeitsreaktionen durch die Aktivierung von Allergenspezifischen T-Zellen ausgelöst werden. Es existieren drei Subtypen Typ IVa1, IVa2, und IVb.

Eine Atopie unterscheidet sich von einer allgemeinen Allergie vor allem dadurch, dass dabei eine genetische Prädisposition zur Ausprägung des Phänotyps beiträgt. Zur Ausbildung einer Atopie liegt nach derzeitigem Forschungsstand, in enger Eingrenzung einer allergischen Reaktion, eine genetisch bedingte Bereitschaft zur Sensibilisierung und zur Bildung erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel gegenüber Umweltallergenen bereits bei geringer Expositionsstärke vor (Jones *et al.* 1975; Perkin *et al.* 2006). Eine Atopie ist deshalb gemäß der Klassifikation der Europäischen Akademie für Allergologie und klinische Immunologie (EAACI) die zusammenfassende Bezeichnung für die auf einer genetischen Disposition beruhende Produktion von IgE-Antikörpern, welche zu einer Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp (Typ I der Allergie) führt (Ring *et al.* 2006, S. 377).

1.1.2. Pathogenese allergischer Erkrankungen vom Soforttyp

1.1.2.1. Die Rolle von Monozyten in der Genese der Atopie

Allergische Erkrankungen wie z.B. Asthma bronchiale werden zwar über ein externes Antigen ausgelöst, verlaufen aber im Weiteren über immunmodulatorische Reaktionen. Ein vom Organismus als Allergen eingestuftes Molekül löst in der Sensibilisierungsphase bei Kontakt mit Haut, Oberflächenepithelien der Atemwege, oder dem Submucosalbereich des Darmes eine Aktivierung von Immunzellen aus. Monozyten, dendritische Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten, die als professionell antigenpräsentierende Zellen (PAZ) fungieren, sind die wichtigsten Akteure in der Sensibilisierungsphase. Monozyten sind aufgrund ihrer multifunktionellen Eigenschaften im besonderen Maße in die Immunabwehr bei atopischen Erkrankungen involviert. Sie differenzieren sich im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen entlang der myeloischen Reihe und werden ins strömende Blut abgegeben. Durch Diapedese können sie die Strombahn verlassen und sich in den peripheren Geweben zu Gewebsmakrophagen bzw. dendritischen Zellen weiter differenzieren. Die Extravasation und die Migration im Extrazellularraum erfolgen entlang von Zytokin-Gradienten.

Aktivierte Monozyten können hinsichtlich ihrer Rolle bei der Entzündungsreaktion vereinfachend in zwei antagonisierende Phänotypen klassifiziert werden. M1 Monozyten kommen überwiegend in der akuten Entzündungsphase im peripheren Gewebe vor (Tugal *et al.* 2013). Sie haben pro-inflammatorischen Charakter und exprimieren überwiegend proinflammatorische Enzyme (z.B. COX2), pro-inflammatorische Zytokine (z.B. TNF- α) und Rezeptoren für pro-inflammatorische Botenstoffe (z.B. CysLT1) (Heise *et al.* 2000; Thivierge *et al.* 2001; Lissner *et al.* 2015). Über verschiedene Pattern Recognition Rezeptoren (z.B. TLR4) können Monozyten Pathogene erkennen, diese internalisieren und präsentieren aufgearbeitete Pathogenbestandteile über MHC I- und MHC II-Proteine auf der Zelloberfläche (Degraaf *et al.* 2014). M2 Monozyten haben dagegen anti-inflammatorischen Charakter und dominieren in der Resolutionsphase der Entzündung. Ihre Aufgabe ist die Phagozytose apoptotischer Granulozyten. Damit tragen sie dazu bei, das Entzündungsgebiet zu säubern. Diese M2 Makrophagen zeigen ein verändertes Genexpressionsprofil und setzen eine Reihe anti-inflammatorischer Botenstoffe (z.B. Resolvine) frei. Hiermit sind sie wesentlich an der Heilung einer Entzündung beteiligt (Martinez *et al.* 2014; Flesher *et al.* 2014).

Bevor Blutmonozyten die Strombahn verlassen können, müssen sie an die Gefäßendothelzellen adhärieren. Dabei werden Zytokin-vermittelt auf der Endothel-Oberfläche Adhäsionsmoleküle

wie VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) exprimiert, die von Monozyten im Sinne einer Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung erkannt werden, wodurch ein direkter Kontakt zwischen Endotheloberfläche und Monozyt hergestellt wird (Foster 1996, Chen et al. 2010). Nach der Adhäsion am Gefäßendothel verlassen die Monozyten die Gefäße durch Diapedese, indem sie sich zwischen den Gefäßendothelzellen hindurch zwängen. Da Endothelzellen kaum tight junctions ausbilden, wird der Diapedese wenig Widerstand entgegen gesetzt. Ausgelöst wird die gezielte Extravasation durch Chemotaxis. Darunter versteht man die zielgerichtete Bewegung von Blutzellen entgegen eines Chemokingradienten. Störungen der Leukozytenadhäsion und der Leukozytendiapedese führen zur dysfunktionellen Immunantwort (Pichler et al. 2006; Chen et al. 2010). Möglicherweise liegt auch bei Atopikern eine Störung der Monozyten-Adhäsion und/oder der Leukozytenchemotaxis vor, wobei eine verminderte Expression von CD11/CD18 die Ursache sein könnte (Stranegard 1981; Fiorini et al. 2002; Knight et al. 2014). Rogge et al. (1976) sowie Fukawa et al. (1978) beschreiben eine verringerte Monozyten-Chemotaxis bei bestimmten atopischen Erkrankungen, wobei die molekularen Mechanismen bisher noch nicht aufgeklärt werden konnten. Eine Störung der Monozytenchemotaxis führt zu Störungen bei der Differenzierung dendritischer Zellen und damit zu einer verminderten adaptiven Immunantwort. Dies kann zu einer Immunschwäche führen, die möglicherweise auch vererbbar ist (Amoras et al. 2003).

1.1.2.2. T-Zell-Antwort

Professionell antigenpräsentierende Zellen (PAZ) exprimieren große Mengen an MHC-Molekülen (Saloga et al. 2011, S. 72). Eine dendritische Zelle z.B. nimmt ein komplexes Antigen mittels Phagozytose auf und wandelt es intrazellulär in kleinere Antigen-Peptide um, welche anschließend mittels MHC-I bzw. MHC-II Proteinen auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Dieser Komplex kann durch die T-Zellrezeptoren von CD8⁺- und/oder CD4⁺-T-Lymphozyten erkannt werden (Norment et al. 1988; Pardi et al. 1991; Joetham et al. 2007), wobei die Bindung der präsentierten Antigene an die T-Zellrezeptoren zur Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen (T_H) führt (Anderson et al. 2005; Ryan et al. 2012). T-Helferzellen können anhand ihres Zytokinspektrums, das sie als Antwort auf eine Aktivierung sezernieren, vereinfachend in zwei Klassen eingeteilt werden. T_H1-Zellen produzieren im Rahmen ihrer Aktivierungsreaktion klassische pro-inflammatorische Zytokine, wie Tumornekrosefaktor alpha (TNFa) und Interleukin-2 (IL-2). Im Gegensatz dazu synthetisieren T_{H2} -Zellen bei Aktivierung vor allem die Interleukine IL-4, IL-10 und IL-13.

T_H2-Zellen sind für die Pathogenese atopischer Erkrankungen von großer Bedeutung. Die genetische Prädisposition von Atopikern geht möglicherweise auf bestimmte Formen von T_H2-Zellen sowie Mutationen der von ihnen exprimierten Glykoproteine zurück (Woodruff *et al.* 2009; Beghé *et al.* 2003, Zhu *et al.* 2013), (siehe Kapitel 1.1.4). T_H2-Lymphozyten aktivieren durch die Sekretion immunmodulatorischer Zytokine, Makrophagen und B-Zellen, damit diese ihre Immunfunktionen besser ausüben zu können (Lee *et al.* 1988; Banchereau *et al.* 1991; Del Prete *et al.* 1992; Schmitz *et al.* 1994; Gould *et al.* 2008). Die von T_H2-Zellen klassischer Weise freigesetzten Interleukine IL-4 und IL-13 binden an die entsprechenden Rezeptoren von B-Zellen und induzieren einen irreversiblen Isotypenwechsel von IgM nach IgE (Gould *et al.* 2008). Um zielgerichtete Therapeutika entwickeln zu können, schlagen Woodruff *et al.* (2009) die Einteilung von Asthma-Phänotypen über das Ausmaß der T_H2-Beteiligung vor: Genexpressions-Analysen von Asthmatikern zeigten, dass so genannte T_H2-high-Patienten eine stärkere Expression von IL-5 und IL-13 aufweisen (Woodruff *et al.* 2009; Peters *et al.* 2014).

1.1.2.3. Interleukine: die besondere Rolle von IL-4 für atopische Erkrankungen

IL-4, IL-5 und IL-13 sind in besonderem Maße für die Entwicklung atopischer Erkrankungen wie des bronchialen Asthmas und des Atopischen Ekzems bedeutsam (Bos *et al.* 1992; Humbert *et al.* 1997; Levy *et al.* 1997; Wills-Karp 2000; Steinke *et al.* 2001; Magnan *et al.* 2000; Beghé *et al.* 2003).

IL-4 ist ein sekretorisches Glycoprotein, das aus 129 Aminosäuren besteht (Paul 1991; Blanchereau *et al.* 2001). Das IL-4-Gen ist auf dem humanen Chromosom 5 lokalisiert. Es gehört zu den klassischen T_H2-Zytokinen und wird vor allem von T_H2-Helferzellen sezerniert. Es induziert die Aktivierung von Monozyten/Makrophagen und dendritischen Zellen, die als professionell antigenpräsentierende Zellen wirken. Obwohl IL-4 damit in der klassischen Th2-Immunresponse involviert ist, fungiert es manchmal auch als anti-inflammatorisches Zytokin. In der älteren Literatur wird es aufgrund seiner vielfältigen und teils gegensätzlichen Wirkungen in verschiedenen zellulären Systemen auch als B cell stimulatory factor 1 (BSF-1), IgE-enhancing factor (IgE-EF) und T cell growth factor 2 (TCGF-2) bezeichnet. IL-4 induziert die Differenzierung von T_H2-Zellen (autokrine positive Rückkopplung) und stimuliert bereits aktivierte B-Zellen, womit es entscheidend an der Expression von IgE beteiligt ist. Strukturanalysen von IL-4-Varianten ergaben, dass Änderungen der Seitenkettenorientierung bestimmter Aminosäuren zu einer stärkeren Affinität gegenüber den Rezeptoren führen und damit für eine verstärkte IgE-Expression verantwortlich sind (Kraich *et al.* 2006). Neben seiner Wirkung auf andere Immunzellen hat IL-4 auch Einfluss auf die Proliferation von Fibroblasten und Endothelzellen (Banchereau *et al.* 1991; Schmitz *et al.* 1994; Steinke *et al.* 2001; Kanellakis *et al.* 2012; Bellini *et al.* 2012; Yamaji-Kegan *et al.* 2014).

Die Differenzierung von dendritischen Zellen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen (Monozyten) ist IL-4 abhängig. Diverse Arbeitsgruppen berichten, dass eine Stimulation von Monozyten mit IL-4 in Gegenwart von GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) *in vitro* zur Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen führt (Sallusto *et al.* 1994; Geissmann *et al.* 1998; Guironnet *et al.* 2002; Rajkovic *et al.* 2011). Ob diese Mechanismen *in vivo* in analoger Form ablaufen, ist aber noch nicht eindeutig geklärt. Wird der Zytokinmischung noch TGF- β zugesetzt, führt die Differenzierung zu Zellen, die den klassischen Immunzellen der Haut, den Langerhanszellen ähneln. Diese spezifische Wirkung kann für die Pathogenese inflammatorischer Erkrankungen von Bedeutung sein. Langerhanszellen sind als wesentliche epidermale dendritische Zellen und Träger des IgE-Rezeptors in der Entwicklung des Atopischen Ekzems von Bedeutung (siehe Kapitel 1.1.2.4) (Novak 2012).

Ein weiteres klassisches T_H2 -Zytokin ist IL-13. IL-13 stimuliert die Adhäsion von eosinophilen Granulozyten an Endothelzellen durch die Aktivierung der Expression von p-Selectin auf Endotheloberflächen, und reguliert damit die Entwicklung der Spätphasen-Reaktionen (Woltmann *et al.* 2000; Agrawal *et al.* 2014). Gegenspieler der Zytokin-Produktion sind u.a. CD4⁺- und CD25⁺-regulatorische T-Zellen (Corrigan *et al.* 1990; Bellinghausen *et al.* 2003).

1.1.2.4. Immunglobulin E

Als Antwort auf eine Aktivierung werden B-Lymphozyten zur Proliferation angeregt. Diese differenzieren sich zu Plasmazellen (Dembech *et al.* 1992; Pauly *et al.* 2002), welche Immunglobuline (Ig) produzieren. Ig sind tetramere sekretorische Proteine, die aus vier Polypeptidketten (zwei identische schwere H-Ketten, zwei identische leichte L-Ketten) bestehen und als Antikörper im strömenden Blut und in der extrazellulären Flüssigkeit zirkulieren, um dort vorhandene Antigene zu binden.

Jede der vier Ketten besitzt einen konstanten (c) und einen variablen (v) Molekülteil. Das Carboxy-terminale Ende jeder einzelnen Ig-Kette bildet den c-Teil. Die Aminosäuresequenz des c-Teils ist bei allen schweren Ketten eines Isotyps (z.B. IgG) identisch. Sie ist Grundlage für die Klassifizierung der Immunglobuline in die fünf Isotypen IgG, IgM, IgD, IgA und IgE. Im variablen Teil hingegen unterscheiden sich auch die Immunglobuline eines Isotyps voneinander. Die leichten Ketten werden hinsichtlich der Struktur ihres c-Teils in zwei Arten (kappa und

1. Einleitung

lambda Ketten) eingeteilt. Auch hier ist die Aminosäuresequenz des c-Teils aller kappa Ketten identisch, unterscheidet sich aber von der Sequenz der lambda Ketten.



Abbildung 1: Globale Struktur der Immunglobuline verschiedener Isotypen

Die N-terminalen Anteile der leichten und schweren Ketten zeigen eine hohe Strukturvariabilität und bilden gemeinsam die Antigenbindungsdomänen (Poljak 1978; Püschel *et al.* 2011). Bestimmte Immunglobuline können höher molekulare Superstrukturen bilden. So kommt IgM im Plasma überwiegend als Pentamer vor, wobei sich 5 tetramere Kettenkombinationen zu einem gemeinsamen Molekül zusammen lagern (Abb. 1). Dieses pentamere IgM besteht mithin aus 20 (10 leichten und 10 schweren) Einzelketten. Ähnliches gilt für IgA, das häufig als Dimer (8 verschiedene Ketten) vorkommt. IgE und IgM unterscheiden sich von den übrigen Isotypen dadurch, dass sie nicht über die flexible so genannte Hinge-Region zwischen dem Fab (fragment antigen binding) und dem Fc (fragment crystallizable)-Bereich verfügen (Abb. 1).

Der Fc-Teil der Immunglobuline, der ausschließlich durch die c-Regionen der schweren Ketten gebildet wird, vermittelt die Bindung von Antikörpern bzw. von Antigen-Antikörperkomplexen an Phagozyten (Garman *et al.* 1998). Dazu wird dieser Molekülteil von den Fc-Rezeptoren der Phagozyten gebunden und anschließend der Gesamtkomplex internalisiert. Neben der Aminosäuresequenz ist auch die Art und der Grad der Glykosylierung der schweren Ketten für das Ausmaß der Immunantwort bedeutsam (Arnold *et al.* 2007; Kai-Ting *et al.* 2013). Als Rezeptoren von B-Lymphozyten können membrangebundene Immunglobuline (B-Zellrezeptoren) auch nicht-präsentierte partikuläre und lösliche Antigene spezifisch erkennen (Almquist *et al.* 2012; Tolar *et al.* 2014).

IgE (Abb. 2) wurde 1966 erstmals beschrieben (Ishizaka *et al.* 1966). Es findet sich im Blutplasma des Menschen nur in sehr geringen Mengen. Die IgE – Serumkonzentration liegt bei gesunden erwachsenen Patienten bei Werten von 20 kU/l (50 μ g/l). Diese Normwerte sind individuell abhängig von regionalen Gegebenheiten und von der Auswahl des Probandenkollektivs (Saloga *et al.* 2011, De Guia *et al.* 2015).



Abbildung 2: Struktur von IgE. VL= variable light, VH= variable, heavy, CL= constant, light; CH= constant, heavy; $C\varepsilon$ = Domänen des Fc-Rezeptors. Quelle: www.mdpi.com

Atopiker haben aber in der Regel stark (10-100-fach und mehr) erhöhte IgE-Spiegel im Blutplasma. Trotz dieser starken relativen Erhöhung der IgE-Spiegel macht das IgE auch bei Atopikern nur einen geringen Anteil (<5%) der Plasmaimmunglobuline aus. Die erhöhten IgE -Konzentrationen im Serum von Atopikern sind auf einen verstärkten Klassenwechsel von IgM produzierenden auf IgE produzierende B-Zellen zurückzuführen, der in der frühen Sensibilisierungsphase, gesteuert durch regulatorische T-Zellen, stattfindet (Püschel *et al.* 2011, S. 691).

1.1.2.5. Die Rolle von Mastzellen in der Effektorphase des atopischen Reaktion

In der Effektorphase von atopischen Erkrankungen bindet der Antigen-IgE-Antikörper-Komplex an den Fcɛ-Rezeptor auf der Oberfläche von Mastzellen oder basophilen Granulozyten. Die Expression des Fcɛ-Receptors durch diese Zellen wird durch IL-4 gesteuert (Novak *et al.* 2004; Speiran *et al.* 2009). Ruhende Mastzellen speichern eine große Anzahl von Entzündungsmediatoren (z.B. biogene Amine) und pro-inflammatorische Proteine (z.B. Tryptase, Chymase) in vorgefertigten Vesikeln, die bei einer Zellaktivierung durch Degranulation freigesetzt werden und extrazellulär ihre Wirkungen entfalten (Hart 2001; Rose et al. 2004; Kawakami et al. 2009; Cao et al. 2014). So wurde in einer Arbeit nachgewiesen, dass Tryptase z.B. den Juckreiz bei Atopischer Dermatitis erhöht (Kawakami et al. 2009). Die Aktivierung von Mastzellen aber auch von basophilen und eosinophilen Granulozyten über den Fce-Rezeptor steigert die Ausschüttung von Histamin, Enzymen, Prostaglandinen, Leukotrienen, Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Chemokinen, die über unterschiedliche Signalkaskaden in den Zielzellen zunächst pro-inflammatorische Reaktionen auslösen (Schleimer et al. 1986; Wasserman 1990; Sedlacek, S. 492 ff; Kraft et al. 2006; Kulinski et al. 2015; Cho et al. 2015). eine Vasodilatation, eine erhöhte Schleimproduktion und eine So werden z.B. Gewebeschädigung durch die Freisetzung von Histamin aus Mastzellen induziert (Hart 2001). die lokale verstärken Mastzellen Entzündungsreaktion. Der Verlauf Damit der Spätphasenreaktionen bei einer Allergie vom Soforttyp ist damit identisch mit dem einer chronisch entzündlichen Erkrankung (Kawakami et al. 2009; Saloga et al. 2011, S. 92 ff.).

1.1.3. Epidemiologie atopischer Erkrankungen

Eine atopische Reaktion kann sich in unterschiedlichen Zielorganen manifestieren und dort als chronisch entzündliche Erkrankung persistieren. Atopische Dermatitis, Rhinitis allergica, und allergisches Asthma bronchiale sind drei klinisch bedeutsame Entitäten der Atopie (Mutius 2011, S. 201 ff.). Bei diesen Erkrankungen trägt eine IgE vermittelte Degranulation von Mastzellen entscheidend zur Pathogenese bei (Akdis *et al.* 2006; Kawakami *et al.* 2009).

Die *Rhinitis allergica* (Heuschnupfen) kann als intermittierende (saisonal) oder chronisch persistierende Verlaufsform auftreten. Neben Niesen und Pruritus (Juckreiz) sind Müdigkeit und Schwächegefühl häufig zu beobachten. Die allergische Rhinitis tritt häufig im Jugendalter auf, kann sich aber auch im Erwachsenenalter erstmals manifestieren. Mit fortschreitendem Alter schwächen sich die Symptome jedoch zunehmend ab (Klimek *et al.* 2011, S. 309ff).

Das *Atopische Ekzem/Atopische Dermatitis* ist eine chronische Hauterkrankung, die überwiegend durch Umweltallergene ausgelöst wird und deren prägnantestes Merkmal starker Pruritus an bestimmten Prädilektionsstellen ist. Sie ist überwiegend eine Erkrankung des Kindes- und Jugendalters und geht häufig mit einem allergischen Asthma einher.

Asthma bronchiale ist eine entzündliche chronische Erkrankung der Atemwege, mit Beschwerden, die von pektanginösen Atembeschwerden (Brustenge) über häufigen Hustenreiz bis zu schwerwiegender Dyspnoe (Atemnot) mit Stridor reichen. Die unmittelbare Reaktion nach Allergenkontakt ist ein lang andauernder Bronchospasmus. Durch die Freisetzung verschiedener Mediatoren (initial Histamin, anschließend Leukotriene) kontrahiert die glatte Muskulatur der Bronchien. Parallel dazu werden Blutkapillaren dilatiert und es kommt zur Ausbildung eines Schleimhautödems. Gleichzeitig wird die Hypersekretion verstärkt und die Viskosität des Bronchialsekrets steigt an. Ein Problem bei bronchialem Asthma stellt die Disposition für Infektionen dar, welche aufgrund der Entgleisungen des Immunsystems erhöht ist (Juhn 2014). Asthma bronchiale hat die höchste Prävalenz in Industriestaaten. Gemäß der neuesten Studie von Mazurek et al. aus dem Jahr 2015, durchgeführt über das Behavioral Risk Factor Surveillance System (BRFSS) Adult Asthma Call-back Survey (ACBS) in 38 Staaten, ist der Anteil berufsbedingten Asthmas in den letzten Jahren gestiegen. Während im Jahr 2006 nur bis zu 10% der Bevölkerung betroffen waren (Akdis et al. 2006), ermittelten die Autoren der neuen Studie einen Betroffenenanteil von bis zu 23%, in Abhängigkeit von den regionalen Gegebenheiten. Die Symptome bei atopischen Erkrankungen, insbesondere beim Asthma, sind eng mit anderen Faktoren wie körperlicher oder psychischer Belastung korreliert. Hier muss deshalb auch zwischen Atopie im Kindesalter und im Erwachsenenalter unterschieden werden (Korn et al. 2011, S. 335).

1.1.4. Genetische Prädisposition

Die Hinweise auf eine genetische Prädisposition bei Atopikern wurden in der Vergangenheit kontrovers diskutiert. Allerdings offenbarten Studien der letzten 10 Jahre eine große Anzahl von Gendefekten, die bei Patienten mit Asthma bronchiale oder Atopischem Ekzem auftreten. Ob diese Veränderungen aber ursächlich mit der Pathogenese der Erkrankung in Zusammenhang stehen, konnte nicht immer überzeugend nachgewiesen werden. So geben einige Studien Anlass zu der Annahme, dass Gen-Polymorphismen bestimmter Interleukine der Entwicklung einer Atopie zugrunde liegen. Polymorphismen des IL-4 und IL-4-Rezeptorgens scheinen für die Ausprägung des asthmatischen Phänotyps und der allergischen Rhinitis verantwortlich zu sein (Piccinni *et al.* 1996; Beghé *et al.* 2003; Herberger *et al.* 2010; Bottema *et al.* 2010; Zhu *et al.* 2013; Li *et al.* 2014; Lou *et al.* 2007; Hussein *et al.* 2011; Li *et al.* 2014). Auch Polymorphismen des Fcɛ-Receptorgens, das in unterschiedlichen Zelltypen exprimiert wird, können beteiligt sein (Macglashan *et al.* 2005; Nishiyama *et al.* 2004; Korzycka-Zaborowska *et al.* 2014; Wu *et al.* 2014). Weiterhin sind Veränderungen in der Funktion von T-Lymphozyten eine Ursache für die Entwicklung einer Atopie (Dimitrieva-Zdorova *et al.* 2012; Schieck *et al.*

2014).

Insbesondere bei Asthma ist ein familiärer Zusammenhang nach derzeitigem Kenntnisstand gesichert. GWA (Genomweite Analysen) fanden zahlreiche Gen-Polymorphismen bei Asthmatikern, so beispielsweise im RAD50-Gen auf Chromosom 5q31, einem Genort, welcher für die Expression von T_H2 -Zytokinen bedeutsam zu sein scheint (Schieck *et al.* 2014) sowie anderer Genmutationen wie NEDD4L (Neural precursor cell Expressed, Developmentally Down-regulated 4-like, E3 ubiquitin protein Ligase) (Campbell *et al.* 2014). Durch diese natürlich vorkommenden Mutationen wird auch der IgE-Gehalt im Blutplasma beeinflusst (Kim *et al.* 2013; Kretschmar *et al.* 2014). Ein Beispiel für eine in die Genese des Atopischen Ekzems involvierte Mutation ist die des Struktur-Proteins der Epidermis, Filaggrin (Weidinger *et al.* 2006; Sandilands *et al.* 2009; McAleer *et al.* 2013).

Eine andere Hypothese betrifft die Bedeutung mehrfach ungesättigter Fettsäuren bei der Pathogenese der Atopie. Möglicherweise findet bei Atopikern auf Grund von Polymorphismen in den FADS1 (Fatty Acid DeSaturase1) und FADS2 Genen, die für die delta-5 und delta-6 Desaturasen kodieren, eine dysregulierte Synthese von Prostaglandinen aus omega-3 und omega-6 Fettsäuren statt. Prostaglandine sind ähnlich wie Leukotriene an der bronchialen Vasokonstriktion im Rahmen der Asthmapathogenese beteiligt (siehe auch Kapitel 1.2.3) (Melnik *et al.* 1992; Duchén *et al.* 2001; Lattka *et al.* 2012).

1.2. ALOX15

1.2.1. Biologie der humanen Lipoxygenasen

Lipoxygenasen (LOXn) sind Schlüsselenzyme im oxidativen Stoffwechsel mehrfach ungesättigter Fettsäuren (PUFA). Die meisten Säugetier-LOXn bevorzugen freie Fettsäuren als Substrate, die vor allem durch die katalytische Aktivität von Phospholipasen A₂ (PLA2) aus Membran-Glycerophospholipiden freigesetzt werden (Kühn *et al.* 1990a; Astudillo *et al.* 2012). Das humane Genom enthält 6 unterschiedliche LOX-Gene, die für 6 verschiedene LOX-Isoformen kodieren.

Die Subgruppierung der verschiedenen LOX-Isoformen sollte nach neuesten Empfehlungen gemäß der Nomenklatur der zugehörigen Gene erfolgen (Kühn *et al.* 2014): ALOXE3 (epidermale LOX3), ALOX5 (5-LOX), ALOX12 (12-LOX vom Thrombozytentyp), ALOX12B (epidermale 12R-LOX), ALOX15 (12/15-LOX), ALOX15B (15-LOX2).

Mit Ausnahme des ALOX5 Gens, das auf dem humanen Chromosom 10 lokalisiert ist, wurden alle anderen menschlichen LOX-Gene in der Chromosomenregion 17p31 gefunden (Banerjee *et al.* 2006).

Säugetierlipoxygenasen sind einkettige Polypeptide mit einer ungefähren Größe von 650-700 Aminosäuren. Bei diesen Enzymen faltet sich die Polypeptidkette in zwei separate Domänen. Die N-terminale Domäne von Säugetier-LOXn bestehen aus ca. 120 Aminosäuren, die in mehrere beta-Faltblätter gegliedert ist. Die C-terminale Domäne besteht aus bis zu 20 alpha-Helices und enthält die Substratbindungstasche mit dem enzymgebundenen Nicht-Hämeisen. Dieses Metallion ist für die katalytische Aktivität des Enzyms unerlässlich (Gillmor *et al.* 1997; Borngraber *et al.* 1999; Choi *et al.* 2008).



Abbildung 3: Eisencluster der ALOX15 des Kaninchens. Quelle: Walther 2003

Abbildung 3 zeigt die Struktur des Eisenclusters der Kaninchen-ALOX15. Bei diesem Enzym wird das Nichthäm-Eisen durch 4 His (Histidin) und das C-terminale Ile ligandiert. Die sechste Koordinationsstelle des oktaedrischen Eisenclusters wird durch ein Wassermolekül bzw. ein Hydroxylion gebildet. Die biologische Funktion von ALOX15 Orthologen in verschiedenen Säugetierspezies bleibt trotz intensiver Forschungsbemühungen und der Verfügbarkeit von ALOX15-knockout Mäusen auch weiterhin unklar.

Es gibt Hinweise darauf, dass LOXn und ihre Metabolite als Regulatoren bei chronischen Entzündungsreaktionen beteiligt sind, die bei einer Reihe von Erkrankungen (rheumatoider Arthritis, Asthma, Psoriasis, Arteriosklerose, Diabetes mellitus, Alzheimerscher Erkrankung) als Begleiterscheinungen auftreten (Hashimoto *et al.* 2007; Wuest *et al.* 2012; Uderhardt *et al.* 2012; Lieb *et al.* 2014; Lin *et al.* 2014; Zhu *et al.* 2015). Weiterhin gibt es experimentelle Hinweise darauf, dass die Produktion von 12(S)- und 15(S)-HETE als Hauptprodukte der Arachidonsäureoxygenierung durch die ALOX15 die Signaltransduktionswege bei der Karzinogenese beeinflussen (Kang *et al.* 2013). Heute wird die ALOX15 häufig als funktioneller Gegenspieler der ALOX5 angesehen. Während die ALOX5 überwiegend pro-inflammatorisch wirkt, konnten für die ALOX15 in verschiedenen tierischen Entzündungsmodellen anti-

inflammatorische Wirkungen nachgewiesen werden (Kühn *et al.* 2006; Uderhardt *et al.* 2012; Hofheinz *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2013; Kotla *et al.* 2014; Teder *et al.* 2014) (siehe Kapitel 1.2.2). Der Befund reduzierter ALOX15 in der Broncheoalveolar-Lavage von Kindern mit zystischer Fibrose untermauert diese Hinweise (Ringholz *et al.* 2014). Als molekulare Ursache für die anti-inflammatorische Rolle der ALOX15 wird ihre Beteiligung an der Biosynthese proresolutorischer Mediatoren (Lipoxine, Resolvine, Protektine) angesehen (Kühn *et al.* 2006; Krönke *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2013; Ringholz *et al.* 2014). Eine exklusiv antiinflammatorische Wirkung der ALOX15 ist jedoch kritisch zu interpretieren, da in verschiedenen zellulären Entzündungsmodellen auch pro-inflammatorische Wirkungen für ALOX15-Produkte beschrieben wurden (Mabalirajan *et al.* 2013; Kühn *et al.* 2014; Herlin *et al.* 2015).

1.2.2. Rolle der ALOX15 im inflammatorischen Geschehen

1.2.2.1. Aktivierung der ALOX15-Expression in Monozyten

In mehreren Studien der letzten 20 Jahre wurde die Expression der ALOX15 in Monozyten untersucht. Alle Studien zeigen übereinstimmend, dass die Expression dieses Enzyms in menschlichen Monozyten durch IL-4 und IL-13 induziert wird (Conrad *et al.* 1992; Nassar *et al.* 1994; Spanbroek *et al.* 2001; Brown *et al.* 2001; Xu *et al.* 2004; Wuest *et al.* 2012). Diese klassischen T_H2-Zytokine aktivieren den Jak-Stat-Signalweg in den Zielzellen und bedingen dadurch wiederum die Aktivierung der ALOX15- und ALOX15B-Gene (Heydeck *et al.* 1998; Shankaranarayanan *et al.* 2001; Xu *et al.* 2004; Bhattacharjee *et al.* 2013).

Abbildung 4 zeigt, wie die Bindung von IL-4 am Zelloberflächenrezeptor verschiedene Proteinkinasen (Tyk2, Jak2) aktiviert, welche den Transkriptionsfaktor STAT6 phosphorylieren.

Durch die Dimerisierung des phosphorylierten STAT6-Monomers ist es in der Lage, in den Zellkern zu gelangen. Hier kommt es bei Stimulation mit IL-4 zur Aktivierung der Histon-Azetyltransferase CBP/p300, welche sowohl das nukleäre Histon H3 als auch das phosphorylierte STAT6-Dimer azetyliert. Die H3-Azetylierung ihrerseits induziert eine Konformationsänderung an der Nukleosomenstruktur, womit STAT6-sensible Sequenzen im Promoter der ALOX15 freigelegt werden, an welchen das STAT6-Dimer (phosphoryliert und acetyliert) anbinden kann und dadurch die Transkription IL-4 induzierbarer Gene ermöglicht wird.



Abbildung 4: Mechanismus der durch IL-4 induzierten Expression der ALOX15 in humanen Monozyten über den Jak-Stat-Signalweg, Quelle: Chaitidis 2006

Bestimmte Subpopulationen von Mastzellen und eosinophilen Granulozyten, die bei allergischen Atemwegserkrankungen eine besondere Rolle zu spielen scheinen, exprimieren die ALOX15 jedoch bereits konstitutiv in großen Mengen (Kühn *et al.* 2006; Gulliksson *et al.* 2007; Feltenmark *et al.* 2008; James *et al.* 2013). Für diese Zellen ist die Anwesenheit von IL-4 nicht nötig, um das Enzym synthetisieren zu können. Parallel zur Induktion der ALOX15 wurde in Mausendothelzellen eine Hochregulation der Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 durch IL-4 gezeigt (Bolick *et al.* 2005). Diese Ergebnisse ergänzen die Beobachtungen von Reilly *et al.* (2004), die in Funktionsuntersuchungen eine ALOX15-abhängige Stimulation der Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen fanden. Weiterhin konnte eine konstitutive Expression der ALOX15 auch in dendritischen Zellen, Makrophagen Bronchialepithelzellen und in der Epidermis nachgewiesen werden (Levy *et al.* 1993; Spanbroek *et al.* 2001; Lee *et al.* 2001; Brown *et al.* 2002; Yin *et al.* 2010; Mabalirajan *et al.* 2013).

1.2.2.2. Reaktivität der ALOX15

Die ALOX15 unterscheidet sich von anderen LOX-Isoformen vor allem dadurch, dass sie neben freien mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) auch Esterlipide und komplexe Lipid-Protein-Aggregate als Substrate verwenden kann. Andere Eigenschaften wie die globale Raumstruktur, die katalytische Instabilität und die Tendenz zur Membraninteraktion teilt sie mit anderen LOX-Isoformen. In Abb. 5 ist die globale Raumstruktur der Kaninchen-ALOX15 dargestellt.



Abbildung 5: Kristallstruktur der Kaninchen ALOX15 (PDB 2POM)

Grundsätzlich katalysiert die ALOX15 die Oxygenierung von mehrfach ungesättigten ω -3 und ω -6 – Fettsäuren. Neben freien Fettsäuren fungieren aber auch Phospholipide, Cholesterolester, Mono- und Diazylglyzerole und andere Ester- bzw. Etherlipide als Substrate für diese LOX-Isoform. Selbst Biomembranen und Lipoproteine stellen Oxygenierungssubstrate für die ALOX15 dar (Kühn *et al.* 1990; Belkner *et al.* 1993; Walther *et al.* 2004). Über die Oxygenierung der Esterlipide der Mitochondrienmembran scheint die ALOX15 am reifungsabhängigen Abbau der Mitochondrien im Rahmen der Erythropoese beteiligt zu sein (Kühn *et al.* 1990).

Die ALOX15 besitzt im Unterschied zur ALOX15B eine duale Positionsspezifität bei der Reaktion mit Arachidonsäure. Als Reaktionsprodukte wurden 15(S)- und 12(S)-HpETE in einem Verhältnis von etwa 10:1 nachgewiesen (Bryant et al, 1980, Kuhn *et al.* 1992; Kotla *et al.* 2014). Eine wichtige Rolle bei der Immunmodulation könnte die ALOX15 auch dadurch spielen, dass sie als pro-oxidatives Enzym in der Lage ist, oxidierend wirkende Hydroperoxyfettsäuren zu bilden (Hammond *et al.* 2012; O'Flaherty *et al.* 2012; Teder *et al.* 2014), die ihrerseits durch homolytische Spaltung ihrer Hydroperoxygruppe zur Entstehung freier Radikale beitragen. Die dadurch induzierten Radikalkettenreaktionen verändern das Genexpressionsprofil der Zielzellen und damit ihren Funktionsstatus (Chu *et al.* 2002; Maskrey *et al.* 2007; Feltenmark *et al.* 2008; Seiler *et al.* 2008; Pallast *et al.* 2009; Conrad *et al.* 2010; Hammond *et al.* 2012; Joshi *et al.* 2013; Beavers *et al.* 2014). Für diese Hypothese spricht, dass die ALOX15 auch in solchen Fällen immunmodulatorische Wirkungen vermittelt, wenn keine Bildung von klassischen freien Lipoxygenaseprodukten nachweisbar war (Huang *et al.* 1999; Dioszeghy *et al.* 2008). Hier könnte die Fähigkeit des Enzyms, Phospholipide und andere Esterlipide zu oxidieren, eine wichtige Rolle spielen (Maskrey et al. 2007; Hammond et al. 2012).

Der Peroxidstatus von Zellen, die Konzentration anderer reaktiver Sauerstoffmetabolite und die Ca²⁺-Konzentration in der Zelle stellen wichtige Parameter der ALOX15-Wirkungen dar (Chu *et al.* 2002; Walther *et al.* 2004; Kühn *et al.* 2006; Feltenmark *et al.* 2008; Hammond *et al.* 2012; Blazevic *et al.* 2013; Kotla *et al.* 2014), über welche phänotypische Veränderungen von Zellen induziert werden können. Eine kürzlich erschienene Studie weist zudem auf den Einfluss von Lipoxygenasen auf den zellulären Selen-Status hin (Mattmiller *et al.* 2014).

1.2.2.3. HETE, Leukotriene und Lipoxine

Die Katalyse der ALOX5 in humanen Leukozyten führt über die Bildung von 5(S)-HpETE zu den Leukotrienen LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄. Leukotriene sind wichtige pro-inflammtorische Immunmodulatoren, die vor allem beim Asthma und der allergischen Dermatitis bedeutsam sind (Ruzicka et al. 1986; Di Gennaro et al. 2012; Lv et al. 2015). LTC₄, LTD₄ und LTE₄ sind die Hauptbestandteile der Slow Reaction Substance of Anaphylaxis (SRS-A) (Feltenmark et al. 2008; Thomson et al. 2014), die beim akuten Asthmaanfall für die langanhaltende Kontraktion der bronchialen Glattmuskelzellen verantwortlich ist. Diese Mediatoren sind auch an der Aktivierung eosinophiler Granulozyten beteiligt, welche in der Spätphase der Entzündungskaskade als wanderungsfähige Zellen im Zielorgan der Entzündung toxische Substanzen sowie reaktive Sauerstoffmetabolite freisetzen und damit zur Gewebezerstörung beitragen.

Ein Einfluss auf die Vasokonstriktion wird in einigen in-vitro und Tierversuchs-Studien für verschiedene Leukotriene beschrieben. Während LTB4 eine Vasokonstriktion induziert und in der kürzlich erschienen Studie von Lv *et al.* (2015) als pro-inflammatorischer Mediator der Kontaktdermatitis beschrieben wird (Fauler *et al.* 1989; Trandafir *et al.* 2005; Bäck *et al.* 2007; Lv *et al.* 2015), wurden für die Cysteinyl-Leukotriene eher vasodilatatorische Wirkungen beschrieben (Petersen *et al.* 2011).

Weiterhin wurde für diese Mediatoren eine Induktion der Gefäßpermeabilität postkapillärer Venolen und die Ausbildung eines Mukosaödems (Kaminski *et al.* 1996; Rodriguer-Lagunas *et al.* 2013; Bitencourt *et al.* 2013) beschrieben.

Im Gegensatz zu den Produkten des ALOX5-Weges zeigen ALOX15-Metabolite wie Lipoxin A_4 und B_4 überwiegend ein anti-inflammatorisches Wirkungsspektrum. Wie einige in-vitro-Studien zeigten, greifen sie als wichtigste Gegenspieler der Leukotriene hemmend in die Aktivierung der Leukozyten ein, indem sie Chemotaxis, Adhäsion und Transmigration inhibieren (Serhan *et al.* 2002; Levy *et al.* 2002; Wu *et al.* 2009; Krönke *et al.* 2012; Shimizu *et al.* 2013; Ringholz *et al.* 2014). In einem Mausmodell des allergischen Asthmas unterdrückt das ALOX15-Produkt der Arachidonsäureoxidation Lipoxin A₄ die bronchiale Entzündungsreaktion (Levy et a. 2002; Karra *et al.* 2014). In der Studie von Ono *et al.* (2014) des National Heart, Lung, and Blood Institute's Asthma Clinical Research Network wurde im Sputum und der broncho-alveolaren Lavageflüssigkeit (BAL) von Asthmapatienten eine inverse Korrelation zwischen löslicher Epoxy-Hydrolase und Lipoxin A4 gefunden. Diese Daten deuten darauf hin, dass eine Hochregulierung der endogenen Lipoxin A4 - Synthese als möglicher therapeutischer Ansatz bei Asthma angesehen werden kann. Es gibt allerdings auch Hinweise, dass das Wirkungsspektrum der Lipoxine vielfältiger ist und dass Oxidationsprodukte auch pro-inflammatorisch aktiv sein können (Maddox *et al.* 1996; Wenceslau *et al.* 2014).

1.2.3. Rolle der ALOX15 in der Genese atopischer Erkrankungen

Die ALOX15 ist an der Pathogenese allergisch bedingter Atemwegserkrankungen mit großer Wahrscheinlichkeit beteiligt (Bradding *et al.* 1995; Brinkmann *et al.* 1996; Brown *et al.* 2001; Levy *et al.* 2002; Chu *et al.* 2002; Hajek *et al.* 2008; Feltenmark *et al.* 2008; Jeon *et al.* 2009; Mabalirajan *et al.* 2013; Larsson *et al.* 2014). Dafür sprechen vor allem die Stimulation der Expression des Enzyms durch IL-4 und IL-13 in Monozyten, die konstitutive Expression der ALOX15 in eosinophilen Granulozyten und in Alveolarepithelzellen.

Zusätzlich fanden Brown *et al.* (2001) eine Erhöhung der ALOX15-Aktivität durch II-4 und IL-13 in humanen Bronchialepithelzellen und Chu *et al.* (2002) beschrieben erhöhte 15S-HETE Konzentrationen im broncheoalveolaren Sekret von Asthmatikern, die mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelierten. Hajek *et al.* (2008) berichteten darüber, dass ALOX15-defiziente Mäuse gegenüber allergischer Sensibilisierung geschützt waren. Parallel dazu fanden sie einen starken Rückgang von 12(S)HETE, was bei ALOX15-defizienten Mäusen zu erwarten war. Diese Ergebnisse bestätigen die Befunde von Lundström *et al.* (2012) und Mabalirajan *et al.* (2013), die bei der Analyse des bronchioalveolaren Sekrets von atopischen Asthmatikern erhöhte ALOX15-Metabolite beobachteten.

Andersson *et al.* (2008) beschrieben eine Überexpression von IgE und erhöhte Konzentrationen von IL-4 und IL-13 in der broncheoalveolaren Lavageflüssigkeit von ALOX15-defizienten Mäusen. Es blieb aber weitgehend unklar, wie diese Ergebnisse zu interpretieren sind. Yin *et al.* (2010) fanden bei Kindern mit Asthma eine negative Korrelation zwischen ALOX15 mRNA-Gehalten sowie Lipoxin A_4 und der Schwere der Erkrankung. Auch hier kann nicht eindeutig

entschieden werden, ob diese Beobachtungen kausal miteinander verbunden sind und in welcher Reihenfolge sie in der Kausalkette einzuordnen sind.

Ein anderer wichtiger Pfad der Immunmodulation scheint durch die Peroxyprodukte der Phospholipidoxidation ausgelöst zu werden. Hammond *et al.* (2012) identifizierten neue Oxygenierungsprodukte membranaler Phospholipide in Bronchoalveolarzellen, die in einem Zusammenhang mit der Asthmapathogenese stehen könnten. Kang *et al.* (2014) analysierten bereits erhöhte Phospholipid-Spiegel bei Asthmapatienten im Vergleich zu Gesunden.

Ob Genpolymorphismen der ALOX15 bei der Genese atopischer Erkrankungen eine Rolle spielen, ist noch unklar. Während Sayers *et al.* (2003) zwischen Promoter-Polymorphismen von ALOX5 und Asthma keinen Zusammenhang fanden, könnten nach der Studie von Song *et al.* (2012) Polymorphismen der Promoter-Region des ALOX15-Gens an der Entwicklung von Atemwegserkrankungen mitwirken. Es gibt dazu aber bisher nur wenige wirklich vertrauenswürdige Studien (Sayers *et al.* 2003; Hansel *et al.* 2007; Song *et al.* 2012).

2. GEGENSTAND DER ARBEIT

2.1. Zielsetzung

Lipoxygenasen (LOXn) sind Schlüsselenzyme im Stoffwechsel ungesättigter Lipide. Sie spielen bei der Pathogenese atopischer Erkrankungen eine wichtige Rolle, da sie für die Biosynthese allergierelevanter Mediatoren bedeutsam sind. Entsprechend dieses Konzeptes könnten LOXn für die Prävention, die Diagnostik und die Therapie dieser Erkrankungen bedeutsam sein.

Beim Menschen exprimieren periphere Monozyten die ALOX15 nur in geringen Mengen. Durch *in vitro* Inkubation mit IL-4 kann die Expression des Enzyms aber stark induziert werden (Conrad *et al.*, 1992). Andererseits ist bekannt, dass Patienten, die an atopischen Erkrankungen leiden, häufig erhöhte IL-4-Spiegel im Blutplasma aufweisen (Matsumoto *et al.* 1994). Sollten die dabei erreichten IL-4-Konzentrationen hoch genug sein, müsste dies auch *in vivo* zu einer Induktion der Expression der ALOX15 in peripheren Monozyten führen.

Deshalb sollte in dieser Arbeit als Hauptfragestellung untersucht werden, ob bei Patienten mit einer Atopie als allergologischer Grunderkrankung die ALOX15 in peripheren Monoyzten verstärkt exprimiert wird. Daneben sollten drei weitere Fragen beantwortet werden:

- 1. Bei welchen Atopieformen (klinische Entitäten) kann ein erhöhter endogener IL-4-Spiegel in Blut nachgewiesen werden?
- Gibt es einen statistischen Zusammenhang zwischen erhöhten Plasma-IgE und erhöhten IL-4-Spiegeln bei verschiedenen Formen atopischer Erkrankungen?
- 3. Wird die ALOX15 bei Probanden mit atopischer Grunderkrankung durch IL-4 *in vivo* hochreguliert?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde von Patienten mit atopischen Erkrankungen Blut abgenommen und deren Plasmaspiegel an IgE und IL-4 quantifiziert. Weiterhin wurden aus dem Blut periphere Monozyten präpariert und die Expression der ALOX15 durch die Bestimmung ihrer katalytischen Aktivität getestet. Dazu wurden die Zellen in Anwesenheit von exogen zugesetzter Arachidonsäure für 15 Minuten inkubiert und die Menge sowie das Muster der Arachidonsäureoxygenierungsprodukte mittels HPLC quantifiziert. Die so erhaltenen Aktivitätswerte der zellulären Fettsäureoxygenierung sollten dann mit den gemessenen IgE und IL-4-Konzentrationen korreliert werden, um mögliche statistische Zusammenhänge zwischen den Messgrößen herzustellen.

2.2. Studiendesign

2.2.1. Patientenpanel

Die Teilnehmer der vorliegenden Studie wurden mit freundlicher Genehmigung von Frau Prof. Dr. Beate Tebbe (ehemals Abt. für Dermatologie des Universitätsklinikum Benjamin Franklin Berlin-Steglitz) sowie dem Universitätsklinikum Charité Berlin-Mitte aus Patienten, welche sich in dortiger ambulanter oder stationärer ärztlicher Behandlung befanden, rekrutiert. Diese Patienten erhielten eine umfangreiche mündliche und schriftliche Aufklärung und gaben ihre Einwilligung zu den Tests ab. Die Studienteilnehmer wurden zunächst in die Hauptgruppen der Atopiker und der Nichtatopiker, am Krankheitsbild orientierend, eingeteilt. Nach Akteneinsicht in die anamnestischen Daten der dermatologischen Patienten im Benjamin-Franklin-Klinikum Berlin und in der Charité Berlin wurden diese anhand ihrer klinischen Diagnosen verschiedenen Untergruppen, die zum Formenkreis der Atopie gehören, zugeordnet.

Die den Nichtatopikern (Kontroll-Gruppe / Control-Gruppe) zugeordneten Probanden besaßen keine der Atopie zugehörige Anamnese und zeigten keine Erhöhungen der IgE-Werte im Blut. Die den Atopikern zugeordneten Patienten besaßen überwiegend eine seit mehreren Jahren bestehende allergologische Anamnese und zeigten IgE-Wert-Erhöhungen von >100 kU/l. Ausgewählt wurden Patienten mit Rhinitis allergica, Atopischem Ekzem, Asthma bronchiale. Die Teilnehmerkollektive der beiden Untersuchungsgruppen der vorliegenden Case-Control Studie (Case-Gruppe: Atopiker; Control-Gruppe: Nichtatopiker) hatte folgende Zusammensetzung:

| - | Nichtatopiker (Control-Gruppe): | 44 Patienten (NA) |
|---|---------------------------------|-------------------|
| - | Atopiker (Case-Gruppe): | 81 Patienten (A) |

Hierunter folgende Krankheitsbilder der Atopie (Entitäten):

| - | Rhinitis allergica: | 46 Patienten (Rhinall) |
|---|---------------------|--------------------------|
| - | Asthma bronchiale: | 20 Patienten (Asthma) |
| - | Atopisches Ekzem: | 15 Patienten (Atopekzem) |

2.2.2. Versuchsplanung

Nach Vorversuchen wurde zunächst ein aktuelles Screening der IgE- und IL-4-Werte der Studienteilnehmer durchgeführt. Nach ihrem klinischen Erscheinungsbild wurden die Studienteilnehmer entweder der Gruppe der Atopiker (Case-Gruppe) oder der Gruppe der Nichtatopiker (Control-Gruppe) zugeordnet. Die Reanalyse der IgE- und IL-4-Werte der bekannten Patienten und die Erstanalyse der beiden Prüfgrößen der neu aufgenommenen Patienten erfolgte zur Definition der Ausgangssituation und legte damit den Grundstein der Verlaufsbeobachtung.

Die Bestimmung der IL-4-Plasmaspiegel erfolgte vor allem vor dem Hintergrund der Arbeitshypothese, dass IL-4 in peripheren Monozyten in der Lage ist, die Expression der ALOX15 zu induzieren. An verschiedenen Beispielen konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass die Expression der ALOX15 in Monozyten durch *in vitro* Inkubation in Gegenwart von IL-4 induziert wird. Bisher konnte ein solcher Induktionseffekt *in vivo* jedoch noch nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden.

Während der Studie kam es zu drop-outs wegen des Todes oder des Umzugs einiger Studienteilnehmer. Es wurden zusätzlich neue Probanden in den Hauptteil der Untersuchung mit eingeschlossen, welche zuvor hinsichtlich IgE-Werten und endogenen IL-4-Werten untersucht worden waren und die Einschlusskriterien erfüllten. Aufgrund ihrer klinischen Diagnosen wurden diese Patienten einer der beiden Gruppen (Atopiker, Nichtatopiker) zugeteilt.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

3.1.1. Geräte und Zubehör

HPLC-Säulen:

| Nucleosil 100-7 C18 (KS-System, 250 x 4 mm, 5µm Partikelgröße) | Macherey/Nagel, Düren, BRD |
|--|---|
| Nucleosil 100-7 5-C18 AB, Zorbax Sil 4 (MN- Nucleosil-50-7, 250 mm x 4,6 mm, 5µm Partikelgröße) | Macherey/Nagel, Düren, BRD |
| Chiracell OD (4, 6x 150 mm, 5µm Partikelgröße) | Daicell Chemical Industries, Osaka, Japan |
| Liquid-Chromatograph LC-6A | Shimadzu, Japan |
| 1040A-HPLC-Detection –System | Hewlett-Packard GmbH Böblingen, BRD |
| Auto-Injektor SIL-10 AXL | Shimadzu, Japan |
| Communications Bus Modul CBM-10 A | Shimadzu, Japan |
| Liquid-Chromatograph LC-!0 AT | Shimadzu, Japan |
| Dioden Array Detektor SPD-M10 AVP | Shimadzu, Japan |
| Die benutzten Gasgeräte wurden vor Benutzung mit einer | Chloroformspülung gereinigt. |
| Rotationsverdampfer Typ B-168 | Büchi, Flawil, Schweiz |
| Wasserbäder | Julabo Labortechnik und MGW Biotech, ABI Prism |
| Ultraschallbad Sonorex Super Typ RX 512H | Badelin, Berlin, BRD |
| Ultraschallgenerator Typ 853972/3 Labsonic U | Braun, Melsungen, BRD |

| Sterilfilterhalter, 0,2µm FP 030/3 | Schleicher und Schuell, Dassel, | |
|--|---------------------------------|--|
| | BRD | |
| Coulter-Counter | Beckmann Coulter GmbH, | |
| | Krefeld, BRD | |
| Thermocycler Biometra TRIO-Thermoblock | Biometra, Göttingen, BRD | |
| Transiluminator | Biometra, Göttingen BRD | |
| Elektrophoresekammern | Amersham Pharmacia Biotech, | |
| | Freiburg | |
| Brutschränke | Heraeus, Hanau, BRD | |
| Photometer | Shimadzu, Japan | |

3.1.2. Chemikalien

Die aufgeführten Feinchemikalien wurden bezogen von:

| Chemikalien | Firma/ Firmensitz |
|--|--|
| Arachidonsäure (AA) Dimethylsulfoxid (DMSO) Penicillin und Streptomycin | Sigma-Aldrich, Deisenhofen, BRD |
| Chloroform Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Merck, Darmstadt, BRD |
| Tris (Hydroxymethy)-Aminomethan | Boehringer Mannheim, BRD |
| HPLC-Standards: 5-HETE (R und S-Isomer) 12-HETE (R und S-Isomer) 15-HETE (R und S-Isomer) | Cayman Chemical Company, USA oder Cayman Chemicals, Vertrieb über Alexis Deutschland GmbH, Grünberg |
| Agarose | Promega Mannheim, BRD |

| Chemikalien | Firma/ Firmensitz |
|--|-----------------------------------|
| dNTP-Lösung (Desoxyribonukleinsäurelösung) | Roth Karlsruhe, BRD |
| Ethidiumbromid | |
| Kaliumhydroxidlösung | |
| Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) | Life Technologies, Eggenstein, |
| Dulbecco's PBS | BRD |
| Essigsäure | J.T. Baker, Deventer, Niederlande |
| Isopropanol | |
| Methanol | |
| Hexan | |
| human interleukin-4 (IL-4) | R&D Systems GmbH, Wiesbaden |

Die verwendeten Lösungsmittel Essigsäure, Isopropanol, Methanol und Hexan entsprachen HPLC-Qualität. Weitere Chemikalien entsprachen der Reinheitsstufe *p.A. (pro analysis)* und stammten von Merck.

Puffer:

| 1x TAE-Puffer: | 40 mM Tris |
|--|--------------------------|
| | 29,6 mM Essigsäure |
| | 2 mM EDTA |
| | pH 7,8 |
| 10x Lade-Puffer für die 50% Glycerol Gel- Elektrophorese: | 0,1 M EDTA |
| | 1% SDS |
| | 0,1 % Bromphenolblau |
| | PH 7,0 bei 25°C bei EDTA |

<u>Primer:</u> Oligo-dT-Primer, mit welchen in Vorversuchen und im Hauptversuch gearbeitet wurde. Ausgewählte Sequenzen siehe Kapitel 3.2.10.1

| GAPDH-92 | | |
|-------------|----------------------------|--------------------------|
| GAPDH-612 | | |
| H15 LO 453 | Humane 15 Lox | |
| H15 LO 975 | | |
| H15 LO 543 | | |
| H15 LO 146 | | |
| HP12 LO 472 | Humane Plättchen 12 Lox | entsprechend Nadler 1995 |
| HP12 LO 610 | | Biotez Berlin |
| P12 LO 145 | Schweine-Leukozyten 12 Lox | |
| P12 LO451 | | |
| HLX01H | | |
| HLX1933 HB | | |
| HLX1972R | | |
| HLX2622R | | |
| LOX UniH1 | | |

3.1.3. Enzyme, Kits und Sonstiges

| ELISA Testkit | Sigma Aldrich Biochemie GmbH Hamburg, |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| | BRD |
| Human monocyte cDNA library | Clontech, Saint-Germain-en-Laye, |
| | Frankreich |
| QIAquick PCR Purification Kit | Qiagen, Hamburg, BRD |
| QIAEX II Gel Extraction Kit | Qiagen, Hamburg, BRD |
| QIAGEN Plasmid Mini/Maxi Kit | Qiagen, Hamburg, BRD |
3.1.4. Soft- und Hardware

Hewlett Packard Microsoft Office 2000 SPSS Version 12,0

3.1.5. Probenmaterial und Probengewinnung

a) Studienteilnehmer: Die Blutentnahmen wurden nach Aufklärung und Einwilligung der Probanden, die sich in ambulanter oder stationärer ärztlicher Behandlung befanden, mit freundlicher Genehmigung von Frau Prof. Dr. Beate Tebbe (ehemals Abt. für Dermatologie des Universitätsklinikum Benjamin Franklin Berlin-Steglitz) im Benjamin-Franklin Klinikum sowie dem Universitätsklinikum Charité Berlin-Mitte durchgeführt.

Im Rahmen einer vergleichenden Studie wurden neben den Probanden mit einer Erkrankung aus dem atopischen Formenkreis (Atopiker), Probanden ohne Atopie (Nichtatopiker) zur einmaligen oder auch mehrfachen Blutentnahme nach einem festgelegten Schema herangezogen.

Unter den Krankheitsbildern der atopischen Patienten waren vor allem Folgende vertreten: Rhinitis allergica, Atopisches Ekzem, Asthma bronchiale (siehe Anhang 1: Patientendaten).

| - | Nichtatopiker (Control-Gruppe): | 44 Patienten (NA) |
|---|---------------------------------|-------------------|
| - | Atopiker (Case-Gruppe): | 81 Patienten (A) |

Hierunter folgende Krankheitsbilder der Atopie (Entitäten):

| - | Rhinitis allergica: | 46 Patienten (Rhinall) |
|---|---------------------|--------------------------|
| - | Asthma bronchiale: | 20 Patienten (Asthma) |
| - | Atopisches Ekzem: | 15 Patienten (Atopekzem) |

b) Monozyten: Für die Isolierung der peripheren Monozyten wurde den Patienten jeweils 20 ml Vollblut entnommen. Die venöse Blutentnahme erfolgte bei nicht nüchternen Probanden nach Stauung am linken Oberarm und dreimaliger Hautdesinfektion aus der Cubitalvene in einem Punktionswinkel von ca. 30 Grad in heparinisierte Monovetten (50 U/ml), welche einer unverzüglichen Weiterbearbeitung (Plasmagewinnung und Monozytenpräparation) zugeführt wurden. c) Blutplasma: Jeder der Vollblutproben wurde vor der Präparation der Monozyten 2 ml Blut zur Gewinnung von Blutplasma für die Analyse der IL-4- und IgE- Spiegel entnommen und asserviert. Zur Trennung des Blutplasmas von den restlichen zellulären Bestandteilen des Blutes wurden die gewonnenen 2ml Vollblut in Eppendorfgefäßen 10 Minuten lang bei 5000 rpm und einer Temperatur von 4°C in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand an Blutplasma wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -80°C bis zur nachfolgenden experimentellen Untersuchung der Interleukin- und Immunglobulinspiegel aufbewahrt.

3.2. Methoden

3.2.1. Isolierung und Kultur peripherer Blutmonozyten

Durch die Präparation der Blutzellen nach dem folgenden Protokoll gelingt die Isolierung humaner Monozyten aus Vollblutproben unter weitgehendem Erhalt ihrer zellulären nach Funktionalität Integrität. Die Isolierung erfolgt dem Prinzip und der Dichtegradientenzentrifugation über ein Lymphozytentrennmedium und nachfolgender selektiver Adhäsion an eine Kunststoffoberfläche. Für die Zellpräparation wurden zwei unterschiedliche Kulturmedien benötigt.

- Medium 1: RPMI 1640, 10% humanes AB-Serum, 100 U/ml Penicillin, 100µg Streptomycin
- Medium 2: RPMI 1640, 10% FCS, 0,3 g/l Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

Heparinisiertes Vollblut (20 ml) wurde im Verhältnis 1:2 (v/v) mit HBSS durch Schwenken vorsichtig vermischt und langsam in sterilen Polypropylenröhrchen mit 15 ml Ficoll Paque (Pharmacia, Dichte 1.077g/ml) unterschichtet, so dass zwei Phasen entstanden. Mit einer Heraeus Zentrifuge (24 Place Microlitre centrifuge, 13000RPM, 16060 x g) wurden die Proben bei 1500U/min 30 Minuten und 12°C ohne Abbremsen zentrifugiert. Die durch die Dichtegradientenzentrifugation entstandene obere Schicht enthielt vorrangig Blutplasma und die Mehrzahl der Thrombozyten. Diese wurde verworfen. Die medial als Interphase entstandene leukozyten- und monozytenhaltige Grenzschicht wurde mittels einer Pipette abgesaugt und in eine mit 5 ml HBSS aufgenommen wurde. Bei Raumtemperatur wurde zum Waschen und Sedimentieren der weißen Blutzellen erneut mit der Heraeus-Zentrifuge bei 2500 U/min 10

Minuten und 12°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgten die Resuspension des entstandenen Pellets in HBSS und die Zentrifugation bei 1500 U / min über 10 min. Dieser Waschschritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Dadurch gelang die Abtrennung restlicher verunreinigender Thrombozyten von den mononukleären Zellen. Im Anschluss wurde das Pellet in 2 ml Medium 1 aufgenommen.

Die gewonnene Zellsuspension wurde in eine sterile Zellkulturschale überführt und im Brutschrank bei 37 °C unter 5 %-iger CO₂ - Sättigung für 2 Stunden inkubiert. Unter diesen Bedingungen kam es zur Adhäsion der Monozyten an die Zellkulturschale, während die verunreinigenden Lymphozyten im Kulturüberstand verblieben. Nach der zweistündigen Inkubation wurden nicht adhärente Zellen durch dreimaliges, gleichmäßiges Waschen mit sterilem PBS entfernt. Die Monozyten wurden nachfolgend in Medium 2 aufgenommen und bei 37° C für vier Tage in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von IL-4 kultiviert. Zuletzt wurden die Zellen vom Medium geerntet und gleichmäßig auf zwei neue Kulturschalen verteilt.

3.2.2. Induktion der Expression der monozytären ALOX15 mit IL-4

Einer der Monozytenkulturen wurden jeweils 10 ng/ml humanes rekombinantes IL-4 (je nach Untersuchungsaufgabe) zugesetzt, um eine Induktion der ALOX15 Expression einzuleiten. Die andere Kultur diente als unbehandelte Kontrolle. Die Inkubationszeit betrug 96 Stunden. Alle 24 Stunden wurde das Nährmedium in den Kulturschalen unter sterilen Bedingungen erneuert und mit frischem Interleukin-4 versehen. Am Ende der Inkubationszeit wurde das Medium durch dreimaliges Waschen von den geernteten Zellen getrennt. Die Zellen wurden in 1 ml Dulbecco's PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ mit einem Falcon- Zellschaber Typ 35/3086 geerntet, resuspendiert und gezählt. Für die Quantifizierung der Monozyten wurden 20 µl der Zellpräparation separiert. Die Zellzählung erfolgte standardisiert in einer Neubauer-Zählkammer unter Auszählung von 8 Quadraten und Berechnung der Medianwerte der Gesamtzellzahl bzw. mittels eines Coulter-Counters.

3.2.3. ALOX15-Aktivitätsbestimmung

3.2.3.1. Aktivitätsessay mit Arachidonsäure

Für den *ex vivo* Aktivitätsessay wurden die präparierten Zellen mit Hilfe von Ultraschall (15 s mit Labsonic U der Firma Braun, Stufe 4) lysiert und anschließend mit peroxidfreier Arachidonsäure (AA), Endkonzentration 160 μ M, für 15 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von ca. 1 mg Natriumborhydrid gestoppt. Durch diesen Vorgangsschritt wurden die entstandenen Hydroperoxyfettsäuren zu stabileren Hydroxiden reduziert. Dieser aufgearbeitete Reaktionsansatz wurde nun der Lipidextraktion nach Bligh und Dyer zugeführt.

3.2.3.2. Lipidextraktion nach Bligh und Dyer

Mit der Methode nach Bligh und Dyer (Bligh und Dyer, 1959) ist es möglich, Lipide aus einem wässrigen System unter gleichzeitiger Abtrennung von Salzen, Aminosäuren, Kohlenhydraten und anderen nicht zu den Lipiden gehörenden Stoffen, zu extrahieren. Dem Inkubationsansatz (1 ml) werden nach dem Stopp der Reaktion 1,25 Volumenteile (1,25 ml) Chloroform und 2,5 Volumenteile (2,5 ml) Methanol zugesetzt und 1 Minute lang geschüttelt. Nach einer Einwirkzeit von 15 Minuten bei 4°C wurden zum Ansatz noch einmal 1,25 Volumenteile Chloroform (1,25 ml) und 1,25 Volumenteile (1,25 ml) Wasser zugesetzt und wiederum 1 Minute lang geschüttelt. Dabei entstanden zwei deutlich sichtbare Phasen. Zur Phasentrennung wurden die Proben in der Zentrifuge 5 Minuten lang bei 3000 rpm (revolution per minute) zentrifugiert. Die wässrige und organische Phase trennten sich deutlich und die präzipitierten Proteine sammelten sich zwischen den beiden Phasen an. Die untere Chloroformphase enthielt die Lipide, welche unter Nutzung einer langen Kanüle abpipettiert wurden. Das organische Lösungsmittel wurde anschließend im Rotationsverdampfer verdampft und die rückständigen Lipide in 0,8 ml Methanol aufgelöst.

3.2.3.3. Alkalische Hydrolyse der Esterlipide

Mittels der milden alkalischen Hydrolyse können Esterbindungen in den zuvor gewonnenen Lipiden aufgespalten werden, wobei freie Fettsäuren entstehen. Die in Methanol befindlichen veresterten Lipide wurden dazu mit 150 µl Kaliumhydroxidlösung (KOH 40% ig) versetzt und 20 Minuten lang bei einer Temperatur von 60 °C in einem Wasserbad inkubiert. Zum Stoppen der Hydrolyse wurde der Reaktionsansatz auf 0 °C abgekühlt und mit 120 µl konzentrierter Essigsäure neutralisiert. Um eine artifizielle Oxidation der Fettsäuren während der Aufarbeitungsprozedur zu vermeiden, wurde die Hydrolyse unter einer Argonatmosphäre durchgeführt, die den Zutritt atmosphärischen Sauerstoffs unterband.

3.2.4. High-Performance-Liquid-Chromatographie (HPLC)

Zur Analyse der entstandenen Hydroxyfettsäurederivate ist die HPLC (High Performance Liquid Chromatography) methodisch etabliert und fand in dieser Studie Anwendung. Es erfolgte eine Analyse entsprechend den bekannten chromatographischen Eigenschaften der Hydroxyfettsäuren (Wiesner *et al.* 1993). Die in den Proben als Primärprodukt der enzymatischen Lipidperoxidation entstandenen Hydroperoxyfettsäuren sind in ihrer Eigenschaft durch Instabilität gekennzeichnet und werden in Organismen schnell durch ablaufende Reduktionsprozesse in ihre entsprechenden Hydroxyfettsäurederivate umgewandelt. Um sicher zu gehen, dass alle gebildeten Hydroperoxyfettsäuren in die stabileren Fettsäuren umgewandelt worden sind, wurden restliche Hydroperoxyfettsäuren mit Natriumborhydrid im Vorfeld der HPLC reduziert.

3.2.4.1. Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC)

Nach der milden alkalischen Hydrolyse werden die bei der Hydrolyse entstandenen Produkte durch eine Umkehrphasen-HPLC getrennt. Diese RP-HPLC bietet den Vorteil, dass auch unsaubere Lipidextrakte bzw. Hydrolysatansätze direkt analysiert werden können. Dies ist mit anderen HPLC-Methoden, z.B. der Normalphasen-HPLC, nur schwer möglich. In unserer Analysehierarchie diente die RP-HPLC vor allem der Trennung und Quantifizierung der HETE-Positionsisomere.

Diese Verbindungen tragen ein konjugiertes Diensystem, dessen Extinktionsmaximum bei λ =235 nm liegt. Mittels einer Online-Aufzeichnung an der HP-Chemstation durch einen hochempfindlichen HP 1040A Dioden-Array-Detektor konnte zu jedem Zeitpunkt des chromatographischen Trennprozesses das komplette UV-Spektrum des Eluats der Nucleosil C18-Säule (250 mm x 4,6 mm, 5µm Partikelgröße, Macherey & Nagel, Düren) in einem Wellenlängenbereich zwischen 200 – 400 nm online aufgezeichnet werden. Die HPLC-Säule stellte dabei die stationäre Phase des chromatographischen Systems dar. Als mobile Phase wurde ein Methanol/Wasser/Essigsäure-Gemisch im Verhältnis 85:15:0,1 (v/v/v) verwendet. Die Flussrate betrug konstant 0.8 ml/min. Zur Identifizierung der Substanzen dienten die jeweiligen Retentionszeiten und das UV-Spektrum (Abb. 6). Vor dem Probenauftrag wurde ein authentischer Standard (15S-HETE) des zu erwartenden Hydroxyfettsäurederivats analysiert. In Abb. 6 ist ein Musterchromatogramm der RP-HPLC Analyse von Hydroxyfettsäuren dargestellt. In diesem Fall wurden J774A.1 Maus Makrophagen mit der murinen ALOX15 transfiziert und anschließend mit Arachidonsäure inkubiert. Das Oxygenierungsprodukt der Arachidonsäure

durch die humane ALOX15 (15-HETE) weist eine ähnliche Retentionszeit auf. Die chemische Identität der eluierten 12-HETE wird durch das typische UV-Spektrums der konjugierten Diene mit einem Absorptionsmaximum bei 235 nm (Insert) bestätigt.



Abbildung 6:Musterchromatogramm zum Nachweis von Hydroxyfettsäuren mttels RP-HPLC
Zur Erstellung des Chromatogramms wurden kultivierte Mausmakrophagen (J774A.1 Zellen) mit
der murinen Alox15 (12-lipoxygenierendes Enzym) transfiziert und anschließend mit
Arachidonsäure (160 μM) für 15 min inkubiert. Das dabei gebildete 12-HETE wurde mit einer
Retentionszeit von ca. 10 min von der Säule eluiert, Flussrate 0,8 ml/min.

Die durch RP-HPLC identifizierten HETE-Isomere wurden für weitere Untersuchungen aufgefangen. Nach Verdampfung des Lösungsmittels wurden die Proben in 200 µl Laufmittel der Normalphasen-HPLC gelöst und anschließend weiter analysiert (z.B. durch SP-HPLC). Die Quantifizierung der Hydroxyfettsäuren erfolgte über die Integration der Fläche der aufgezeichneten Peaks und über den Vergleich mit den zuvor ermittelten Eichkurven.

3.2.4.2. Normalphasen-HPLC (SP-HPLC)

Bei der RP-HPLC können zwar einige HETE-Isomere (z.B. 15-HETE, 12-HETE, 5-HETE) voneinander getrennt werden, für andere Isomere (z.B. 11-HETE, 9-HETE, 8-HETE) trifft dies jedoch nicht zu. Diese kritischen Isomeren können jedoch mittels SP-HPLC aufgelöst werden. Aufgabe der Normalphasen-HPLC ist es, die in der RP-HPLC nicht sicher trennbaren Positionsisomere sicher voneinander abzugrenzen. Die stationäre Phase bildete dabei eine Zorbax SIL Kieselgelsäule (MN-Nucleosil-50-7, 250 mm x 4,6 mm, 5µm Partikelgröße,

Macherey & Nagel, Düren). An der HP-Chemstation erfolgte die Analyse mittels des SPD-M6A-Detektors von Shimadzu. Als Laufmittel diente n-Hexan/2-Propanol/Essigsäure (100:2:0,1 v/v/v). Die Flussrate betrug konstant 1,0 ml/min. Die 15-HETE- oder 12-HETE enthaltenden HPLC-Fraktionen wurden aufgefangen, im Rotationsverdampfer eingeengt und für die Folgeuntersuchung in Hexan aufgelöst.

3.2.4.3. Chiralphasen-HPLC (CP-HPLC)

Zur Analytik der Enantiomere wurden die in der SP-HPLC aufgefangenen Proben der Chiralphasen-HPLC an der Chemstation, versehen mit einem SPD-M6A-Detektor der Firma Shimadzu, zugeführt. Durch die Verhältnisse der R-und S-Enantiomere der Hydroxyfettsäuren zueinander ist es möglich, die Beteiligung der ALOX15 an der Lipidperoxidation genauer zu beurteilen. Bei der enzymatischen Lipidperoxidation entstehen Reaktionsprodukte, bei denen ein Enantiomer (entweder das S- oder das R-Isomer) im großen Überschuss gebildet wird. Im Gegensatz dazu ist das Produktmuster einer nicht-enzymatischen Lipidperoxidation durch ein razemisches Produktspektrum (Gleichverteilung von S- und R-Isomer) gekennzeichnet. Als stationäre Phase wurde die Chiracel-OD-Säule (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m Partikelgröße, von Diacel Chem. Industries USA, vertrieben durch Baker, Groß-Gerau) für die Analyse der 15 Soder R-Enantiomere (optische Isomere) eingesetzt. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Hexan/Isopropanol/ Essigsäure (100:5:0,1 v/v/v). Die Flussrate des Eluentengemisches lag konstant bei 1ml/min. Die Detektionswellenlänge λ betrug 235 nm detektiert.

3.2.5. Quantifizierung der Hydroxyfettsäuren

Anhand der zuvor aufgenommenen Standardeichkurve (8-Punkte-Skalierung) für die Hydroxyfettsäuren war es möglich, die Fettsäuren anhand des Vergleichs der integrierten Peakflächen der RP-HPLC mit den Eichkurven der Standardsubstanzen unter den gleichen Versuchsbedingungen zu quantifizieren.

3.2.6. IL-4-Analyse Biotrak ELISA

Die Konzentration von IL-4 im Blutserum der Studienteilnehmer wurde unter Anwendung des ELISA-Testkits der Firma BIOTRAK entsprechend der Gebrauchsanweisung ermittelt. ELISA Tests (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) stellen ein immunologisches Nachweisverfahren dar, welches auf einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion beruht und durch eine stöchiometrische Farbreaktion quantifizierbar wird. Das Biotrak ™ Interleukin-4 ELISA-System von GE Healthcare ermöglicht eine spezifische und präzise quantitative Bestimmung von IL-4 in Zellkulturüberständen und Serum. Das verwendete System basiert auf einem Festphasen-ELISA, der einen Antikörper gegen IL-4 verwendet, welcher in den Vertiefungen einer Mikroplatte (12 x 8 und Streifenformat) gebunden ist. Der Immunoassay kann mit rekombinantem IL-4, welches dem Testkit beigefügt ist, geeicht werden. Das System erkennt dabei sowohl rekombinantes als auch natives IL-4 mit hoher Sensitivität.

Zusammenfassung des Assayprinzips:

Der Test basiert auf der quantitativen "Sandwich" Enzym Immunassay-Technik. Ein monoklonaler Antikörper gegen humanes IL-4 wird auf den Boden einer Mikroplatte aufgetragen und kovalent mit dem Plastikmaterial vernetzt. Proben werden in die Vertiefungen mit der Pipette eingebracht, und das IL-4, falls vorhanden, durch die immobilisierten Antikörper gebunden. Nachdem alle nicht gebundenen Probenproteine weggespült wurden, wird ein löslicher Enzym-gekoppelter Antikörper gegen humanes IL-4 in die Vertiefungen gegeben, der sich nun an das arretierte IL-4 binden kann, welches während der ersten Inkubation immobilisiert wurde. Nach einer Spülung zur Entfernung aller ungebundenen enzymligandierten Antikörper wird ein farbloses Substrat für das am zweiten Antikörper gebundene Enzym in die Vertiefungen gegeben. Als Konsequenz der enzymatischen Reaktion zeigt sich eine Verfärbung der Lösung, deren Intensität direkt proportional zu der in der Analysenprobe vorhandenen IL-4-Konzentration ist. Zusätzlich zu den zu testenden Proben wird eine Reihe von Proben mit bekannten Konzentrationen des IL-4-Standards versetzt und zur Erstellung einer Eichkurve mit dem gleichen Versuchsprotokoll quantifiziert, bei welcher die Farbintensitätsunterschiede gegen die IL-4-Konzentrationen aufgetragen werden. Die Extinktion wird mit einem Mikrotiterplatten-Spektralphotometer Multiscan Go (Thermo Scientific) bestimmt.

3.2.7. Gesamt-IgE-Bestimmung IMMULITE-Testsystem

Die IgE-Spiegel wurden mittels eines Immulite–Testsystems von DPC Biermann quantifiziert. In Vorbereitung der Testung wurde eine Kalibrierkurve erstellt. Der IgE-Kalibrator enthielt einen in zwei Konzentrationen im Barcode des Kits gespeicherten Sollwert. Das Verfahren selbst basiert auf einem Festphasen-Chemilumineszenz-Enzymimmunoassay. Hierzu wird das barcodierte IgE-Reagenzmodul in ein Reagenzienkarussell platziert und die barcodierten Reagenziendaten eingelesen. Das Reagenzienmodul beinhaltet polyklonale Ziegen-IgE-Antikörper, die mit alkalischer Phosphatase konjugiert sind. 5µl der Probe wurden bei Raumtemperatur in barcodierte Polysterolkugeln befinden. Die Probenröhrchen werden nachfolgend in den Probenträger gestellt und in die Ladestation eingesetzt. Bei Proben mit IgE-Werten über 2000 IU/ml wurde eine Verdünnung mit gebrauchsfertigem IgE-Verdünnungspuffer und eine erneute Bestimmung vorgenommen. Mäßige Hämolyse der Proben und Billirubin haben keinen signifikanten Einfluss auf die Bestimmung.

3.2.8. RNA-Präparation

Die mRNA der monozytären ALOX15 wurde durch quantitative RT-PCR (Reverse Transkriptase - Polymerase Chain Reaction) unter Verwendung von enzymspezifischen Oligonukleotiden (PCR Primern) quantifiziert.

3.2.8.1. Vorgehensweise mittels RNA Testkit

Die kultivierten Monozyten aus der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen nach 3 Tagen geerntet, drei Mal mit Dulbecco's PBS-Lösung (ohne Kalzium und Magnesium) gewaschen und gezählt. Dabei wurden nur Zellpakete (Pellets), welche über 10⁶ Zellen beinhalteten, zur Gewinnung ausreichender RNA-Mengen für die PCR berücksichtigt.

Zur RNA-Isolierung wurde von Qiagen der "RNeasy Minikit" eingesetzt und gemäß Gebrauchsanweisung die Monozyten-RNA unter RNasefreien Versuchsbedingungen präpariert. Dies setzte die Arbeit mit Handschuhen, sterilen Pipettenspitzen, Eppendorfgefäßen, die Hitzesterilisation aller Glas- und Metallartikel voraus. Alle Lösungen wurden mit RNAsefreien Reagenzien hergestellt und mit DEPC-Wasser angesetzt. Die gewonnene Total-RNA wurde nach Lyse und Homogenisierung der Zellen an RNeasy-Silokongel-Säulen gebunden und konnte in reiner Form eluiert werden.

3.2.8.2. Quantifizierung der RNA

Die Konzentration an Gesamt-RNA wurde mittels der Extinktionsbestimmung in Küvetten aus Quarzglas am UV-Spektrophotometer der Firma Shimadzu quantifiziert. Dazu wurden jeweils 4 Mikroliter der Probe mit RNA-freiem Wasser im Verhältnis 1:100 verdünnt. Die Extinktion (E) der Probe wurde bei den Wellenlängen 260 und 280 nm gemessen. Dabei entspricht eine Absorption von 1 bei 260 nm einer RNA-Konzentration von 40 Mikrogramm/ml. Die Verunreinigung der **RNA-Präparation** mit Proteinen, welche bei 280 nm ihr Absorptionsmaximum erreichen, können über den Quotienten der Extinktionen bei 260 nm und bei 280 nm bestimmt werden. Bei reinen Proben wird ein Quotient von > 2 erwartet, empfohlen wurden Werte für E260/E280 zwischen 1,5 und 1,9.

3.2.9. Reverse Transkription

Die aus den Monozyten isolierte RNA wird mittels der reversen Transkription unter Nutzung der Reverse Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben. Für die reverse Transkription der RNA wurde eine RNA-abhängige DNA-Polymerase aus dem Avian Myeloblastosis Virus (AMV) benutzt. Es wurde folgender Puffer verwendet:

250 mmol/l Tris/HCl, ph 8,5 bei 20°C, 40 mmol/l MgCl2, mmol/l DTT, 40 mmol/l KCl. 3µg RNA wurden in ein Gesamtvolumen von 45µl überführt und in cDNA umgeschrieben. 3µg Gesamt-RNA, 150 pmol Oligo-dT-Primer, DEPC-Wasser ad 21 µl wurden für 4 min auf 72° C erhitzt, anschließend auf 37 °C abgekühlt. Danach wurden 3µl dNTP (166 µmol/l Endkonzentration), 9µl 5x RT-Puffer 0,45 BSA, DEPC-Wasser ad 24 µl, 30 U RNase-Inhibitor und 5 U AMV-RT für 4 min im Thermoblock auf 37°C erwärmt und zum RNA/Primer-Ansatz hinzu pipettiert. Nun wurde für 90 min bei 37° C inkubiert, 10 min bei 94°C denaturiert, sofort auf Eis gekühlt und bei –20 ° C gelagert. Der Primer bindet spezifisch an das PolyA-Ende der mRNA und induziert den Reaktionsablauf.

3.2.10. Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der zyklischen Amplifikation (Vervielfältigung) eines DNA-Segments, auch Template genannt, durch eine hitzebeständige DNA-Polymerase (häufig Taq-Polymerase) unter Verwendung von ALOX15-spezifischen Primermolekülen.

3. Materialien und Methoden

3.2.10.1. Primersequenzen

Für den Nachweis der ALOX15 mRNA sind spezifische DNA- Primer erforderlich, welche keine Strukturhomologien zu den Sequenzen andrer LOX-Isoformen aufweisen dürfen. Für die Untersuchungen wurden deshalb die 15-LOX-Primer nach Funk verwendet (Funk *et al.* 1991).

Forward-Primer: 15-LOX-Primer 543: 5'-Primer: 5'- GGGGCTGGCCGACCTCGCTATC-3' AT: 71°C Reverse-Primer: 15-LOX-Primer 975: 3'-Primer: 5'-TCCTGTGCGGGGCAGCTGGAGC-3' AT: 71°C GAPDH-Primer 92: 5'-Primer: 5'-TCGGAGTCAACGGATTTGGTCGTA-3' AT: 66°C GAPDH-Primer 612: 3'-Primer: 5'-ATGGACTGTGGTCATGAGTCCTTC-3' AT : 66°C

Der Standart-PCR-Ansatz für die ALOX15 PCR setzte sich wie folgt zusammen: 18,75 µl H2O 0,75 µl 50mM MgCl2 2,5 µl 10x PCR-Puffer 1µl 10µM Hinprimer 1µl 10 µM Rückprimer 0,5 µg Template DNA 0,25 µl Taq-Polymerase, Konzentration 5U/µl (von InViTec)

Die Annealing-Temperaturen (AT) wurden nach der Formel Tm= $69,3^{\circ}C+ 41x(GC\%) - 650/Primerlänge+ 3^{\circ}C$ abgeschätzt. Die Annealing-Temperaturen wurden für die PCR so gewählt, dass sie mindestens 5^{\circ}C unter den Schmelzpunkten (Tm-Werte) liegen. Die PCR-Bedingungen orientierten sich am Protokoll von Kramer und Coen 1995.

3.2.10.2. Qualitative PCR

Zur semi-quantitativen Abschätzung der zellulären Konzentration der ALOX15 mRNA wurden die Amplifizierungsprodukte RT-PCR wurden mittels Agarose-Elektrophorese analysiert und die Bandenintensität quantifiziert. Die Elektrophorese erfolgte in einem 2 %igem Agarosegel (2g Agarose in 100 ml 1xTAE-Puffer) bei einer Stromstärke von 56 mA mit 1xTAE Laufpuffer. Pro

3. Materialien und Methoden

Gelspur wurden 9µl PCR-Produkt und 1µl 10x Ladepuffer in die Geltaschen pipettiert. Anschließend wurde das Gel mit 0,5µg/ml Ethidiumbomid-Lösung angefärbt. Als Längenstandard wurden folgende Marker der Firma New England BioLab benutzt: 100 bp-DNA-MG-Marker 1kb-DNA-MG-Marker

Puffer:
50x TAE-Puffer:
242,2 g Tris, 57 ml Eisessig, 100 ml 0,5 mol/l EDTA, pH 8,0. ad 1 L bidestilliertes H2O.
10 x Ladepuffer:
50 % Glycerol, 0,1 mol/l EDTA, pH 7,0, 1% SDS, 0,1% Bromphenolblau.
Filtration (0,45µm Filter)

Durch Interkalation des Ethidiumbromids in den Doppelstrang der DNA ist es unter UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm möglich, die fluoreszierende Bande der amplifizierten DNA-Moleküle sichtbar zu machen und mit den Fragmentlängen des parallel aufgetragenen DNA-Längenstandards zu vergleichen.

3.3. Statistische Analyse

Zur Erhebung statistischer Daten wurde die Software SPSS Version 12,0 genutzt. Die explorative (deskriptive) Datenanalyse ermöglicht die Berechnung von Maßzahlen der Lage und Streuung als Charakteristika der Verteilung von Merkmalsausprägungen und damit die Bewertung von Ausreißern und Boxplots sowie das Darstellen von Zusammenhängen zwischen zwei Merkmalen und Verteilungsvergleiche (Campbell and Machin, Medical Statistics: a commonsense approach, John Wiley and Sons, Chichester, 1993). Die danach durchgeführte konfirmatorische Datenanalyse (Interferenz-Statistik) erlaubt die Überprüfung, ob die Daten eine zuvor aufgestellte Hypothese (Nullhypothese) stützen oder nicht, so dass von einer Alternativhypothese auszugehen ist. In Abhängigkeit von der Irrtumswahrscheinlichkeit wurde die Nullhypothese durch die Berechnung von p angenommen oder abgelehnt, wobei bei p < 0,05 von einem signifikanten Unterschied ausgegangen werden kann.

Da die Skalierung der Daten metrisch war und keine Normalverteilung vorlag, wurden für voneinander unabhängige Variablen der U-Test nach Mann-Whitney und der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Der U-Test nach Mann-Whitney (Mann-Whitney-Test) prüft auf Lageunterschiede zwischen den Populationen und setzt allgemein ordinalskalierte Merkmale voraus. Der Kruskal-Wallis-Test betrachtet Vergleiche von mehreren Stichproben untereinander in Form einer Varianzanalyse. Der Wilcoxon-Test, ein nichtparametrischer Test, wurde bei der Analyse abhängiger oder verbundener Stichproben eingesetzt (Wernecke 1995).

4. ERGEBNISSE

4.1. Zusammenhänge zwischen IgE-, IL-4 und HETE

4.1.1. Mögliche Korrelation zwischen IgE- und IL-4-Plasmaspiegeln bei Atopikern und Nichtatopikern

Im Rahmen einer Voruntersuchung wurde zunächst das Blutplasma von insgesamt 100 gesunden Probanden bzw. Patienten mit Erkrankungen des atopischen Formenkreises gesammelt (unter Aufsicht von Herrn Dr. S. Nigam, Benjamin-Franklin-Klinikum). Ziel dieser Voruntersuchung war es herauszufinden, ob ein statistischer Zusammenhang zwischen den Plasmaspiegeln an IgE und IL-4 besteht, unabhängig davon, ob die Werte bei Atopikern oder gesunden Probanden (Normalpersonen/Nichtatopikern) quantifiziert wurden. Es sollte damit geklärt werden, ob unabhängig von einer atopischen Erkrankung ein monotoner statistischer Zusammenhang zwischen den Plasmaspiegeln an IL-4 und IgE besteht. Leider waren 20 der gesammelten Plasmaproben aufgrund einer zu hohen Hämolyse nicht für die Messungen verwertbar.



Abbildung 7: Streudiagramm für die Korrelation zwischen IL-4 und IgE Die bei allen Studienteilnehmern gemessenen Plasmakonzentrationen an IL-4 und IgE wurden für die Erstellung dieses Streudiagramms berücksichtigt.

Wie aus dem Spearman-Test hervorgeht, gibt es zwischen den Plasmakonzentrationen von IgE und IL-4 keinen monotonen statistischen Zusammenhang. Es gab Probanden/Patienten, bei denen ein hoher IgE-Spiegel gemessen wurde, der IL-4-Spiegel jedoch niedrig war (rechter unterer Bereich der Abb.). Andererseits gab es aber auch Probanden/Patienten, die relativ geringe IgE-Spiegel aufwiesen, obwohl hohe IL-4-Werte gemessen werden konnten (linker oberer Teil der Abb.). Damit scheint es weder eine statistische noch ein kausale Kopplung zwischen der Höhe der Plasmaspiegel von IL-4 und IgE zu geben.

Zusammenfassung: Es gibt keine monoton statistische Korrelation zwischen den Plasmaspiegeln von IgE und IL-4 im untersuchten Probanden- bzw. Patientenkollektiv, welches Patienten mit atopischen Erkrankungen und nicht-atopischen Normalprobanden enthielt.

4.1.2. Vergleichende Untersuchungen zu den IgE- und IL-4-Plasmaspiegel bei Atopikern und Nichtatopikern

Aus Literaturdaten war bekannt, dass Atopiker mit klinisch gesicherten Symptomen im Vergleich zu Normalpersonen (Nichtatopikern) deutlich erhöhte IgE-Plasmaspiegel aufweisen (Matsumoto *et al.* 1994). Um zu überprüfen, ob solche Patienten auch über erhöhte IL-4-Spiegel verfügen, wurde im Blut von klinisch gesicherten Atopikern und von nicht-atopischen Kontrollpersonen sowohl IL-4 als auch IgE quantifiziert. Die Probanden/Patienten, die sich zu einer Blutentnahme bereit erklärten, wurden hierfür nach Zustimmung zur Studie in der Dermatologie des Benjamin Franklin-Klinikum und des Klinikum Charité-Mitte rekrutiert. Untersucht wurden letztlich 81 Atopiker (Gruppe 1, Case-Gruppe) und 44 nicht-atopische Kontrollpersonen (Gruppe 2, Control-Gruppe). Eine Zusammenstellung der klinisch relevanten Basisdaten der untersuchten Patienten wird in Tab. 1 im Material und Methodenteil gegeben.

4.1.2.1. IgE-Analyse

Unter Berücksichtigung einer Eichkurve wurden die Messdaten zur Quantifizierung des IgE-Spiegels mittels der Immulite-Bestimmung in kU/l ermittelt. Die wesentlichen statistischen Parameter sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Vergleich der Plasmakonzentrationen von IgE bei Atopikern und nicht-atopischen Kontrollpersonen

| IgE-Spiegel (kU/l) | Anzahl | Mittelwert | Median | Minimum | Maximum |
|-----------------------|--------|------------|--------|---------|---------|
| Atopiker | 81 | 785 | 691 | 100 | 1245 |
| (atopic patients) | | | | | |
| Nichtatopiker | 44 | 23 | 12 | 1 | 99 |
| (non-atopic controls) | | | | | |

Der Gehalt an IgE betrug bei den Atopikern im Median 691 kU/l bei einem Minimum von 100 kU/l und einem Maximalwert von 1245,3 kU/l. Der statistische Mittelwert des IgE-Spiegels lag für Atopiker bei 785 kU/l. Im Gegensatz dazu lagen die IgE-Plasmakonzentrationen bei nicht-

atopischen Kontrollpersonen deutlich niedriger. Hier wurde ein Mittelwert von 23 kU/l gemessen, wobei die Werte zwischen 1 kU/l (Minimalwert) und 99 kU/ml (Maximalwert) schwankten. Damit kann geschlussfolgert werden, dass Atopiker einen deutlich höheren IgE-Plasmaspiegel aufweisen als nicht-atopische Kontrollpersonen. Diese Schlussfolgerung stimmt mit früher publizierten Daten überein (Matsumoto *et al.* 1994). In Abb. 8 sind die erhaltenen Messdaten in Form eines Boxplots zusammengestellt. Zur statistischen Auswertung ordinal skalierter Daten zweier unabhängiger Variablen wurde der Mann-Whitney-Test durchgeführt.



Abbildung 8: IgE-Plasmaspiegel bei Atopikern und nicht-atopischen Kontrollprobanden

Dabei ergab sich ein hoch signifikanter Unterschied hinsichtlich des IgE-Spiegels von Atopikern und nicht-atopischen Kontrollpersonen (p<0,001). Ferner wurde in einem Vorversuch eruiert, ob die *in vitro* Induktion von Monozyten experimentell gelingt, um die Arbeitshypothese zu stützen.

Zusammenfassung: Verglichen mit nicht-atopischen Kontrollprobanden haben Patienten, die an einer atopischen Erkrankung leiden, einen signifikant erhöhten IgE- Plasmaspiegel.

4.1.2.2. IL-4-Analyse

Die Analyse der IL-4-Spiegel erfolgte aus einem Teil des asservierten Blutplasmas der Probanden/Patienten mittels ELISA-Testkit. Aus Tabelle 2 wird ersichtlich, dass die IL-4-Konzentrationen im Blutplasma bei Atopikern höher waren als bei nicht-atopischen Kontrollpersonen. Für Atopiker lag der Mittelwert bei 1,65 pg/ml Plasma, wobei die Werte zwischen 0,43 pg/ml (Minimalwert) und 2,14 pg/ml (Maximalwert) schwankten. Für die nicht-atopischen Kontrollpersonen wurde ein Mittelwert von 0,56 pg/ml ermittelt, was nur etwa einem Drittel des Wertes entsprach, der für Atopiker gemessen wurde. Auch die Minimal-, die Maximal- und die Medianwerte lagen deutlich über den entsprechenden Werten nicht-atopischer

4. Ergebnisse

Kontrollprobanden. Für die deskriptive Darstellung und statistische Auswertung der Daten wurde die Boxplot-Darstellung gewählt (Abb. 9).

Tabelle 2: Vergleich der Plasmakonzentrationen von IL-4 bei Atopikern und nicht-atopischen Kontrollpersonen

| IL-4-Spiegel (pg/ml) | Anzahl | Mittelwert | Median | Minimum | Maximum |
|-------------------------|--------|------------|--------|---------|---------|
| Atopiker | 81 | 1,65 | 0.73 | 0,43 | 2,14 |
| Nichtatopiker | 44 | 0,56 | 0,41 | 0,27 | 0,74 |

Im Mann-Whitney-Test ergab sich beim Vergleich der Werte für Atopiker und nicht-atopische Kontrollprobanden ein hoch signifikanter Unterschied der IL-4-Spiegel (p<0,001). An dieser Stelle muss darauf hingewiesen werden, dass die numerischen Werte der IL-4-Plasmakonzentrationen stark von den verwendeten Bestimmungsmethoden abhängen. Deshalb sind die hier gemessenen Werte auch nicht eins zu eins mit Literaturdaten zu vergleichen, die mit anderen Bestimmungsmethoden erhoben wurden. Sie liegen jedoch in der Größenordnung der Literaturangaben (siehe Tabelle 9 der Diskussion).



Abbildung 9: IL-4-Spiegel bei Atopikern und nicht-atopischen Kontrollprobanden

Zusammenfassung: Verglichen mit nicht-atopischen Kontrollprobanden haben Patienten, die an einer atopischen Erkrankung leiden, einen signifikant erhöhten IL-4-Plasmaspiegel.

4.1.3. IgE und IL-4 bei verschiedenen Entitäten der Atopie

Aufgrund ihrer klinischen Symptome wurden die 81 Patienten mit atopischen Erkrankungen den folgenden drei Krankheitsgruppen (Deutsch/Englisch) zugeordnet werden:

| Rhinitis allergica (allergic rhinitis) : | 46 Patienten |
|--|--------------|
| Asthma bronchiale (bronchial asthma): | 20 Patienten |
| Atopisches Ekzem (atopic ekzema): | 15 Patienten |

4.1.3.1. IgE-Analyse bei verschiedenen Entitäten der Atopie

Die IgE-Analyse ergab für Patienten mit Atopischem Ekzem die höchsten Werte an IgE (Tab. 6). Der Mittelwert betrug 877 kU/l bei einem Median von 564 kU/l, einem Maximalwert von 2514 kU/l und einem Minimalwert von 107 kU/l. Für Patienten mit Rhinitis allergica wurde die breiteste Streuung und der höchste Median von 1028 kU/l ermittelt, bei einem Maximalwert von 2106 kU/l und einem Minimalwert von 96 kU/l.

Für den statistischen Vergleich der ermittelten Werte wurde zur nichtparametrischen Analyse der Kruskal-Wallis-Test verwendet, um die 4 Gruppen mit ordinal skalierten Daten mit unabhängigen Werten in Bezug auf den IgE-Plasmaspiegel zu analysieren. Die Berechnungen ergaben hoch signifikante (p<0,001) Unterschiede, wenn die IgE-Spiegel der unterschiedlichen Entitäten mit denen von nicht-atopischen Probanden verglichen wurden.

Tabelle 3: IgE-Plasmaspiegel bei verschiedenen Entitäten der Atopie

| IgE-Spiegel kU/l | n | Mittel- wert | Median | 25. Perzentil | 75. Perzentil | Min. | Max. |
|--------------------|----|-----------------|--------|------------------|------------------|------|------|
| Nichtatopiker | 44 | 22 | 12 | 6 | 30 | 3 | 99 |
| Rhinitis allergica | 46 | 818 | 1028 | 165 | 1265 | 96 | 2106 |
| Asthma bronchiale | 20 | 641 | 473 | 156 | 1060 | 105 | 1750 |
| Atopisches Ekzem | 15 | 877 | 564 | 347 | 1412 | 107 | 2514 |

Zwischen den verschiedenen Krankheitsentitäten untereinander bestand kein statistisch signifikanter Unterschied. Die IgE-Spiegel von Patienten mit allergischer Rhinitis unterschieden sich nicht signifikant von denen der Asthma- bzw. Atopischen Ekzem Patienten.



Abbildung 10: IgE-Werte bei verschiedenen Entitäten der Atopie

Zusammenfassung: Patienten, die an verschiedenen Entitäten atopischer Krankheiten leiden, haben im Vergleich mit nicht-atopischen Normalprobanden einen signifikant erhöhten IgE-Spiegel. Zwischen den drei verschiedenen Entitäten gab es keine signifikanten Unterschiede in der Höhe des IgE-Plasmaspiegels.

4.1.3.2. IL-4-Plasmaspiegel bei verschiedenen Entitäten der Atopie

Bei allergischen Erkrankungen kann es zu einer Erhöhung der peripheren IL-4-Blutplasmakonzentrationen kommen. Allerdings gibt es bereits bei Normalpersonen, die keine allergischen Symptome aufweisen, große interindividuelle Schwankungen der peripheren IL-4-Spiegel, so dass derzeit noch unklar ist, ob die erhöhten IL-4-Spiegel auf die allergischen Erkrankungen zurückzuführen oder lediglich Ausdruck interindividueller Unterschiede bzw. Folge anderer Grunderkrankungen sind. Wenn alle hier untersuchten Krankheitsentitäten gemeinsam betrachtet wurden, lagen die in dieser Arbeit analysierten Mittelwerte der IL-4-Plasmaspiegel signifikant höher als bei nicht-atopischen Kontrollprobanden (Tabelle 4). Eine ähnliche Schlussfolgerung konnte auch für die Medianwerte dieser Patienten gezogen werden, wobei sich hinsichtlich dieses Parameters Patienten mit Atopischem Ekzem nicht von den Kontrollprobanden unterschieden (0,41 pg/ml). Die hier ermittelten Plasmakonzentrationen entsprechen zahlreichen bisher publizierten Literaturangaben (siehe Vergleich Kapitel 5.2.3, Tabelle 9).

| IL-4-Spiegel (pg/ml) | n | Mittelwert | Median | 25. Perzentil | 75. Perzentil | Min. | Max. |
|-------------------------|----|------------|--------|------------------|------------------|------|-------|
| Nichtatopiker | 44 | 0,56 | 0,41 | 0,27 | 0,74 | 0,04 | 5,76 |
| Rhinitis allergica | 46 | 3,01 | 1,27 | 0,66 | 5,07 | 0,22 | 10,50 |
| Asthma bronchiale | 20 | 0,81 | 0,52 | 0,26 | 0,79 | 0,01 | 6,42 |
| Atopisches Ekzem | 15 | 1,14 | 0,41 | 0,36 | 0,57 | 0,09 | 10,90 |

Tabelle 4: IL-4-Werte bei verschiedenen Entitäten der Atopie

Patienten mit Rhinitis allergica besaßen im Median und im Mittelwert die höchsten IL-4-Plasmaspiegel (Abb. 11). Der Unterschied zu den anderen Gruppen war im Kruskal-Wallis-Test statistisch signifikant (p<0,001). Betrachtet man die anderen untersuchten Krankheitsentitäten unabhängig von einander und vergleicht die gemessenen IL-4-Plasmaspiegel der Patienten separat mit den Plasmaspiegeln von Normalpersonen konnte keine signifikante Erhöhung der IL-4-Plasmaspiegel im Vergleich zu Nichtatopikern nachgewiesen werden. An dieser Stelle sei nochmals darauf hingewiesen, dass die IL-4-Plasmaspiegel vor allem in der Gruppe der Nichtatopiker starken interindividuellen Schwankungen unterlagen.



Abbildung 11: Vergleich der IL-4-Plasmaspiegel von Patienten mit verschiedenen atopischen Krankheitsentitäten und von nicht-atopischen Normalprobanden

Zusammenfassung: Patienten, die an einer allergischen Rhinitis litten, hatten im Vergleich mit nicht-atopischen Normalprobanden signifikant erhöhte IL-4-Spiegel. Patienten mit Atopischem Ekzem und allergischem Asthma hatten im Vergleich mit nicht-atopischen Normalprobanden keinen erhöhten IL-4-Spiegel.

4.1.4. Quantifizierung der *in vitro*-Fettsäureoxygenierungskapazität von peripheren Monozyten von Atopikern und nicht-atopischen Kontrollen

4.1.4.1. Nachweis von HETE über HPLC

Monozyten von Patienten mit atopischen Erkrankungen zeigen hinsichtlich ihres Stoffwechsels bemerkenswerte Unterschiede, wenn die Zellen mit Monozyten von Normalpersonen verglichen werden (Holden et al. 1986). Ähnliche Differenzen könnten auch die Oxygenierungskapazität mehrfach ungesättigter Fettsäuren betreffen, wobei dazu in der Literatur bisher keine experimentellen Daten vorliegen. Deshalb habe ich im Rahmen meiner Untersuchungen Monozyten von Patienten mit atopischen Erkrankungen und von nicht-atopischen Kontrollprobanden präpariert, die Zellen in vitro mit exogener Arachidonsäure (AA) inkubiert, um die entstandenen hydroxylierten Fettsäurederivate mittels HPLC als Maß für die Fettsäureoxygenierungskapazität der Zellen zu quantifizieren. Die Identität der Arachidonsäureoxygenierungsprodukte erfolgte durch analytische HPLC (Vergleich der Retentionszeiten der eluierten konjugierten Diene mit den Retentionszeiten kommerziell erhältlicher authentischer Standards) und anhand des zugehörigen UV-Spektrums. Das Hauptprodukt der Arachidonsäureoxygenierung zeigte unter den chromatographischen Bedingungen der Analyse im Hauptversuch in der RP-HPLC eine Retentionszeit von 10,3 min (Abb. 12) und koeluierte mit einem Standard von 12S-HETE. Dabei muss jedoch betont werden, dass 8-HETE eine ähnliche Retentionszeit aufweist, so dass zwischen diesen beiden HETE-Isomeren nicht sicher unterschieden werden kann. Die chemische Identität von 12- und 15-HETE konnte durch ihre das charakteristische UV-Spektrum (Insert) eines konjugierten Dienes mit einem Absorptionsmaximum bei 235 nm bestätigt werden. Neben diesem Hauptprodukt wurden noch andere HETE Isomere (15-HETE, 5-HETE) nachgewiesen. Diese Daten zeigen, dass kein deutliches Überwiegen eines der HETE Isomere nachzuweisen war. Ein solches unspezifisches Produktmuster deutet darauf hin, dass große Teile der HETE Bildung nicht auf die katalytische Aktivität der ALOX15 zurück zu führen sind.



Abbildung 12: Beispielhafte Darstellung einer RP-HPLC-Analyse HETE eines Atopikers (Rhin all)
 Säule: Nucleosil C18-Säule (250 mm x 4,6 mm, 5μm Partikelgröße, Macherey & Nagel, Düren, UV-Detektion bei 235 nm), Laufmittel: Methanol/Wasser/Essigsäure-Gemisch im Verhältnis 85:15:0,1 (v/v/v), Flussrate 0,8. Das Inset zeigt das UV-Spektrum der konjugierten Diene, die mit 12-HETE ko-migrierten.

Bei ausgewählten Proben, bei denen sich in der RP-HPLC ein deutliches Überwiegen eines HETE-Isomers andeutete, wurde das Hauptprodukt mittels RP-HPLC präpariert und anschließend in der SP- bzw. CP-HPLC weiter analysiert. Da dieses analytische Verfahren nicht für alle Proben angewendet wurde, kann hier auf die Darstellung der Ergebnisse verzichtet werden. Zusammengenommen zeigten die Produktmuster der untersuchten Studienteilnehmer nur in wenigen Fällen ein deutliches Überwiegen des 15(S)-HETE. Typischer Weise wurde ein unspezifisches Muster an Arachidonsäureoxygenerungsprodukten nachgewiesen (Abb. 12). Aus diesen Daten kann geschlussfolgert werden, dass andere fettsäureoxidierende Metabolitwege außerhalb der ALOX15 für die Erhöhung der HETE-Bildung bei Atopikern verantwortlich sein müssen. Um die Chromatogramme quantitativ auszuwerten, wurden die Peakflächen ermittelt und unter Verwendung der etablierten Eichkurven nach dem Dreisatz in µg HETE umgerechnet. Nachfolgend wurde die quantifizierte µg-Zahl zur Zellzahl (Anzahl der Monozyten) ins Verhältnis gebracht, so dass bestimmt werden konnte, wieviel µg HETE/ 10 Mill. Zellen innerhalb der Inkubationszeit gebildet worden waren. Der aliquote Probenanteil, der zur HPLC-Analyse eingesetzt wurde, fand bei der Berechnung ebenfalls Berücksichtigung.

In Tabelle 5 sind die Mengen der Arachidonsäureoxgenierungsprodukte zusammengestellt, die während der 15-minütigen Inkubation der Zellen entstanden. Es zeigte sich, dass die HETE-Synthese durch Monozyten von nicht-atopischen Normalprobanden sowohl im Mittelwert als

4. Ergebnisse

auch im Median deutlich geringer war als bei den Patienten, die an einer der drei ausgewählten Formen atopischer Erkrankungen litten.

| μg HETE pro 10 ⁷ Zellen | n | Mittel- wert | Median | 25. Perzentil | 75. Perzentil | Min. | Max. |
|---------------------------------------|----|-----------------|--------|------------------|------------------|------|------|
| Nichtatopiker | 42 | 5,3 | 2,5 | 1,1 | 8,8 | 0,1 | 33,5 |
| Rhinitis allergica | 45 | 22,8 | 12,9 | 6,6 | 34,9 | 1,5 | 94,5 |
| Atopisches Ekzem | 13 | 11,6 | 6,0 | 3,1 | 7,8 | 2,1 | 39,9 |
| Asthma bronchiale | 19 | 9,0 | 6,9 | 2,4 | 13,6 | 0,2 | 30,1 |

 Tabelle 5: In vitro-Bildung von HETE durch isolierte Monozyten, die von Patienten mit verschiedenen Entitäten atopischer Erkrankungen und nicht-atopischen Normalpersonen präpariert wurden

Im Vergleich der atopischen Entitäten untereinander ergab sich, dass Patienten mit Rhinitis allergica sowohl im Mittelwert (22,8 μ g) als auch im Median (12,9 μ g) die höchste HETE-Bildung zeigten. Verglichen mit den anderen beiden Krankheitsentitäten konnten etwa doppelt so große Mengen an HETE nachgewiesen werden. Sowohl im Kruskal-Wallis-Test als auch im Chi-Quadrat-Test waren die Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den verschiedenen allergischen Erkrankungen statistisch signifikant (p<0,001). Diese Ergebnisse ließen sich in Form eines Boxplots (Abb.13) graphisch darstellen.



Abbildung 13: In vitro-Bildung von oxygenierten Arachidonsäureisomeren (HETE) durch isolierte Monozyten von Patienten mit verschiedenen atopischen Erkrankungen und nicht-atopischen Normalprobanden

Zusammenfassung: Monozyten von Patienten, die an einer atopischen Erkrankung leiden, haben im Vergleich mit nicht-atopischen Normalprobanden eine signifikant erhöhte Kapazität zur Arachidonsäureoxygenierung (HETE-Bildung). Zwischen den verschiedenen atopischen Entitäten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

4.1.4.2. Nachweis der ALOX15 mRNA mittels RT-PCR

Mittels der RT-PCR kann die Expression der mRNA des ALOX15-Gens extrem empfindlich quantifiziert werden. Deshalb wurde bei einer begrenzten Anzahl von Monozytenpräparationen (n<10) versucht, die Expression der ALOX15 durch *in vitro* Inkubation der präparierten Monozyten mit IL-4 zu stimulieren. Hierbei zeigte sich, dass bei den Monozyten, welche 4 Tage *in vitro* in Anwesenheit von IL-4 kultiviert worden sind, die ALOX15 mRNA nachgewiesen wurde. Diese Daten bestätigen den in der Literatur mehrfach beschriebenen Induktionseffekt des IL-4. In Monozyten, die für die gleiche Zeitspanne in Abwesenheit von IL-4 kultiviert wurden, konnte keine ALOX15 mRNA nachgewiesen werden. Aufgrund des bestätigenden und sicher auch nicht-repräsentativen Charakters dieser Ergebnisse wurde auf die Darstellung der experimentellen Daten in dieser Arbeit verzichtet.

Bei der RT-PCR-Untersuchung weniger monozytärer RNA-Extrakte, die von Patienten mit hohen endogenen IL-4-Spiegeln stammten, zeigten sich schwache ALOX15 Banden in der RT-PCR. Diese ebenfalls nicht-repräsentativen vorläufigen Ergebnisse deuteten darauf hin, dass bei diesen Patienten die ALOX15 in den präparierten Monozyten exprimiert wurde. Leider konnte im Rahmen meiner Arbeit die genaue Identität der bei diesen Proben aufgetretenen PCR-Bande nicht zweifelsfrei geklärt werden, so dass in Anbetracht der negativen Aktivitätsassays nicht sicher geschlussfolgert werden kann, dass diese Ergebnisse auf die Expression der ALOX15 bei diesen Studienteilnehmern hindeuten.

Zusammenfassung: Bei einigen Studienteilnehmern (Atopikern), die einen stark endogenen IL-4-Spiegel aufwiesen, konnte mittels RT-PCR die mRNA der ALOX15 nachgewiesen werden. Vor den Hintergrund der negativen Aktivitätstests und wegen der Tatsache, dass die Identität der PCR-Bande nicht zweifelsfrei identifiziert werden konnte, müssen diese Daten jedoch mit Vorsicht interpretiert werden.

4.2. Zusammenhänge der Testergebnisse in der Gesamtheit aller Krankheitsbilder (Atopiker und Nichtatopiker)

4.2.1. Übersicht IgE, IL-4 und HETE bei Atopikern und Nichtatopikern

Die Auswertung der durchgeführten Experimente deutet darauf hin, dass alle Atopiker-Gruppen deutlich höhere IgE-Werte als die Nichtatopiker besaßen. Diese Daten reihen sich in die Ergebnisse anderer Studien über den Zusammenhang von IgE und Atopie ein und bestätigen die bereits publizierten Daten.

Tabelle 6: Übersicht der Analysenergebnisse: Vergleich der Mediane (statistische Signifikanzen im Vergleich der verschiedenen Entitäten mit Nichtatopikern)

| Mediane | IgE (kU/l) | IL-4 (pg/ml) | HETE (μg/10 Mill. cells) |
|--------------------|------------------|-----------------|-----------------------------|
| Nichtatopiker | 11,6 | 0,41 | 2,47 |
| Rhinitis allergica | 1028,0 (p<0,001) | 1,27 (p<0.001) | 12,91 (p<0,001) |
| Atopisches Ekzem | 564,0 (p<0,001) | 0,41 (n.s.) | 5,99 (p<0,001) |
| Asthma bronchiale | 473,0 (p<0,001) | 0,52 (n.s.) | 6,90 (p<0,001) |

Neu ist jedoch, dass die Fettsäureoxygenierungskapazität (HETE-Gehalt) der Monozyten, die von Atopikern isoliert wurde, mindestens um den Faktor 2 höher war als die entsprechender Zellen von asymptomatischen Probanden. Patienten mit Rhinitis allergica wiesen signifikant höhere Anteile an IgE, IL-4 und auch HETE auf als Patienten mit Atopischem Ekzem oder Asthma bronchiale. Alle Parameter lagen sowohl im Median als auch im Mittelwert mindestens doppelt so hoch wie bei den anderen Atopie-Formen. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Atopiker und Nichtatopiker unterscheiden sich sowohl hinsichtlich des IL-4-Gehalts als auch der IgE-Werte jeweils hochsignifikant voneinander (asymptotische Signifikanz p < 0,0005). Dies stellt ein Indiz dafür dar, das Atopiker und Nichtatopiker unterschiedliche Mengen endogenen IgEs und endogenen IL-4s produzieren.

4.2.2. Korrelationsanalysen der Plasmaspiegel von IL-4 und IgE

Im Rahmen meiner Voruntersuchungen (Abb. 10) konnte in einem gemischten Probanden/Patientenkollektiv keine monotone statistische Korrelation zwischen den Plasmaspiegeln von IL-4 und IgE nachgewiesen werden (4.1.1.). Im Folgenden wurden Korrelationsanalysen der verschiedenen Parameter (IL-4, IgE, HETE-Bildung) getrennt nach den Erkrankungsentitäten mit Hilfe zweier unabhängiger statistischer Tests (Spearman, Pearson) durchgeführt. Die Korrelationsprüfungen der Plasmaspiegel von IL-4 und IgE mit Hilfe des Spearman-Tests ergaben eine signifikante Korrelation zwischen beiden Werten bei

Nichtatopikern und bei Patienten mit Asthma bronchiale. Für Patienten mit Rhinitis allergica und Atopischem Ekzem konnte kein signifikanter statistischer Zusammenhang gefunden werden (Tabelle 7).

Tabelle 7: Korrelationsprüfungen für einen Zusammenhang zwischen IgE und IL-4 Die statistischen p-Werte sind in der Tabelle angegeben.

| IgE vs. IL-4 | Nicht-atopiker | Rhinitis allergica | Atopisches Ekzem | Asthma bronchiale |
|--------------|----------------|-----------------------|---------------------|----------------------|
| Spearman | 0,005 | 0,775 | 0,990 | 0,030 |
| Pearson | 0,168 | 0,350 | 0,379 | 0,703 |

Das während der *in vitro*-Inkubation von präparierten Monozyten mit exogener Arachidonsäure gebildet HETE kann über unterschiedliche Stoffwechselwege gebildet worden sein. Eine mögliche metabolische Route wäre der ALOX15-Weg. Da bekannt ist, dass die Expression der ALOX15 durch IL-4 in Monozyten/Makrophagen induziert werden kann, könnte eine Korrelation zwischen dem Plasma-IL-4 und der HETE-Synthese darauf hindeuten, dass zumindest ein Teil der Bildung dieser Arachidonsäureoxygenierungsprodukte auf die Aktivität der ALOX15 zurückgehen könnte. Es wäre vorstellbar, dass sich unter dem unspezifischen Muster der analysierten Arachidonsäureoxygenierungsprodukte ein spezifischer Anteil verbirgt, der bei der von mir durchgeführten Analytik nicht zweifelsfrei zu identifizieren war. Die Prüfung einer möglichen Korrelation zwischen IL-4 und HETE-Bildung ergab nur bei Patienten mit Atopischem Ekzem im Pearson-Test einen signifikanten Zusammenhang. Mit Hilfe des Spearman-Tests war dieser Zusammenhang jedoch nicht mehr nachweisbar. Bei allen anderen Atopieentitäten konnte kein statistischer Zusammenhang zwischen den beiden Variablen festgestellt werden.

| IL-4 vs. HETE- Bildung Nichtatopike | | Rhinitis allergica | Atopisches Ekzem | Asthma bronchiale |
|--|-------|-----------------------|---------------------|----------------------|
| Spearman | 0,068 | 0,535 | 0,162 | 0,340 |
| Pearson | 0,419 | 0,553 | < 0,001 | 0,930 |

Tabelle 8: Korrelationsprüfungen für einen Zusammenhang zwischen IL-4 und HETE-Bildung

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die bei allen atopischen Entitäten beobachtete erhöhte HETE-Produktion (verglichen mit den nicht-atopischen Kontrollprobanden) mit großer Wahrscheinlichkeit *in vivo* nicht auf eine Induktion der ALOX15 zurückgeführt werden kann. Andere enzymatische bzw. nicht-enzymatische Oxidationsreaktionen sollten dafür verantwortlich sein. Zusammenfassung: Innerhalb der verschiedenen Entitäten der ausgewählten atopischen Erkrankungen konnte bei Anwendung zweier unterschiedlicher Testsysteme keine sichere statistische Korrelation zwischen IL-4 und IgE einerseits und IL-4 und HETE-Bildung andererseits nachgewiesen werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass eine erhöhte ALOX15 Expression nicht für die erhöhte Fettsäureoxygenierungsaktivität atopischer Monozyten verantwortlich ist.

5. **DISKUSSION**

5.1. Zusammenhang zwischen Entitäten der Atopie und IgE- sowie IL-4-Spiegeln

5.1.1. Besonderheiten der Immunabwehr von atopischen Erkrankungen

Atopische Dermatitis, Rhinitis allergica und atopisches Asthma bronchiale sind Erkrankungen aus dem Formenkreis der Atopie, deren Häufigkeitsgipfel bereits im Kindesalter zu verzeichnen sind und welche darüber hinaus oft gemeinsam oder in Folge auftreten. Deshalb ist es nahe liegend, dass viele Publikationen und Studien sich mit der Pathogenese und/oder Therapie der Atopien bei Kindern beschäftigen.

Die Pathogenese atopischer Erkrankungen ist ein multifaktorielles Geschehen, in welchem IL-4 eine zentrale Rolle spielt. Nicht nur die unmittelbare Aktivierung von T_H2-Zellen und der Isotypenwechsel von IgM zu IgE sowie die Aktivierung der Expression von IgE am Anfang der inflammatorischen Kaskade (Bellinghausen *et al.* 1996; Borish *et al.* 1999; Novak 2012), sondern auch weitere multiple Wechselwirkungen wurden in den letzten Jahren in der Grundlagenforschung erkannt. So wurde beispielsweise die Einflussnahme von IL-4 auf Signaltransduktionswege wie JAK/Stat6 mehrfach beschrieben (Bhattacherjee *et al.* 2013; Bao *et al.* 2014; Hussein *et al.* 2014; Stokes *et al.* 2015). Über den Stat6-Weg wird mit großer Wahrscheinlichkeit auch die Migration eosinophiler Granulozyten gesteuert (Stokes *et al.* 2015).

Es gibt mehrere Hinweise dafür, dass das klassische T_H2-Zytokin IL-4 über die Aktivierung der Expression der ALOX15 und deren Oxygenierungsprodukt 15(S)-HETE die Apoptose von Krebszellen steuert, so z.B. über die Bindung von HETE an PPARG bzw. PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) bei A549 Zellen des Lungen-Adenokarzinoms (Kasahara *et al.* 2000; Shankaranarayanan *et al.* 2003) und bei Plattenepithelzellen des Mundhöhlenkarzinoms (Kim *et al.* 2006).

Über die Beeinflussung der Differenzierung dendritischer Zellen und über die Aktivierung der Expression des Fcε-Oberflächenrezeptors für IgE steht IL-4 mit der Entwicklung des Atopischen Ekzems in Beziehung (Bieber *et al.* 1989; Kayserowa *et al.* 2012; Novak 2012). Wie die invitro-Studie von Bao *et al.* (2013) an der Keratinozyten-Zelllinie HaCat (Human adult low Calcium high Temperature keratinocytes) ergab, regulierte IL-4 in dieser Zelllinie die Freisetzung diverser pro-inflammatorische Cytokine und einiger Chemokine. Im Gegensatz dazu waren in dieser Studie TNF-α und Lymphotoxin-β, ein IgE-Gegenspieler, herunter reguliert. In mit Rhinovirus RV-16 infizierten bronchialen Epithelzellen analysierten Contoli *et al.* (2015) eine Beeinträchtigung der Expression von IFN-β und IFN-λ1 (Interferon-beta und -lambda1) sowie der Expression von TLR3 (Toll-Like Receptor 3) und IRF3 (Interferon Regulatory Factor 3) durch IL-4. Parallel ermittelten die Forscher erhöhte IL-4-Gehalte in nasalen Epithelzellen von Patienten mit atopischer Rhinitis. In den letzten Jahren mehren sich auch Genom-Untersuchungen, welche Polymorphismen des IL-4- sowie des IL-4-Rezeptor-Gens mit der Entwicklung des atopischen Asthmas (Zhu *et al.* 2013; Al-Muhsen *et al.* 2014; Li *et al.* 2014; Lou *et al.* 2014; Kumar *et al.* 2015) und der Atopischen Dermatitis (Bottema *et al.* 2010; Kayserowa *et al.* 2012; Hussein *et al.* 2014) in Zusammenhang bringen, wodurch eine genetische Prädisposition für diese Erkrankungen untermauert wird.

Im komplexen Zusammenspiel der Zellen des adaptiven Immunsystems mit Zytokinen und Chemokinen, an dem vor allem Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen und T-Lymphozyten beteiligt sind, spielt IgE als regulatorisches Element eine besondere Rolle (Novak *et al.* 2004; Faith *et al.* 2009; Dehlink *et al.* 2010; Song *et al.* 2015). Dabei muss beachtet werden, dass aufgrund der Hochregulierung des Fcε-Rezeptors nicht nur der Gehalt des freien Serum-IgE, sondern auch der Gehalt des an den Rezeptor gebundenen IgE bedeutsam ist (Dehlink *et al.* 2010). Für die Wirkungen des IgE bei allergischen Reaktionen ist nicht nur die systemische Konzentration dieses Immunglobulins bedeutsam. Bei der Untersuchung der DNA aus Monozyten von Patienten mit Atopischer Dermatitis stellten Liang *et al.* (2012) eine Hypomethylierung der FcεRIγ-Promoter-Region des IgE-Rezeptors fest. Der verminderte Methylierungsstatus dieser DNA-Region geht mit einer Überexpression des IgE-Rezeptors einher. Ebenso fanden Kim *et al.* (2013) in der bronchialen Mukosa von Asthmatikern ähnliche Hypomethylierungen. In der Studie von Korzycka-Zaborowska *et al.* (2014) korrelierten Polymorphismen des FcεRIβ-Promoters mit allergischer Rhinitis bei 100 Patienten.

5.1.2. Beziehung zwischen ALOX15, IL-4 und IgE bei Atopikern und Nichtatopikern

Die vorliegende Case-Control-Studie ergab, dass Patienten, die an einer atopischen Erkrankung leiden, gegenüber nicht-atopischen Kontrollprobanden einen signifikant erhöhten IgE-Plasmaspiegel aufweisen. Obwohl bereits seit vielen Jahren vermutet wurde, dass IgE bei allergischen Reaktionen eine wichtige pathophysiologische Rolle spielt, deuten eine Reihe von Untersuchungen darauf hin, dass der systemische Plasma-IgE-Spiegel kein geeigneter Parameter für die Einschätzung des Schweregrades der Erkrankung ist (Shah *et al.* 2011, Kawamoto *et al.* 2013, Koulouri *et al.*2014,). So gibt es u.a. Hinweise auf den Einfluss von Regionalität und Alter, welche das IgE-Level beeinflussen (Saloga *et al.* 2011, De Guia *et al.* 2015). Auch müssen

eventuell neben dem Gesamt-IgE die allergen-spezifischen IgE-Expressionen (sIgE) betrachtet werden (Chang *et al.* 2011; Kim *et al.* 2013). Bei spezifischem IgE handelt es sich um diejenige Fraktion der gesamten IgE-Antikörper im Serum, deren Spezifität gegenüber bestimmten Allergenen mit Hilfe von in-vitro Testverfahren bestimmt werden kann. Deren Nachweis bedeutet, dass eine spezifische Sensibilisierung gegen ein genau definiertes Allergen vorliegt. Man fand heraus, dass zum Atopie-Screening das Gesamt-IgE nur eingeschränkt geeignet ist. Dieser Parameter dient im Zusammenhang mit der Bestimmung des spezifischen IgE lediglich als zusätzlicher Parameter in der Beurteilung der spezifischen IgE-Werte. Er kann jedoch eine spezifische Sensibilisierung nie ausschließen bzw. nachweisen.

Außerhalb der Allergologie kommt dem Parameter Gesamt-IgE eine Bedeutung bei der Diagnostik von Parasitosen oder Immundefekten zu. Auch wurde gezeigt, dass Patienten, welche mit Anti-IgE (Omalizumab) behandelt werden, die üblichen IgE-Messungen abweichende Werte zeigen (Hamilton *et al.* 2006).

Während Vakirlis *et al.* (2011) eine statistische Korrelation zwischen IgE-Anstieg und Schwere der akuten Atopischen Dermatitis fanden, ermittelten Koulouri *et al.* (2014) bei 37 Kindern im Alter von 3 Monaten bis 16 Jahren mit chronischer Atopischer Dermatitis keinen Zusammenhang zwischen den zwar erhöhten IgE-Werten und dem Krankheitsstatus. Einen interessanten Hinweis zur Ursache der erhöhten IgE Werte bei atopischen Reaktionen liefert die Studie von Andersson *et al.* (2011). Die Autoren ermittelten nur in Alveolarzellen, nicht in Bronchialzellen, einen Unterschied der IgE-Expression. Eine verstärkte Expression sowohl von IgE und als auch des Fcɛ-Rezeptors lag in Alveolar-Mastzellen von Asthma-Patienten, aber nicht in denjenigen von Rhinitis-Patienten vor. Im Gegensatz dazu war die IgE-Expression in Bronchialzellen in beiden Gruppen gleichermaßen erhöht.

Chang *et al.* (2011) betrachteten des Weiteren drei verschiedene spezifische IgE-Typen gegen *Candida, Aspergillus* und *Penicillium.* Bei Patienten mit Atopischer Dermatitis waren die IgE-Spiegel gegen alle drei Allergene höher und signifikant korreliert im Gegensatz zu Patienten mit allergischen Atemwegserkrankungen. Aus der Studie von Kawamoto *et al.* (2013) mit 314 Säuglingen geht die Annahme hervor, dass der IgE-Gehalt im Alter von 6 Monaten ein Hinweis auf die Prädisposition für eine Atopische Dermatitis sein könnte. Aussagen hinsichtlich eines diagnostischen Richtwertes sind aber noch nicht möglich. Tu *et al.* (2013) fanden in ihrer Studie mit 1321 asiatischen Kindern zwischen 5 und 18 Jahren keinen Unterschied im Serum-IgE zwischen Kindern mit Asthma, Rhinitis oder Ekzem und weisen auf die geringe Sensitivität und Spezifität der IgE-Analyse hin.

Zhang *et al.* (2015) fanden erhöhte IgE-Serumspiegel in der Gruppe von chinesischen Kindern mit atopischem Asthma. Diese korrelierten mit CD14-Polymorphismen. Höhere IgE-Werte können generell als Hinweis auf eine atopische Erkrankung betrachtet werden. Die bisherigen Ergebnisse lassen jedoch eine Festlegung von Referenzwerten für einzelne Entitäten nicht zu.

In meinen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass bei Atopiepatienten signifikant erhöhte IL-4-Plasmaspiegel vorliegen. Diese Erhöhung ist jedoch vor allem darauf zurückzuführen, dass die IL-4-Plasmaspiegel bei Patienten mit allergischer Rhinitis im Vergleich zu den nicht-atopischen Normalprobanden deutlich erhöht waren. Dies steht mit den Analysen von Crocker *et al.* (1998), Hafez *et al.* (2004), Gharaee *et al.* (2014); Hussein *et al.* (2014) und Contoli et a. (2015) in Übereinstimmung. Bei den anderen untersuchten atopischen Entitäten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zu den entsprechenden Werten von Normalprobanden. Somit können erhöhte IL-4-Plasmaspiegel als hinweisend für atopische Erkrankungen betrachtet werden. Sie stellen aber kein verlässliches diagnostisches Kriterium dar, da einerseits atopische Erkrankungen auch ohne erhöhte IL-4-Plasmaspiegel einhergehen können, andererseits erhöhte IL-4-Spiegel auch als funktionelle Konsequenz bei anderen Erkrankungen resultieren.

In der vorliegenden Studie wurde im Spearman-Test eine signifikante Korrelation zwischen den Plasmaspiegeln von IgE und IL-4 bei Patienten mit Asthma ermittelt (Tabelle 7). Diese Korrelation war im Pearson-Test jedoch nicht nachvollziehbar. Bisher gibt es zum Zusammenhang zwischen IL-4 und IgE bei atopischen Erkrankungen sich teilweise widersprechende Befunde. So fanden Tavakkol et al. (2007) bei 20 Asthma-Patienten eine Korrelation zwischen Serum-IgE und IL-4. Wang et al. (2009) analysierten bei 150 Asthma-Patienten eine Korrelation zwischen SNP (Single Nucleotide Polymorphism) der +33C/T-Promoter-Region des IL-4-Gens und erhöhten Serum-IgE-Spiegeln. Kayserowa et al. (2012) berechneten eine Korrelation zwischen Polymorphismen des IL-4-Rezeptorgens und spezifischen Anti-Pollen-IgE-Überproduktionen bei Patienten mit Atopischer Dermatitis. Die Rolle von Genmutationen wird im Falle von Korrelationen unterstrichen. Choi et al. (2012) fanden bei 669 koreanischen Kindern mit Asthma eine Korrelation zwischen erhöhten IgE-Serum Spiegeln und Polymorphismen des IL-4-Rezeptorgens. Ebenso ermittelten Lama et al. (2013) bei 44 von 70 asthmatischen Kindern zwischen 3 und 12 Jahren eine positive Korrelation zwischen IgE und IL-4 im Serum. Laut einer älteren Studie von Tavakkol Afshari J. et al.(2007) wurden zuvor keine Korrelationen zwischen diesen beiden Parametern gefunden. Hauptgrund dafür waren die relativ großen interindividuellen Schwankungen.

5.2. Induktion der ALOX15 in Monozyten

5.2.1. Regulatorisches Potenzial der ALOX15

Die Rolle der ALOX15 in der Genese atopischer Erkrankungen ist noch unklar (Andersson *et al.* 2008; Yin *et al.* 2010; Lundström *et al.* 2012; Mabalirajan *et al.* 2013). Für eine Beteiligung an der Entwicklung einer Atopie spricht, dass Hajek *et al.* (2008) einen Schutz vor allergischer Atemwegssensibilisierung bei ALOX15-defizienten Mäusen fanden. Einen systemischen Schutz bewirkte das Fehlen der LOX-Expression aber nicht. Des Weiteren wurde in mehreren Studien an Zellen von Patienten mit allergischen Erkrankungen eine Überexpressionen der ALOX15 postuliert (Kuitert *et al.* 1996; Profita *et al.* 2000; Brown *et al.* 2001; Chu *et al.* 2002; Gulliksen *et al.* 2007; Jeon *et al.* 2009; Lundström *et al.* 2012; Mabalirajan *et al.* 2013; Larsson *et al.* 2014; Thomson *et al.* 2014), wobei bislang unklar ist, ob diese Veränderung als Ursache oder funktionelle Konsequenz einzustufen ist.

Insgesamt muss eingeschätzt werden, dass die biologische Funktion der ALOX15 noch weitgehend unklar ist. Obwohl eine Reihe von Hypothesen zu diesem Punkt existieren, die sich u.a. aus den phänotypischen Veränderungen der funktionellen Inaktivierung des ALOX15-Gens bei Mäusen ergeben, lassen sich derzeit noch keine abschließenden Schlussfolgerungen zur biologischen Relevanz der ALOX15 ziehen. Gesichert sind regulatorische Funktionen beim Lipidstoffwechsel und bei der Hämatopoese. So sind z.B. Signaltransduktionswege, an denen die ALOX15 beteiligt ist, bei der Differenzierung von hämatopoetischen Zellen bedeutsam (Kinder *et al.* 2010).

5.2.2. Oxidative Kapazität von Monozyten bei atopischen Erkrankungen

Ex-vivo Analysen der Arachidonsäureoxygenierungskapazität von Patienten, die an einer atopischen Erkrankung leiden und von Normalpersonen ergaben, dass periphere Monozyten von Atopikern eine signifikant erhöhte Fettsäureoxygenierungskapazität aufwiesen als die Zellen von asymptomatischen Probanden (Abb. 13). Zwischen den verschiedenen atopischen Entitäten konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Eine detailliertere Analyse des Musters der Arachidonsäureoxygenierungsprodukte zeigte jedoch, dass es sich bei der Erhöhung der Fettsäureoxygenierungskapazität nicht um eine Hochregulation des ALOX15-Weges handelte. In diesem Falle wäre eine selektive Erhöhung der 15-HETE Bildung zu erwarten gewesen.

Unsere HPLC Analysen ergaben, dass neben dem 15-HETE auch andere HETE-Isomers (12-HETE, 5-HETE, 11-HETE) verstärkt gebildet wurden. Diese Daten deuten darauf hin, dass andere oxidative Stoffwechselwege in Monozyten von Patienten mit atopischen Erkrankungen im Vergleich mit Normalpersonen hochreguliert sind. Über die chemische Identität dieser oxidativen Reaktionen lassen sich auf der Basis der derzeit verfügbaren experimentellen Daten keine eindeutigen Schlussfolgerungen ziehen. Als potentielle hochregulierte Stoffwechselwege wäre der Cyclooxygenaseweg, insbesondere die COX2, und der NADPH-Oxidaseweg zu nennen (Okayama 2005, Grant *et al.* 2009, Fattahi *et al.* 2012, Powell *et al.* 2013).

Die in-vitro-Induktion der ALOX15 in verschiedenen Zelltypen wurde in einer großen Anzahl von Publikationen beschrieben, wobei die Aktivierung sowohl der mRNA als auch der Proteinexpression analysiert wurden (Conrad *et al.* 1992; Conrad *et al.* 2000; Lee *et al.* 2001; Spanbroek *et al.* 2001; Harada *et al.* 2003; Shankaranarayanan *et al.* 2003; Chaitidis *et al.* 2005; Chen *et al.* 2006; Abrial *et al.* 2015). Die Induktion in Monozyten untersuchten Conrad *et al.* (1992), Sigal *et al.* (1993), Brinkmann *et al.* (1996), Profita *et al.* (2002), Xu *et al.* (2004), Chaitidis *et al.* (2005), Bhattacharjee *et al.* (2006), Maskrey *et al.* (2007), Wuest *et al.* (2012), Gutowska *et al.* (2012), Bhattacharjee *et al.* (2013). Dabei wurden vor allem Zellen monozytären Ursprungs aber auch Atemwegsepithelzellen (Brinkmann *et al.* 2006; Jayawickreme *et al.* 1999; Profita *et al.* 1999; Brown *et al.* 2001; Chen *et al.* 2006; Han *et al.* 2014; Abrial *et al.* 2015) als zelluläre Modelle verwendet. In diesen Modellen wurde eindeutig und übereinstimmend die Aktivierung der ALOX 15 gezeigt.

Ausführlich beschrieben Conrad *et al.* (1992), Spanbroek *et al.* (2001), Profita *et al.* (2002) als auch Chen *et al.* (2006), dass selektiv die Bildung von 15(S)HETE als Hauptprodukt der Arachidonsäureoxygenierung in dendritischen Zellen bzw. Monozyten durch Aktivierung von IL-4 hochreguliert wurde. Wie Maskrey *et al.* (2007) zeigen konnten, handelt es sich bei dieser Hochregulation nicht nur um eine Erhöhung der freien Hydroxyeikosatetraensäuren, sondern auch um komplex veresterte Phospholipide. Wie Conrad *et al.* (1992, Monozyten), Brinkmann *et al.* (1996, Lungenepithelzellen), Jayawickreme *et al.* (1999, Tracheo-Bronchial-Epithelzellen), Profita *et al.* (1999, Lungenepithelzellen und 2002, Monozyten), Lee *et al.* (2001, Venen-Endothelzellen), Harada *et al.* (2003, Synovialzellen) und Chen *et al.* (2006, Fibroblasten) beschrieben, hängt die Aktivierung des ALOX15 Stoffwechselweges von der Kontaktzeit der Zellen mit IL-4 und von der IL-4-Konzentration ab. In den ersten 3 Stunden nach Beginn der IL-4-Stimulation wurden noch keine Veränderungen der ALOX15 Expression beobachtet. Das Maximum der Hochregulation der ALOX15 lag in Abhängigkeit vom Zelltyp zwischen 48-72h. Diese langsame Aktivierungskinetik deutet darauf hin, dass die ALOX15 nicht zu den "immediate early genes" der IL-4-Antwort gehört.

Lee *et al.* (2001) fanden in Endothelzellen, dass die Inkubation mit IL-4 zu einer erhöhten Expression der ALOX15 mRNA führt. Im Gegensatz dazu konnte keine vermehrte Menge an ALOX15 Protein nachgewiesen werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Translation als Voraussetzung für die Proteinexpression der ALOX15mRNA in diesem Zellsystem gehemmt wird. In der alveolar basalen Lungenkarzinom Zellline A 549 wurden sowohl ALOX15 mRNA als auch ALOX15 Protein exprimiert. Chen *et al.* (2006) konnten das Oxigenierungsprodukt 15(S)-HETE aus Orbita-Fibroblasten nur in durch Graves-Disease (auch TAO, Thyroid-assoziierte Ophthalmopathie) verändertem Bindegewebe mit erhöhtem Zytokingehalt nachweisen. Bei Patienten mit normalem Epithel ohne das Vorliegen von Graves-Disease fanden sie eine Expression jedoch nicht. Die Autoren schlossen aus ihren Analysen darüber hinaus, dass für die verstärkte Expression des ALOX15-Gens durch IL-4 nicht eine hochregulierte Transkription der entscheidende Schritt ist, sondern dass in diesem System die Stabilisierung der mRNA besonders bedeutsam ist.

IL-4 induziert in verschiedenen Zellen unterschiedliche Signalwege. Obwohl für dieses Zytokin nur ein einzelner Zelloberflächenrezeptor beschrieben wurde, scheint die intrazelluläre Signalkaskade in verschiedenen zellulären Systemen unterschiedlich zu sein. So konnten in verschiedenen zellulären Systemen unterschiedliche Elemente von Signalwegen identifiziert werden, die neben den Zelloberflächenrezeptor andere Elemente enthielten. Die Studien zeigten auch, dass die Stimulation nicht grundsätzlich durch IL-4 allein stattfindet und infolgedessen die Regulation über IL-4 durch weitere Zellbestandteile gesteuert sein muss (Brinkmann *et al.* 1996; Conrad *et al.* 2000; Harada *et al.* 2003; Shankaranarayanan *et al.* 2001; Chen *et al.* 2006). Dies ist beispielsweise Calcium (Conrad *et al.* 1992), sowie das STAT6-response-Element im ALOX15-Gen-Promoter (Heydeck *et al.* 1998; Conrad *et al.* 2000; Shankaranarayanan *et al.* 2001; Lee *et al.* 2001) oder TNF-α (Harada *et al.* 2003).

Weitere Untersuchungen deuten ferner darauf hin, dass die Aktivierung der ALOX15 durch IL-4 vom Differenzierungsgrad der Zellen abhängt, und möglicherweise in verschiedenen Unterpopulationen von dendritischen Vorläuferzellen unterschiedlich ist (Spanbroek *et al.* 2001). So gibt es Hinweise darauf, dass die Induktion von Makrophagen und Monozyten mit IL-4 zu einer Down-Regulation der Prostaglandine und zu einer Steigerung der 15-HETE-Produktion führen kann, wobei die Effekte in Makrophagen stärker als in Monozyten beobachtet wurden (Endo *et al.* 1998; Jakiela *et al.* 2013). In der Studie von Jakiela *et al.* (2013) ging die

Differenzierung von bronchialen Epithelzellen in vitro mit einer Expression von HETE einher.

Für die transkriptionelle Regulation der ALOX15 Expression besitzt die Promoterregion des ALOX15 Gens besondere Bedeutung. Den Einfluss von IL-4 auf den ALOX15-Promoter bestätigen Han *et al.* (2014) in ihrer Untersuchung an Lungen-Adenokarzinom-Zellen. Eine wichtige Rolle für die Regulierung der Proteinexpression spielte der Methylierungsstatus des Promoters. Han *et al.* ermittelten, dass Trimethyl-Lysin nach Stimulation von humanen Lungenepithel-Karzinomzellen mit IL-4 demethyliert wurde. Methylierung und Histon-Acetylierung stehen mit der Aktivität in Zusammenhang (Liu *et al.* 2004; Liu *et al.* 2012a). IL-4 steuert demnach die Methylierung der Promotorposition Histon H3 trimethyl lysine 27 (H3K27me3) im ALOX15-Promoter und darüber die Aktivierung der Expression des Enzyms (Han *et al.* 2014).

5.2.3. Induktion der ALOX15 durch IL-4 in vivo

Auf der Grundlage unserer ALOX15 Aktivitätsmessungen ergaben sich keine Anhaltspunkte dafür, dass die Expression der ALOX15 in peripheren Monozyten bei Patienten mit atopischen Erkrankungen hochreguliert ist. Das ist vor allem deshalb bemerkenswert, da besonders bei Patienten mit allergischer Rhinitis ein signifikant erhöhter IL-4-Spiegel im Blutplasma nachgewiesen wurde. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die *in vivo* beobachteten Erhöhungen des systemischen IL-4-Spiegels nicht ausreichen, um die ALOX15 Expression in Monozyten hoch zu regulieren oder dass es *in vivo* hemmende Faktoren für diesen Prozess gibt. Ein Vergleich der IL-4-Konzentrationen, die für die *in vitro* Induktion der ALOX15 in kultivierten Monozyten nötig sind, mit den *in vivo* erreichten IL-4-Konzentrationen (Ergebnisse dieser Studie) legt die Vermutung nahe, dass die für die ALOX15 Induktion *in vitro* erforderliche IL-4-Konzentration *in vivo* nicht erreicht wird.

Tabelle 9 zeigt einen Vergleich der zur *in vitro* Induktion der ALOX15 verwendeten IL-4-Konzentrationen, bei denen ein Nachweis der Enzyminduktion gelang. Die in Tabelle 4 angegebenen IL-4-Konzentrationen unserer Studie variieren zwischen 0,01-11 pg/ml. Unsere Untersuchungsergebnisse entsprechen damit den in früheren Studien ermittelten Werten für IL-4-Spiegel (Giulio Kleiner *et al.* 2013, Pavlovic V. *et al.* 2014). Bei einigen Atopikern konnten allerdings deutlich erhöhte Plasmaspiegel nachgewiesen werden, bei anderen atopischen Patienten lagen die Werte allerdings deutlich niedriger. Umgerechnet bedeutet dies, dass bei unseren Studienteilnehmern *in vivo* IL-4-Konzentrationen in Höhe von 0,00001 - 0,011 ng/ml gemessen wurden. Diese Werte lagen damit im Vergleich zu den in Tabelle 9 aufgeführten IL-4-

Konzentrationen deutlich unter den Konzentrationsbereichen, der für die *in vitro* Induktion der ALOX15 angewendeten Zytokinkonzentrationen.

| Referenz | Zelltyp | Inkubationszeit | IL-4-Konzentration [ng/ml] |
|------------------------|-------------------------|------------------|-------------------------------|
| Conrad et al. 1992 | Monozyten | 72 h | 10 |
| Sigal et al. 1993 | Monozyten | | 1 |
| Nassar et al. 1994 | Monozyten | 36 h | 2 |
| Dugas et al. 1996 | Monozyten | 40 min | 10 |
| Brinckmann et al. 1997 | Monozyten | 72 h | 10 |
| Folcik et al. 1997 | Monozyten | 72 h | 10 |
| Heydeck et al. 1998 | Mausmonozyten | 96 h | 12 |
| Profita et al. 2002 | Monozyten | 24, 48, 72 h | 10 |
| Chaitidis et al. 2004 | Monozyten | 72 h | 10 |
| Chen et al. 2006 | Monozyten, Fibroblasten | 16, 24, 48, 72 h | 10 |

Tabelle 9: Vergleich der IL-4-Konzentrationen in vitro (Studien) und in vivo (Dissertation) zur ALOX15 Induktion

Die vorliegende Studie ergab bei dem ausgewählten Patientengut, dass bei den meisten Patienten die *in vivo* erreichten IL-4 Konzentrationen dennoch nicht Ausschlag gebend waren, um die Expression von ALOX15 zu induzieren. Nur bei ausgewählten Patienten mit einer atopischen Grunderkrankung lag eine Expression bereits ohne eine Induktion mit IL-4 vor. Dies kann darauf hinweisen, dass die erhöhten IL-4-Spiegel dieser Probanden bereits zu einer Induktion der Enzymexpression geführt haben.

Auffällig in der Gesamtbetrachtung aller Messergebnisse ist, dass sowohl IgE-, IL-4 und HETE-Werte im gesamten Probandenkollektiv der 81 Atopiker sehr stark streuen. Die Ursache könnte, wie in Kapitel 5.2.2 diskutiert, darin zu suchen sein, dass noch weitere Wechselwirkungen mit anderen Zytokinen und Signaltransduktionswegen berücksichtigt werden müssen. So fanden Kuitert *et al.* (1996) erhöhte Gehalte von ALOX15 in Granulozyten, aber nicht in Monozyten aus venösem Blut von Asthma-Patienten. Profita *et al.* (2000) und Chu *et al.* (2002) ermittelten erhöhte Werte von 15(S)-HETE im Sputum bzw. der bronchoalveolaren Lavage von Asthmatikern. Wie Chu *et al.* (2002) beim Vergleich verschiedener Erkrankungsstadien von Asthmatikern fanden, korrelierte das 15(S)-HETE-Niveau mit der Schwere der Erkrankung, der Zahl an Eosinophilen, der Dicke der Basalmembran und der Expression von 12/15-LOX im Bronchialepithel. Dies lässt darauf schließen, dass unterschiedliche Erkrankungsstadien, möglicherweise aber auch Komorbiditäten, mitberücksichtigt werden müssen, was in der vorliegenden Untersuchung nicht erfolgen konnte. Demnach scheinen die Bedingungen, die zu einer Expression der ALOX15 führen, höchst individuell und vom Status der Erkrankung
abhängig zu sein. Die für die Studie anamnestizierten Patienten wurden nicht im Hinblick auf ihre Krankheitsaktivität klassifiziert, ebenso nicht im Hinblick auf Alter und Phänotyp. Auch wurden der mögliche Einfluss der applizierten Medikation auf die Krankheitsaktivität der Entitäten der Atopie sowie Wechselwirkungen anderweitiger Basismedikation nicht näher betrachtet. Dies könnte Bestandteil eines eigenen Forschungsgegenstandes sein.

Wie Forschungen der letzten Jahre zeigen, sind die Zusammenhänge im Wechselspiel von Zytokinen und Enzymen sehr komplex. Demnach muss in der Regulierung des ALOX15-Gens auch zumindest TGF- β mit berücksichtigt werden. So fanden Liu *et al.* (2012), dass TGF- β in glatten Muskelzellen der Lungenarterien die Expression der ALOX15 erhöht. Die Zusammenhänge werden noch komplexer, wenn die Ergebnisse von Kim *et al.* (2005) betrachtet werden, wobei 12(S)-HETE die Expression von TGF- β fördert. Dieser Zusammenhang würde die vorliegenden Ergebnisse erklären, wo nur bei den Patienten mit Atopischem Ekzem eine Korrelation zwischen IL-4 und HETE gefunden wurde. Da an der Entwicklung des Atopischen Ekzems Langerhanszellen beteiligt sind, welche durch die Synergie von IL-4 und TGF- β entstehen, liegt der Schluss nahe, dass ALOX15 für die Ausbildung der Atopischen Dermatitis mitverantwortlich ist. Es ist nach den bisherigen Ergebnissen allerdings nicht auszuschließen, dass die Pathogenese der einzelnen atopischen Ekrankungen sich hinsichtlich der Expression und der Rolle der ALOX15 unterscheidet. Dies könnte vor dem Hintergrund der Beteiligung genetischer Prädispositionen in Betracht kommen und sogar sehr wahrscheinlich sein.

5.3. Ausblick

Um die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse zu ergänzen und um die Fettsäureoxygenierungskapazität peripherer Monozyten genauer zu beurteilen, können folgende weiterführende Arbeiten und Schwerpunktsetzungen diskutiert werden:

- Bei der Patientenakquise wären für die Untersuchungen grundsätzlich höhere Probandenfallzahlen zu empfehlen, aber auch deren Regionalität und das Alter der Probanden zu berücksichtigen (Saloga *et al.* 2011, De Guia *et al.* 2015), um Rückschlüsse auf die IgE und IL-4-Level zu beschreiben.
- 2. Bei der Probandenauswahl für diese Studie wurden aus dem Formenkreis der Atopie lediglich Probanden mit den Grunderkrankungen Asthma, Atopisches Ekzem und Rhinitis allergica untersucht. Hierbei handelt es sich zwar um die häufigsten atopischen Erkrankungen mit einer weltweiten Prävalenz von 30-40% (Rantala *et al.* 2013). Um Zusammenhänge noch detaillierter zu erfassen, sollten auch die atopischen Erkrankungen wie Urtikaria (Nesselsucht), atopisch bedingte Kolitis und Konjunktivitis hinsichtlich ihrer Pathomechanismen mit in weiterführende Studien eingeschlossen werden. Es ist nach den bisherigen Ergebnissen nicht auszuschließen, dass sich die Pathogenese der einzelnen atopischen Erkrankungen, ebenso bei den nicht so hoch prävalenten Entitäten, hinsichtlich der Expression und der Rolle der ALOX 15 unterscheidet.
- 3. In der Literatur wird zunehmend über eine atopische Konversion (atopic march) berichtet. Dabei wechselt das klinische Krankheitsbild ein und desselben Patienten von der Atopischen Dermatitis über die Allergische Rhinitis hin zu atopischem Asthma (Zheng *et al.* 2011). Dies bedeutet, dass auch Längsschnittstudien an Probanden im Hinblick auf die durchgeführten Untersuchungen von Bedeutung sein können. In dieser Arbeit erfolgte eine Betrachtung einzelner der Krankheitsentitäten in Form einer Querschnittsuntersuchung bei den Probanden zu einem definierten Zeitpunkt ohne anamnestische Hinweise darauf, ob eventuell Konversionen stattgefunden haben. Hieraus ergeben sich interessante Perspektiven im Hinblick auf ein Time Course Experiment im Rahmen einer Längsschnittanalyse.
- 4. Als weitere Möglichkeit zur Untersuchung der Parameter ist im Studiendesign die klinisch zu erfassende akute Krankheitsaktivität der Patienten zu diskutieren und diese anhand der aktuellsten Guideline zum Untersuchungszeitpunkt einzustufen. Auch kann die Probandenauswahl entsprechend (ohne Vorerkrankungen oder ohne Begleitmedikation) sondiert werden, um nachfolgend differenzierte Untersuchung zu den IL-4, sIgE-Spiegel

5. Diskussion

bzw. IgE-Spiegeln sowie der Aktivität der ALOX15 durchzuführen. Wie Chu *et al.* (2002) beim Vergleich verschiedener Erkrankungsstadien von Asthmatikern fanden, korrelierte das 15(S)-HETE-Niveau mit der Schwere der Erkrankung, der Zahl an Eosinophilen, der Dicke der Basalmembran und der Expression der ALOX15 im Bronchialepithel. Dies lässt darauf schließen, dass unterschiedliche Erkrankungsstadien wie im Falle des Asthma bronchiale mitberücksichtigt werden sollten.

5. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der ALOX15 in Monozyten durch die Bestimmung der katalytischen Aktivität des Enzyms quantifiziert. Dieses Verfahren ist jedoch relativ unempfindlich, nur schwer exakt quantifizierbar und kann durch die Existenz von anderen Arachidonsäure-metabolisierenden Reaktionen überlagert werden. Deshalb sollten bei weiterführenden Experimenten auch andere Nachweismethoden, wie z.B. die qRT-PCR zur Quantifizierung der ALOX15 mRNA oder das Immunoblotting zum Nachweis des Enzymproteins angewendet werden. Der qRT-PCR kommt dabei eine besondere Bedeutung zu, da diese Methode sehr einfach durchzuführen ist, streng quantitativ angewendet werden kann und eine hohe Sensitivität aufweist. Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass eine erhöhte Expression der ALOX15 mRNA nicht automatisch bedeutet, dass auch das entsprechende Enzym in erhöhten Konzentrationen vorliegt.

LITERATURVERZEICHNIS

- Abrial C, Grassin-Delyle S, Salvator H, Brollo M, Naline E, Devillier P. 15-Lipoxygenases regulate the production of chemokines in human lung macrophages. Br J Pharmacol. 2015 Sep; 172(17):4319-30.
- Agrawal S, Townley RG. Role of periostin, FENO, IL-13, lebrikzumab, other IL-13 antagonist and dual IL-4/IL-13 antagonist in asthma. Expert Opin Biol Ther. 2014 Feb; 14(2):165-81.
- Akdis CA, Akdis M, Bieber T, Bindslev-Jensen C, Boguniewicz M, Eigenmann P, Hamid Q, Kapp A, Leung DY, Lipozencic J, Luger TA, Muraro A, Novak N, Platts-Mills TA, Rosenwasser L, Scheynius A, Simons FE, Spergel J, Turjanmaa K, Wahn U, Weidinger S, Werfel T, Zuberbier T. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report. J Allergy Clin Immunol 2006; 118(1): 152-69. Erratum J Allergy Clin Immunol 2006; 118(3): 724.
- Almqvist N, Mårtensson IL. The pre-B cell receptor; selecting for or against autoreactivity. Scand J Immunol. 2012 Sep; 76(3):256-62.
- Al-Muhsen S, Vazquez-Tello A, Alzaabi A, Al-Hajjaj MS, Al-Jahdali HH, Halwani R. IL-4 receptor alpha singlenucleotide polymorphisms rs1805010 and rs1801275 are associated with increased risk of asthma in a Saudi Arabian population. Ann Thorac Med. 2014 Apr; 9(2):81-6.
- Amoras AL, Kanegane H, Miyawaki T, Vilela MM. Defective Fc-, CR1- and CR3-mediated monocyte phagocytosis and chemotaxis in common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinemia patients. J Investig Allergol Clin Immunol. 2003; 13(3):181-8.
- Amzel LM, Poljak RJ. Three-dimensional structure of immunoglobulins. Annu Rev Biochem. 1979; 48:961-97.
- Anderson MW, Gorski J. Cooperativity during the formation of peptide/MHC class II complexes. Biochemistry. 2005 Apr 19; 44(15):5617-24.
- Andersson CK, Claesson HE, Rydell-Törmänen K, Swedmark S, Hällgren A, Erjefält JS. Mice lacking 12/15lipoxygenase have attenuated airway allergic inflammation and remodeling. Am J Respir Cell Mol Biol. 2008 Dec; 39(6):648-56.
- Andersson CK, Tufvesson E, Aronsson D, Bergqvist A, Mori M, Bjermer L, Erjefält JS. Alveolar mast cells shift to an FccRI-expressing phenotype in mild atopic asthma: a novel feature in allergic asthma pathology. Allergy. 2011 Dec; 66(12):1590-7.
- Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. Annu Rev Immunol. 2007; 25:21-50.
- Astudillo AM, Balgoma D, Balboa MA, Balsinde J. Dynamics of arachidonic acid mobilization by inflammatory cells. Biochim Biophys Acta. 2012 Feb; 1821(2):249-56.
- Bäck M, Sakata K, Qiu H, Haeggström JZ, Dahlén SE. Endothelium-dependent vascular responses induced by leukotriene B4. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2007 May; 83(3):209-12.
- Banchereau J, Defrance T, Galizzi JP, Miossec P, Rousset F. Human interleukin 4. Bull Cancer. 1991; 78(3):299-306.
- Banerjee, S. ALOX-15 (arachidonate 15-lipoxygenase). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 2006; 10(4):230-233.
- Bao L, Alexander JB, Shi VY, Mohan GC, Chan LS Interleukin-4 up-regulation of epidermal interleukin-19 expression in keratinocytes involves the binding of signal transducer and activator of transcription 6 (Stat6) to the imperfect Stat6 sites. Immunology. 2014 Dec; 143(4):601-8.
- Bao L, Shi VY, Chan LS. IL-4 up-regulates epidermal chemotactic, angiogenic, and pro-inflammatory genes and down-regulates antimicrobial genes in vivo and in vitro: relevant in the pathogenesis of atopic dermatitis. Cytokine. 2013 Feb; 61(2):419-25.
- Beavers WN, Serwa R, Shimozu Y, Tallman KA, Vaught M, Dalvie ED, Marnett LJ, Porter NA. ω-Alkynyl lipid surrogates for polyunsaturated fatty acids: free radical and enzymatic oxidations. J Am Chem Soc. 2014 Aug 13; 136(32):11529-39.
- Beghé B, Barton S, Rorke S, Peng Q, Sayers I, Gaunt T, Keith TP, Clough JB, Holgate ST, Holloway JW. Polymorphisms in the interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha chain genes confer susceptibility to asthma and atopy in a Caucasian population. Clin Exp Allergy. 2003 Aug; 33(8):1111-7.
- Belkner J, Wiesner R, Rathman J, Barnett J, Sigal E, Kühn H. Oxygenation of lipoproteins by mammalian lipoxygenases, Eur J Biochem 1993; 213(1):251-61
- Bellinghausen I, Enk AH, Mohamadzadeh M, Lohmann S, Knop J, Saloga J. Epidermal cells enhance interleukin 4 and immunoglobulin E production after stimulation with protein allergen. J Invest Dermatol. 1996 Oct; 107(4):582-8.
- Bellinghausen I, Klostermann B, Knop J, Saloga J. Human CD4+CD25+ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress TH1 and TH2 cytokine production. J Allergy Clin Immunol. 2003 Apr; 111(4):862-8.

- Bellini A, Marini MA, Bianchetti L, Barczyk M, Schmidt M, Mattoli S. Interleukin (IL-4, IL-13, and IL-17A differentially affect the profibrotic and proinflammatory functions of fibrocytes from asthmatic patients. Mucosal Immunol. 2012 Mar; 5(2):140-9.
- Bhattacharjee A, Shukla M, Yakubenko VP, Mulya A, Kundu S, Cathcart MK. IL-4 and IL-13 employ discrete signaling pathways for target gene expression in alternatively activated monocytes/macrophages. Free Radic Biol Med. 2013 Jan; 54:1-16.
- Bieber T, Rieger A, Neuchrist C, Prinz JC, Rieber EP, Boltz-Nitulescu G, Scheiner O, Kraft D, Ring J, Stingl G. Induction of Fc epsilon R2/CD23 on human epidermal Langerhans cells by human recombinant interleukin 4 and gamma interferon. J Exp Med. 1989 Jul 1; 170(1):309-14.
- Bitencourt CS, Bessi VL, Huynh DN, Ménard L, Lefebvre JS, Lévesque T, Hamdan L, Sohouhenou F, Faccioli LH, Borgeat P, Marleau. Cooperative role of endogenous leucotrienes and platelet-activating factor in ischaemia-reperfusion-mediated tissue injury. J Cell Mol Med. 2013 Dec; 17(12):1554-65.
- Blazevic T, Schwaiberger AV, Schreiner CE, Schachner D, Schaible AM, Grojer CS, Atanasov AG, Werz O, Dirsch VM, Heiss EH. 12/15-lipoxygenase contributes to platelet-derived growth factor-induced activation of signal transducer and activator of transcription 3. J Biol Chem. 2013 Dec 6; 288(49):35592-603.
- Bligh, E. G. and W. J. Dyer (1959). "A rapid method of total lipid extraction and purification." Can J Biochem Physiol 37(8): 911-7.
- Bolick DT, Orr AW, Whetzel A, Srinivasan S, Hatley ME, Schwartz MA, Hedrick CC. 12/15-lipoxygenase regulates intercellular adhesion molecule-1 expression and monocyte adhesion to endothelium through activation of RhoA and nuclear factor-kappaB. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 Nov; 25(11):2301-7.
- Borish LC, Nelson HS, Lanz MJ, Claussen L, Whitmore JB, Agosti JM, Garrison L. Interleukin-4 receptor in moderate atopic asthma. A phase I/II randomized, placebo-controlled trial. Am J Respir Crit Care Med. 1999 Dec; 160(6):1816-23.
- Borngraber S, Browner M, Gillmor S, Gerth C, Anton M, Fletterick R, Kühn H. Shape and specificity in mammalian 15-lipoxygenase active site. The functional interplay of sequence determinants for the reaction specificity, J Biol Chem 1999; 274(52):37345-50.
- Bos JD, Wierenga EA, Sillevis Smitt JH, van der Heijden FL, Kapsenberg ML. Immune dysregulation in atopic eczema. Arch Dermatol. 1992 Nov; 128(11):1509-12.
- Bottema RW, Nolte IM, Howard TD, Koppelman GH, Dubois AE, de Meer G, Kerkhof M, Bleecker ER, Meyers DA, Postma DS. Interleukin 13 and interleukin 4 receptor-α polymorphisms in rhinitis and asthma. Int Arch Allergy Immunol. 2010; 153(3):259-67.
- Bradding P, Redington AE, Djukanovic R, Conrad DJ, Holgate ST. 15-lipoxygenase immunoreactivity in normal and in asthmatic airways. Am J Respir Crit Care Med. 1995 Apr; 151(4):1201-4.
- Brinckmann R, Topp MS, Zalán I, Heydeck D, Ludwig P, Kühn H, Berdel WE, Habenicht JR. Regulation of 15lipoxygenase expression in lung epithelial cells by interleukin-4. Biochem J. 1996 Aug 15; 318 (Pt 1):305-12.
- Brinckmann R, Kühn H. Regulation of 15-lipoxygenase expression by cytokines. Adv Exp Med Biol. 1997;400B:599-604.
- Brown CD, Kilty I, Yeadon M, Jenkinson S. Regulation of 15-lipoxygenase isozymes and mucin secretion by cytokines in cultured normal human bronchial epithelial cells. Inflamm Res. 2001 Jun; 50(6):321-6.
- Bryant RW, Bailey JM, Schewe T, Rapoport SM. Positional specificity of a reticulocyte lipoxygenase. Conversion of arachidonic acid to 15-S-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid, J Biol Chem 1982; 257(11):6050-5
- Campbell CD, Mohajeri K, Malig M, Hormozdiari F, Nelson B, Du G, Patterson KM, Eng C, Torgerson DG, Hu D, Herman C, Chong JX, Ko A, O'Roak BJ, Krumm N, Vives L, Lee C, Roth LA, Rodriguez-Cintron W, Rodriguez-Santana J, Brigino-Buenaventura E, Davis A, Meade K, LeNoir MA, Thyne S, Jackson DJ, Gern JE, Lemanske RF Jr, Shendure J, Abney M, Burchard EG, Ober C, Eichler EE. Whole-genome sequencing of individuals from a founder population identifies candidate genes for asthma. PLoS One. 2014 Aug 12; 9(8):e104396.
- Cao PP, Zhang YN, Liao B, Ma J, Wang BF, Wang H, Zeng M, Liu WH, Schleimer RP, Liu Z. Increased local IgE production induced by common aeroallergens and phenotypic alteration of mast cells in Chinese eosinophilic, but not non-eosinophilic, chronic rhinosinusitis with nasal polyps. Clin Exp Allergy. 2014; 44(5):690-700.
- Caux C, Massacrier C, Dubois B, Valladeau J, Dezutter-Dambuyant C, Durand I, Schmitt D, Saeland S. Respective involvement of TGF-beta and IL-4 in the development of Langerhans cells and non-Langerhans dendritic cells from CD34+ progenitors. J Leukoc Biol. 1999 Nov; 66(5):781-91.
- Chaitidis Pavlos, Untersuchungen zur Interleukin-4 induzierten Signaltransduktion in Monozyten und Tumorzellen. Differenzielle Modulation der Expression pro- und anti-inflammatorischer Genprodukte.Freie Universität-Berlin, Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie. 03/2006. Dissertation.

- Chaitidis P, Billett EE, O'Donnell VB, Fajardo AB, Fitzgerald J, Kuban RJ, Ungethuem U, Kühn H. Th2 response of human peripheral monocytes involves isoform-specific induction of monoamine oxidase-A. J Immunol. 2004 Oct 15;173(8):4821-7.
- Chaitidis P, Kuhn H. Induction of 15-lipoxygenase-1 impairs expression of HIV-1 receptors CD4 and CXCR4 in monocytic cells. FEBS Lett. 2005 Jul 4; 579(17):3691-4.
- Chang FY, Lee JH, Yang YH, Yu HH, Wang LC, Lin YT, Chiang BL. Analysis of the serum levels of fungispecific immunoglobulin E in patients with allergic diseases. Int Arch Allergy Immunol. 2011; 154(1):49-56.
- Chen L, Lin SX, Amin S, Overbergh L, Maggiolino G, Chan LS. VCAM-1 blockade delays disease onset, reduces disease severity and inflammatory cells in an atopic dermatitis model. Immunol Cell Biol. 2010 Mar-Apr; 88(3):334-42.
- Chen B, Tsui S, Boeglin WE, Douglas RS, Brash AR, Smith TJ. Interleukin-4 induces 15-lipoxygenase-1 expression in human orbital fibroblasts from patients with Graves disease. Evidence for anatomic site-selective actions of Th2 cytokines. J Biol Chem. 2006 Jul 7;281(27):18296-306. Epub 2006 May 4.
- Cho SH, Lee SH, Kato A, Takabayashi T, Kulka M, Shin SC, Schleimer RP. Cross-talk between human mast cells and bronchial epithelial cells in plasminogen activator inhibitor-1 production via transforming growth factor-β1. Am J Respir Cell Mol Biol. 2015 Jan; 52(1):88-95.
- Choi J, Chon JK, Kim S, Shin W. Conformational flexibility in mammalian 15S-lipoxygenase: Reinterpretation of the crystallographic data. Proteins. 2008 Feb 15; 70(3):1023-32.
- Choi WA, Kang MJ, Kim YJ, Seo JH, Kim HY, Kwon JW, Yu J, Park SJ, Lee YC, Hong SJ. Gene-gene interactions between candidate gene polymorphisms are associated with total IgE levels in Korean children with asthma. J Asthma. 2012 Apr; 49(3):243-52.
- Chu HW, Balzar S, Westcott JY, Trudeau JB, Sun Y, Conrad DJ, Wenzel SE. Expression and activation of 15lipoxygenase pathway in severe asthma: relationship to eosinophilic phenotype and collagen deposition. Clin Exp Allergy. 2002 Nov; 32(11):1558-65.
- Conrad DJ, Kuhn H, Mulkins M, Highland E, Sigal E. Specific inflammatory cytokines regulate the expression of human monocyte 15-lipoxygenase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Jan 1; 89(1):217-21.
- Conrad M, Sandin A, Förster H, Seiler A, Frijhoff J, Dagnell M, Bornkamm GW, Rådmark O, Hooft van Huijsduijnen R, Aspenström P, Böhmer F, Ostman A. 12/15-lipoxygenase-derived lipid peroxides control receptor tyrosine kinase signaling through oxidation of protein tyrosine phosphatases. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Sep 7; 107(36):15774-9.
- Contoli M, Ito K, Padovani A, Poletti D, Marku B, Edwards MR, Stanciu LA, Gnesini G, Pastore A, Spanevello A, Morelli P, Johnston SL, Caramori G, Papi A. Th2 cytokines impair innate immune responses to rhinovirus in respiratory epithelial cells. Allergy. 2015 Aug; 70(8):910-20.
- Corrigan CJ, Kay AB. CD4 T-lymphocyte activation in acute severe asthma. Relationship to disease severity and atopic status. Am Rev Respir Dis. 1990 Apr; 141(4 Pt 1):970-7.
- Crocker IC, Gupta K, Townley RG, Khan MM. The profile of the cytokines secreted during the generation of Thelper cells from atopic asthmatic subjects. J Asthma. 1998; 35(2):187-201.
- De Guia R.M., M. D. J. Echavez, E. L. C. Gaw, M. R. R. Gomez, K. A. J. Lopez, R. C. M. Mendoza, J. M. C. Rapsing, D. P. Retreta, C. M. B. Tubog, M. H. Ventolero, C. L. Yao & J. D. A. Ramos Multifactor-dimensionality reduction reveals interaction of important gene variants involved in allergy. International Journal of Immunogenetics. 2015, 42(1): 182-189.
- Degraaf AJ, Zasłona Z, Bourdonnay E, Peters-Golden M Prostaglandin E2 reduces Toll-like receptor 4 expression in alveolar macrophages by inhibition of translation. Am J Respir Cell Mol Biol. 2014 Aug; 51(2):242-50.
- Dehlink E, Baker AH, Yen E, Nurko S, Fiebiger E. Relationships between levels of serum IgE, cell-bound IgE, and IgE-receptors on peripheral blood cells in a pediatric population. PLoS One. 2010 Aug 16; 5(8):e12204.
- Del Prete G. Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. Allergy. 1992 Oct; 47(5):450-5.
- Dembech C, Quinti I, Cimignoli E, Albi N, Terenzi A, Gerli R, Galandrini R, Grignani F, Velardi A. Human Thelper clones induce IgG production in a subclass-specific fashion. Cell Immunol. 1992 Feb; 139(2):306-17.
- Di Gennaro A, Haeggström JZ. The leukotrienes: immune-modulating lipid mediators of disease. Adv Immunol. 2012; 116:51-92.
- Dioszeghy V, Rosas M, Maskrey BH, Colmont C, Topley N, Chaitidis P, Kühn H, Jones SA, Taylor PR, O'Donnell VB. 12/15-Lipoxygenase regulates the inflammatory response to bacterial products in vivo. J Immunol. 2008 Nov 1; 181(9):6514-24.
- Dmitrieva-Zdorova EV, Voronko OE, Latysheva EA, Storozhakov G, Archakov A. Analysis of polymorphisms in T(H)2-associated genes in Russian patients with atopic bronchial asthma. J Investig Allergol Clin Immunol. 2012; 22(2):126-32.

- Duchén K, Björkstén B. Polyunsaturated n-3 fatty acids and the development of atopic disease. Lipids. 2001 Sep; 36(9):1033-42.
- Dugas N, Dugas B, Kolb JP, Yamaoka K, Delfraiss JF, Damais C. Role of leukotriene B4 in the interleukin-4induced human mononuclear phagocyte activation. Immunology. 1996 Jul;88(3):384-8.
- Endo T, Ogushi F, Kawano T, Sone S. Comparison of the regulations by Th2-type cytokines of the arachidonic-acid metabolic pathway in human alveolar macrophages and monocytes. Am J Respir Cell Mol Biol. 1998 Aug; 19(2):300-7.
- Faith A, Singh N, Chevretton E, Roberts D, Lee T, Corrigan C, Hawrylowicz C. Counter regulation of the high affinity IgE receptor, FcepsilonRI, on human airway dendritic cells by IL-4 and IL-10. Allergy. 2009 Nov; 64(11):1602-7.
- Fattahi MJ, Mirshafiey A. Prostaglandins and rheumatoid arthritis. Arthritis. 2012;2012:239310.doi:10.1155/2012/ 239310. Epub 2012 Nov 7.
- Fauler J, Frölich JC. Cardiovascular effects of leukotrienes. Z Kardiol. 1989 Oct; 78(10):661-7.
- Feltenmark S, Gautam N, Brunnström A, Griffiths W, Backman L, Edenius C, Lindbom L, Björkholm M, Claesson HE. Eoxins are proinflammatory arachidonic acid metabolites produced via the 15-lipoxygenase-1 pathway in human eosinophils and mast cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jan 15; 105(2):680-5.
- Fiorini M, Vermi W, Facchetti F, Moratto D, Alessandri G, Notarangelo L, Caruso A, Grigolato P, Ugazio AG, Notarangelo LD, Badolato R. Defective migration of monocyte-derived dendritic cells in LAD-1 immunodeficiency. J Leukoc Biol. 2002 Oct; 72(4):650-6.
- Flesher RP, Herbert C, Kumar RK. Resolvin E1 promotes resolution of inflammation in a mouse model of an acute exacerbation of allergic asthma. Clin Sci (Lond). 2014 Jun; 126(11):805-14.
- Folcik VA, Aamir R, Cathcart MK. Cytokine modulation of LDL oxidation by activated human monocytes. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997 Oct;17(10):1954-61.
- Foster CA. VCAM-1/alpha 4-integrin adhesion pathway: therapeutic target for allergic inflammatory disorders. J Allergy Clin Immunol. 1996 Dec; 98(6 Pt 2):S270-7.
- Furukawa CT, Altman LC. Defective monocyte and polymorphonuclear leukocyte chemotaxis in atopic disease. J Allergy Clin Immunol. 1978 May; 61(5):288-93.
- Garman SC, Kinet JP, Jardetzky TS. Crystal structure of the human high-affinity IgE receptor. Cell. 1998 Dec 23; 95(7):951-61.
- Geissmann F, Prost C, Monnet JP, Dy M, Brousse N, Hermine O. Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. J Exp Med. 1998 Mar 16; 187(6):961-6.
- Gell PGH, Coombs RRA. Clinical aspects of immunology. Clinical aspects of immunology 1963 pp. xxvi + 883 pp
- Gharaee H, Shayegan MR, Khakzad MR, Kianoush S, Varasteh AR, Sankian M, Meshkat M. The expression of vascular endothelial growth factor in pterygium tissue of atopic patients. Int Ophthalmol. 2014 Dec; 34(6):1175-81.
- Gillmor, S. A., Villasenor, A., Fletterick, R., Sigal, E. und Browner, M. F., (1997): The structure of mammalian 15lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity, Nat Struct Biol; 4 [12], Seite 1003-9
- Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. Nat Rev Immunol 8, 205-217(2008).
- Guironnet G, Dezutter-Dambuyant C, Vincent C, Bechetoille N, Schmitt D, Péguet-Navarro J. Antagonistic effects of IL-4 and TGF-beta1 on Langerhans cell-related antigen expression by human monocytes. J Leukoc Biol. 2002 May; 71(5):845-53.
- Gulliksson M, Brunnström A, Johannesson M, Backman L, Nilsson G, Harvima I, Dahlén B, Kumlin M, Claesson HE. Expression of 15-lipoxygenase type-1 in human mast cells. Biochim Biophys Acta. 2007 Sep; 1771(9):1156-65.
- Grant GE, Rokach J, Powell WS. 5-Oxo-ETE and the OXE receptor.Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2009 Sep;89(3-4):98-104. doi:10.1016/j.2009.05.002. Epub 2009 May 18.
- Hafez SF, Sallam MM, Ibraheem SA. Local expression of IL-4 and IL-5 in perennial allergic rhinitis and their modulation by topical corticosteroid therapy. Egypt J Immunol. 2004; 11(1):111-21.
- Hajek AR, Lindley AR, Favoreto S Jr, Carter R, Schleimer RP, Kuperman DA. 12/15-Lipoxygenase deficiency protects mice from allergic airways inflammation and increases secretory IgA levels. J Allergy Clin Immunol. 2008 Sep; 122(3):633-9.e3.
- Hamilton RG. Accuracy of US Food and Drug Administration-cleared IgE antibody assays in the presence of anti-IgE (omalizumab). J Allergy Clin Immunol 2006; 117:759-766.
- Hammond VJ, Morgan AH, Lauder S, Thomas CP, Brown S, Freeman BA, Lloyd CM, Davies J, Bush A, Levonen AL, Kansanen E, Villacorta L, Chen YE, Porter N, Garcia-Diaz YM, Schopfer FJ, O'Donnell VB. Novel keto-phospholipids are generated by monocytes and macrophages, detected in cystic fibrosis, and activate peroxisome proliferator-activated receptor-γ. J Biol Chem. 2012 Dec 7; 287(50):41651-66.

- Han H, Xu D, Liu C, Claesson HE, Björkholm M, Sjöberg J. Interleukin-4-mediated 15-lipoxygenase-1 transactivation requires UTX recruitment and H3K27me3 demethylation at the promoter in A549 cells. PLoS One. 2014 Jan 20; 9(1):e85085.
- Hansel NN, Diette GB. Gene expression profiling in human asthma. Proc Am Thorac Soc. 2007 Jan; 4(1):32-6.
- Harada S, Sugiyama E, Takebe S, Taki H, Shinoda K, Mohamed SG, Maruyama M, Hamazaki T, Kobayashi M. Cooperative induction of 15-lipoxygenase in rheumatoid synovial cells by IL-4 and proinflammatory cytokines. Clin Exp Rheumatol. 2003 Nov-Dec; 21(6):753-8.
- Hart PH. Regulation of the inflammatory response in asthma by mast cell products. Immunol Cell Biol. 2001 Apr; 79(2):149-53.
- Hashimoto A, Hayashi I, Murakami Y, Sato Y, Kitasato H, Matsushita R, Iizuka N, Urabe K, Itoman M, Hirohata S, Endo H. Antiinflammatory mediator lipoxin A4 and its receptor in synovitis of patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 2007 Nov; 34(11):2144-53.
- Heise CE, O'Dowd BF, Figueroa DJ, Sawyer N, Nguyen T, Im DS, Stocco R, Bellefeuille JN, Abramovitz M, Cheng R, Williams DL Jr, Zeng Z, Liu Q, Ma L, Clements MK, Coulombe N, Liu Y, Austin CP, George SR, O'Neill GP, Metters KM, Lynch KR, Evans JF. Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. J Biol Chem. 2000 Sep 29; 275(39):30531-6.
- Herlin M, McGuigan FE, Luthman H, Åkesson K. Polymorphisms in inflammation associated genes ALOX15 and IL-6 are associated with bone properties in young women and fracture in elderly. Bone. 2015 May 30; 79:105-109.
- Hersberger M, Thun GA, Imboden M, Brandstätter A, Waechter V, Summerer M, Schmid-Grendelmeier P, Bircher A, Rohrer L, Berger W, Russi EW, Rochat T, Kronenberg F, Probst-Hensch N. Association of STR polymorphisms in CMA1 and IL-4 with asthma and atopy: the SAPALDIA cohort. Hum Immunol. 2010 Nov; 71(11):1154-60.
- Heydeck D, Thomas L, Schnurr K, Trebus F, Thierfelder WE, Ihle JN, Kühn H. Interleukin-4 and -13 induce upregulation of the murine macrophage 12/15-lipoxygenase activity: evidence for the involvement of transcription factor STAT6. Blood. 1998 Oct 1;92(7):2503-10.
- Hofheinz K, Kakularam KR, Adel S, Anton M, Polymarasetty A, Reddanna P, Kuhn H, Horn T. Conversion of proinflammatory murine Alox5 into an anti-inflammatory 15S-lipoxygenating enzyme by multiple mutations of sequence determinants. Arch Biochem Biophys. 2013 Feb 1; 530(1):40-7.
- Holden C.A., Chan S.C., Hanifin J.M. Monocyte localization of elevated cAMP phosphodiesterase activity in atopic dermatitis. J Invest Dermatol. 1986 Sep 87(3):372-6
- Huang JT, Welch JS, Ricote M, Binder CJ, Willson TM, Kelly C, Witztum JL, Funk CD, Conrad D, Glass CK. Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. Nature. 1999 Jul 22; 400(6742):378-82.
- Humbert M, Corrigan CJ, Kimmitt P, Till SJ, Kay AB, Durham SR. Relationship between IL-4 and IL-5 mRNA expression and disease severity in atopic asthma. Am J Respir Crit Care Med. 1997 Sep; 156(3 Pt 1):704-8.
- Hussein YM, Ahmad AS, Ibrahem MM, Elsherbeny HM, Shalaby SM, El-Shal AS, Sabbah NA. Interleukin 13 receptors as biochemical markers in atopic patients. J Investig Allergol Clin Immunol. 2011; 21(2):101-7.
- Hussein YM, Shalaby SM, Nassar A, Alzahrani SS, Alharbi AS, Nouh M. Association between genes encoding components of the IL-4/IL-4 receptor pathway and dermatitis in children. Gene. 2014 Jul 25; 545(2):276-81.
- Ishizaka, K., Ishisaka, T. (1966) J. Allergy 37, 169-185.
- Jakiela B, Gielicz A, Plutecka H, Hubalewska M, Mastalerz L, Bochenek G, Soja J, Januszek R, Musial J, Sanak M. Eicosanoid biosynthesis during mucociliary and mucous metaplastic differentiation of bronchial epithelial cells. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2013 Oct; 106:116-23.
- James A, Daham K, Backman L, Brunnström A, Tingvall T, Kumlin M, Edenius C, Dahlén SE, Dahlén B, Claesson HE. The influence of aspirin on release of eoxin C4, leukotriene C4 and 15-HETE, in eosinophilic granulocytes isolated from patients with asthma. Int Arch Allergy Immunol. 2013; 162(2):135-42.
- Jayawickreme SPT, Gray P, Nettesheim T, Eling. Regulation of 15-lipoxygenase expression and mucus secretion by IL-4 in human bronchial epithelial cells. Am. J. Physiol 1999; 276: L596
- Jeon SG, Moon HG, Kim YS, Choi JP, Shin TS, Hong SW, Tae YM, Kim SH, Zhu Z, Gho YS, Kim YK. 15lipoxygenase metabolites play an important role in the development of a T-helper type 1 allergic inflammation induced by double-stranded RNA. Clin Exp Allergy. 2009 Jun; 39(6):908-17.
- Joetham A, Takeda K, Miyahara N, Matsubara S, Ohnishi H, Koya T, Dakhama A, Gelfand EW. Activation of naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) regulatory T cells requires CD8 and MHC I interaction. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Sep 18; 104(38):15057-62.
- Jones HE, Inouye JC, McGerity JL, Lewis CW. Atopic disease and serum immunoglobin-E. Br J Dermatol 1975; 92:17-25

- Joshi N, Hoobler EK, Perry S, Diaz G, Fox B, Holman TR. Kinetic and structural investigations into the allosteric and pH effect on the substrate specificity of human epithelial 15-lipoxygenase-2. Biochemistry. 2013 Nov 12; 52(45):8026-35.
- Juhn YJ. Risks for infection in patients with asthma (or other atopic conditions): Is asthma more than a chronic airway disease? J Allergy Clin Immunol. 2014 Aug; 134(2):247-257.e3.
- Kabesch M, Schedel M, Carr D, Woitsch B, Fritzsch C, Weiland SK, von Mutius E. IL-4/IL-13 pathway genetics strongly influence serum IgE levels and childhood asthma. J Allergy Clin Immunol. 2006 Feb; 117(2):269-74.
- Kai-Ting C. Shade and Robert M. Anthony. Antibody Glycosylation and Inflammation. Antibodies 2013, 2(3), 392-414;
- Kaminsky DA, Jones K, Schoene RB, Voelkel NF. Urinary leukotriene E4 levels in high-altitude pulmonary edema. A possible role for inflammation. Chest. 1996 Oct; 110(4):939-45.
- Kanellakis P, Ditiatkovski M, Kostolias G, Bobik A. A pro-fibrotic role for interleukin-4 in cardiac pressure overload. Cardiovasc Res. 2012 Jul 1; 95(1):77-85.
- Kang KH, Ling TY, Liou HH, Huang YK, Hour MJ, Liou HC, Fu WM. Enhancement role of host 12/15lipoxygenase in melanoma progression. Eur J Cancer. 2013 Aug; 49(12):2747-59.
- Kang YP, Lee WJ, Hong JY, Lee SB, Park JH, Kim D, Park S, Park CS, Park SW, Kwon SW. Novel approach for analysis of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) using HPLC-QTOF-MS-based lipidomics: lipid levels in asthmatics and corticosteroid-treated asthmatic patients. J Proteome Res. 2014 Sep 5; 13(9):3919-29.
- Karra L, Haworth O, Priluck R, Levy BD, Levi-Schaffer F. Lipoxin B4 promotes the resolution of allergic inflammation in the upper and lower airways of mice. Mucosal Immunol. 2014 Dec 3
- Kasahara Y, Tuder RM, Cool CD, Voelkel NF. Expression of 15-lipoxygenase and evidence for apoptosis in the lungs from COPD. Chest 2000; 117:260
- Kawakami T, Ando T, Kimura M, Wilson BS, Kawakami Y. Mast cells in atopic dermatitis. Curr Opin Immunol. 2009 Dec; 21(6):666-78.
- Kawamoto N, Fukao T, Kaneko H, Hirayama K, Sakurai S, Arai T, Kondo M, Kawamoto M, Matsui E, Orii K, Kasahara K, Takemura M, Seishima M, Shiraki M, Iwasa S, Kondo N. Total IgE at 6 months predicts remittance or persistence of atopic dermatitis at 14 months. Allergy Asthma Proc. 2013 Jul-Aug; 34(4):362-9.
- Kayserova J, Sismova K, Zentsova-Jaresova I, Katina S, Vernerova E, Polouckova A, Capkova S, Malinova V, Striz I, Sediva A. A prospective study in children with a severe form of atopic dermatitis: clinical outcome in relation to cytokine gene polymorphisms. J Investig Allergol Clin Immunol. 2012; 22(2):92-101.
- Kim EJ, Kwon JW, Lim YM, Yoon D, Seo JH, Chang WS, Kim HY, Park JW, Cho SH, Hong SJ, Lee JS. Assessment of Total/Specific IgE Levels Against 7 Inhalant Allergens in Children Aged 3 to 6 Years in Seoul, Korea. Allergy Asthma Immunol Res. 2013 May; 5(3):162-9.
- Kim JH, Chang JH, Yoon JH, Lee JG, Bae JH, Kim KS. 15-Lipoxygenase-1 induced by interleukin-4 mediates apoptosis in oral cavity cancer cells. Oral Oncol. 2006 Sep; 42(8):825-30.
- Kim JH, Cheong HS, Park JS, Jang AS, Uh ST, Kim YH, Kim MK, Choi IS, Cho SH, Choi BW, Bae JS, Park CS, Shin HD. A genome-wide association study of total serum and mite-specific IgEs in asthma patients. PLoS One. 2013 Aug 13; 8(8):e71958.
- Kim JJ, Min JY, Lee JH. Polymorphisms in the IL-13 and IL-4 receptor alpha genes and allergic rhinitis. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2007 Apr; 264(4):395-9.
- Kim YJ, Park SW, Kim TH, Park JS, Cheong HS, Shin HD, Park CS. Genome-wide methylation profiling of the bronchial mucosa of asthmatics: relationship to atopy. BMC Med Genet. 2013 Mar 24; 14:39.
- Kinder M, Wei C, Shelat SG, Kundu M, Zhao L, Blair IA, Puré E. Hematopoietic stem cell function requires 12/15lipoxygenase-dependent fatty acid metabolism. Blood. 2010 Jun 17; 115(24):5012-22.
- Kleiner G, Marcuzzi A., Zanin V, Monasta L, Zauli G. Cytokine Levels in the Serum of Healthy Subjects, Mediators of Inflammation, Mediators Inflamm. 2013:434010. doi: 10.1155/2013/434010. Epub 2013 Mar 7.
- Klimek L, Hansen I, Mewes T, Haxel B. Erkrankungen des HNO-Bereichs. In: Saloga 2011, S. 309 ff.
- Knight JM, Lee SH, Roberts L, Smith CW, Weiss ST, Kheradmand F, Corry DB. CD11a polymorphisms regulate TH2 cell homing and TH2-related disease. J Allergy Clin Immunol. 2014 Jan; 133(1):189-97.e1-8.
- Korn S, Buhl R, Kamin W, Taube C. Asthma bronchiale. In: Saloga 2011, S. 335 ff.
- Korzycka-Zaborowska B, Zielińska-Bliźniewska H, Miłoński J, Olszewski J. High-affinity IgE receptor gene polymorphism and allergic rhinitis in a Polish population. Otolaryngol Pol. 2014 Jul-Aug; 68(4):196-9.
- Kotla S, Singh NK, Traylor JG Jr, Orr AW, Rao GN. ROS-dependent Syk and Pyk2-mediated STAT1 activation is required for 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid-induced CD36 expression and foam cell formation. Free Radic Biol Med. 2014 Nov; 76:147-62. Kraft, S. & Novak, N. Fc receptors as determinants of allergic reactions. Trends Immunol 27, 88-95(2006).
- Koulouri M, Vrachnou E, Liatsis E, Konstantopoulos A, Kanariou M. PD36 Evaluation of intracellular cytokines IL-2, IFNγ, IL-4 and IL-5 in children with atopic dermatitis and correlations with other immunological and

epidemiological parametersClin Transl Allergy. 2014 Feb 28; 4(Suppl 1 3rd Pediatric Allergy and Asthma Meeting (PAAM)Publi):P36.

- Kraich M, Klein M, Patiño E, Harrer H, Nickel J, Sebald W, Mueller TD. A modular interface of IL-4 allows for scalable affinity without affecting specificity for the IL-4 receptor. BMC Biol. 2006 Apr 26; 4:13.
- Kretschmer A, Möller G, Lee H, Laumen H, von Toerne C, Schramm K, Prokisch H, Eyerich S, Wahl S, Baurecht H, Franke A, Claussnitzer M, Eyerich K, Teumer A, Milani L, Klopp N, Hauck SM, Illig T, Peters A, Waldenberger M, Adamski J, Reischl E, Weidinger SA. A common atopy-associated variant in the Th2 cytokine locus control region impacts transcriptional regulation and alters SMAD3 and SP1 binding.. Allergy. 2014 May; 69(5):632-42..
- Krönke G, Katzenbeisser J, Uderhardt S, Zaiss MM, Scholtysek C, Schabbauer G, Zarbock A, Koenders MI, Axmann R, Zwerina J, Baenckler HW, van den Berg W, Voll RE, Kühn H, Joosten LA, Schett G. 12/15lipoxygenase counteracts inflammation and tissue damage in arthritis. J Immunol. 2009 Sep 1; 183(5):3383-9.
- Krönke G, Reich N, Scholtysek C, Akhmetshina A, Uderhardt S, Zerr P, Palumbo K, Lang V, Dees C, Distler O, Schett G, Distler JH. The 12/15-lipoxygenase pathway counteracts fibroblast activation and experimental fibrosis. Ann Rheum Dis. 2012 Jun; 71(6):1081-7.
- Kühn H, Belkner J, Wiesner R, Brash AR. Oxygenation of biological membranes by the pure reticulocyte lipoxygenase. J Biol Chem. 1990a Oct 25; 265(30):18351-61.
- Kühn H, Brash AR. Occurrence of lipoxygenase products in membranes of rabbit reticulocytes. Evidence for a role of the reticulocyte lipoxygenase in the maturation of red cells. J Biol Chem. 1990b Jan 25; 265(3):1454-8.
- Kühn H, O'Donnell VB. Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases. Prog Lipid Res. 2006 Jul; 45(4):334-56.
- Kühn H, Thiele BJ. The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. FEBS Lett. 1999 Apr 16; 449(1):7-11.
- Kühn H, Wiesner R, Schewe T. Formation of oxygenase and hydroperoxidase products by the pure reticulocyte lipoxygenase. Biomed Biochim Acta. 1990c; 49(2-3):S39-41.
- Kuitert LM, Newton R, Barnes NC, Adcock IM, Barnes PJ. Eicosanoid mediator expression in mononuclear and polymorphonuclear cells in normal subjects and patients with atopic asthma and cystic fibrosis. Thorax. 1996 Dec; 51(12):1223-8.
- Kulinski JM, Muñoz-Cano R, Olivera A. Sphingosine-1-phosphate and other lipid mediators generated by mast cells as critical players in allergy and mast cell function. Eur J Pharmacol. 2015 May 2. pii: S0014-2999(15)00402-1.
- Kumar A, Das S, Agrawal A, Mukhopadhyay I, Ghosh B. Genetic association of key Th1/Th2 pathway candidate genes, IRF2, IL6, IFNGR2, STAT4 and IL4RA, with atopic asthma in the Indian population. J Hum Genet. 2015 Aug; 60(8):443-8.
- Lama M, Chatterjee M, Chaudhuri TK. Total serum immunoglobulin e in children with asthma. Indian J Clin Biochem. 2013 Apr; 28(2):197-200. doi: 10.1007/s12291-012-0247-2.
- Larsson N, Lundström SL, Pinto R, Rankin G, Karimpour M, Blomberg A, Sandström T, Pourazar J, Trygg J, Behndig AF, Wheelock CE, Nording ML. Lipid mediator profiles differ between lung compartments in asthmatic and healthy humans. Eur Respir J. 2014 Feb; 43(2):453-63.
- Lattka E, Klopp N, Demmelmair H, Klingler M, Heinrich J, Koletzko B. Genetic variations in polyunsaturated fatty acid metabolism--implications for child health? Ann Nutr Metab. 2012; 60 Suppl 3:8-17.
- Lee BW, Geha RS, Leung DY. IgE response and its regulation in allergic diseases. Pediatr Clin North Am. 1988 Oct; 35(5):953-67..
- Lee YW, Kühn H, Kaiser S, Hennig B, Daugherty A, Toborek M. Interleukin 4 induces transcription of the 15lipoxygenase I gene in human endothelial cells. J Lipid Res. 2001 May; 42(5):783-91.
- Levy BD, De Sanctis GT, Devchand PR, Kim E, Ackerman K, Schmidt BA, Szczeklik W, Drazen JM, Serhan CN. Multi-pronged inhibition of airway hyper-responsiveness and inflammation by lipoxin A(4). Nat Med. 2002 Sep; 8(9):1018-23.
- Levy BD, Romano M, Chapman HA, Reilly JJ, Drazen J, Serhan CN. Human alveolar macrophages have 15lipoxygenase and generate 15(S)-hydroxy-5,8,11-cis-13-trans-eicosatetraenoic acid and lipoxins. J Clin Invest. 1993 Sep; 92(3):1572-9.
- Levy F, Kristofic C, Heusser C, Brinkmann V. Role of IL-13 in CD4 T cell-dependent IgE production in atopy. Int Arch Allergy Immunol. 1997 Jan; 112(1):49-58.
- Li J, Lin LH, Wang J, Peng X, Dai HR, Xiao H, Li F, Wang YP, Yang ZJ, Li L. Interleukin-4 and interleukin-13 pathway genetics affect disease susceptibility, serum immunoglobulin E levels, and gene expression in asthma. Ann Allergy Asthma Immunol. 2014 Aug; 113(2):173-179.e1.
- Liang Y, Wang P, Zhao M, Liang G, Yin H, Zhang G, Wen H, Lu Q. Demethylation of the FCER1G promoter leads to FccRI overexpression on monocytes of patients with atopic dermatitis. Allergy. 2012 Mar; 67(3):424-30.

- Lieb DC, Brotman JJ, Hatcher MA, Aye MS, Cole BK, Haynes BA, Wohlgemuth SD, Fontana MA, Beydoun H, Nadler JL, Dobrian AD. Adipose tissue 12/15 lipoxygenase pathway in human obesity and diabetes. J Clin Endocrinol Metab. 2014 Sep; 99(9):E1713-20.
- Lin HC, Lin TH, Wu MY, Chiu YC, Tang CH, Hour MJ, Liou HC, Tu HJ, Yang RS5, Fu WM. 5-Lipoxygenase inhibitors attenuate TNF-α-induced inflammation in human synovial fibroblasts. PLoS One. 2014 Sep 17; 9(9):e107890.
- Lindley AR, Crapster-Pregont M, Liu Y, Kuperman DA. 12/15-lipoxygenase is an interleukin-13 and interferon-γ counterregulated-mediator of allergic airway inflammation. Mediators Inflamm. 2010; 2010. pii: 727305.
- Lissner D, Schumann M, Batra A, Kredel LI, Kühl AA, Erben U, May C, Schulzke JD, Siegmund B. Monocyte and M1 Macrophage-induced Barrier Defect Contributes to Chronic Intestinal Inflammation in IBD. Inflamm Bowel Dis. 2015 Jun; 21(6):1297-305.
- Liu C, Xu D, Han H, Fan Y, Schain F, Xu Z, Claesson HE, Björkholm M, Sjöberg J. Transcriptional regulation of 15-lipoxygenase expression by histone h3 lysine 4 methylation/demethylation. PLoS One. 2012a; 7(12):e52703.
- Liu C, Xu D, Sjoberg J, Forsell P, Bjorkholm M, *et al.* Transcriptional regulation of 15-lipoxygenase expression by promoter methylation. Exp Cell Res 2004; 297:61–67
- Liu Y, Ma C, Zhang Q, Yu L, Ma J, Zhang L, Hao X, Cao F, Wang L, Zhu D. The key role of transforming growth factor-beta receptor I and 15-lipoxygenase in hypoxia-induced proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells. Int J Biochem Cell Biol. 2012b Jul; 44(7):1184-202.
- Lou H, Fu Y, Wang C, Wang Y, Zhang L. Imbalance between Th1 and Th2 cells in cord blood is influenced by maternal allergic rhinitis and associated with atopic dermatitis during the first two years of life Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi. 2014 May;49(5):390-4.
- Lundström SL, Yang J, Källberg HJ, Thunberg S, Gafvelin G, Haeggström JZ, Grönneberg R, Grunewald J, van Hage M, Hammock BD, Eklund A, Wheelock ÅM, Wheelock CE. Allergic asthmatics show divergent lipid mediator profiles from healthy controls both at baseline and following birch pollen provocation. PLoS One. 2012; 7(3):e33780.
- Lv J, Zou L, Zhao L, Yang W, Xiong Y, Li B, He R. LTB4 -BLT1 axis promotes OXA-induced contact dermatitis by directing skin homing of neutrophils and CD8+ T cells. Immunology. 2015 May 9.
- Mabalirajan U, Rehman R, Ahmad T, Kumar S, Leishangthem GD, Singh S, Dinda AK, Biswal S, Agrawal A, Ghosh B. 12/15-lipoxygenase expressed in non-epithelial cells causes airway epithelial injury in asthma. Sci Rep. 2013; 3:1540.
- Macglashan D Jr. IgE and Fc{epsilon}RI regulation. Ann N Y Acad Sci. 2005 Jun; 1050:73-88.
- Maddox JF, Serhan CN. Lipoxin A4 and B4 are potent stimuli for human monocyte migration and adhesion: selective inactivation by dehydrogenation and reduction. J Exp Med. 1996 Jan 1; 183(1):137-46.
- Magnan A, Mély L, Prato S, Vervloet D, Romagné F, Camilla C, Necker A, Casano B, Montero-Jullian F, Fert V, Malissen B, Bongrand. Relationships between natural T cells, atopy, IgE levels, and IL-4 production. Allergy. 2000 Mar; 55(3):286-90.
- Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. F1000Prime Rep. 2014 Mar 3; 6:13.
- Maskrey BH, Bermúdez-Fajardo A, Morgan AH, Stewart-Jones E, Dioszeghy V, Taylor GW, Baker PR, Coles B, Coffey MJ, Kühn H, O'Donnell VB. Activated platelets and monocytes generate four hydroxyphosphatidylethanolamines via lipoxygenase. J Biol Chem. 2007 Jul 13; 282(28):20151-63.
- Matsumoto K, Taki F, Miura M, Matsuzaki M, Takagi K. Serum levels of soluble IL-2R, IL-4, and soluble Fc epsilon RII in adult bronchial asthma. Chest 1994; 105: 681–686
- Mattmiller SA, Carlson BA, Gandy JC, Sordillo LM. Reduced macrophage selenoprotein expression alters oxidized lipid metabolite biosynthesis from arachidonic and linoleic acid. J Nutr Biochem. 2014 Jun; 25(6):647-54.
- Mazurek JM, White GE, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Work-related asthma—22 states, 2012. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2015 Apr 10; 64(13):343-6.
- McAleer MA, Irvine AD. The multifunctional role of filaggrin in allergic skin disease. J Allergy Clin Immunol. 2013 Feb; 131(2):280-91.
- Melnik B, Plewig G. Are disturbances of omega-6-fatty acid metabolism involved in the pathogenesis of atopic dermatitis? Acta Derm Venereol Suppl (Stockh). 1992; 176:77-85.
- Middleton MK, Zukas AM, Rubinstein T, Kinder M, Wilson EH, Zhu P, Blair IA, Hunter CA, Puré E. 12/15lipoxygenase-dependent myeloid production of interleukin-12 is essential for resistance to chronic toxoplasmosis. Infect Immun. 2009 Dec; 77(12):5690-700.
- Nassar GM, Morrow JD, Roberts LJ 2nd, Lakkis FG, Badr KF. Induction of 15-lipoxygenase by interleukin-13 in human blood monocytes. J Biol Chem. 1994 Nov 4; 269(44):27631-4.
- Nishiyama C, Akizawa Y, Nishiyama M, Tokura T, Kawada H, Mitsuishi K, Hasegawa M, Ito T, Nakano N, Okamoto A, Takagi A, Yagita H, Okumura K, Ogawa H. Polymorphisms in the Fc epsilon RI beta

promoter region affecting transcription activity: a possible promoter-dependent mechanism for association between Fc epsilon RI beta and atopy. J Immunol. 2004 Nov 15; 173(10):6458-64.

- Norment AM, Salter RD, Parham P, Engelhard VH, Littman DR. Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. Nature. 1988 Nov 3; 336(6194):79-81.
- Novak N, Bieber T, Kraft S. Immunoglobulin E-bearing antigen-presenting cells in atopic dermatitis. Curr Allergy Asthma Rep. 2004 Jul; 4(4):263-9.
- Novak N. An update on the role of human dendritic cells in patients with atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2012 Apr; 129(4):879-86.
- O'Flaherty JT, Hu Y, Wooten RE, Horita DA, Samuel MP, Thomas MJ, Sun H, Edwards IJ. 15-lipoxygenase metabolites of docosahexaenoic acid inhibit prostate cancer cell proliferation and survival. PLoS One. 2012; 7(9):e45480.
- Okayama Y1. Oxidative stress in allergic and inflammatory skin diseases. Curr Drug Targets Inflamm Allergy.2005 Aug:4(4):517-9.
- Ono E, Dutile S, Kazani S, Wechsler ME, Yang J, Hammock BD, Douda DN, Tabet Y, Khaddaj-Mallat R, Sirois M, Sirois C, Rizcallah E, Rousseau E, Martin R, Sutherland ER, Castro M, Jarjour NN, Israel E, Levy BD; National Heart, Lung, and Blood Institute's Asthma Clinical Research Network. Lipoxin generation is related to soluble epoxide hydrolase activity in severe asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2014 Oct 15; 190(8):886-97.
- Pallast S, Arai K, Wang X, Lo EH, van Leyen K. 12/15-Lipoxygenase targets neuronal mitochondria under oxidative stress. J Neurochem. 2009 Nov; 111(3):882-9.
- Pardi R, Bender JR. Signal requirements for the generation of CD4+ and CD8+ T-cell responses to human allogeneic microvascular endothelium. Circ Res. 1991 Nov; 69(5):1269-79.
- Paul WE. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. Blood. 1991 May 1; 77(9):1859-70.
- Pauly S, Broll K, Wittmann M, Giegerich G, Schwarz H. CD137 is expressed by follicular dendritic cells and costimulates B lymphocyte activation in germinal centers. J Leukoc Biol. 2002 Jul; 72(1):35-42.
- Pavlovic V, Dimic A, Milenkovic S, Krtinic D. Serum levels of IL-17, IL-4, and INFγ in Serbian patients with early rheumatoid arthritis. Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences. 2014;19(1):18-22.
- Peiser M, Wanner R, Kolde G. Human epidermal Langerhans cells differ from monocyte-derived Langerhans cells in CD80 expression and in secretion of IL-12 after CD40 cross-linking. J Leukoc Biol. 2004 Sep; 76(3):616-22.
- Perkin MR, Strachan DP, Williams HC, Lack G, Golding J; ALSPAC Study Team. The predictive value of early life total immunoglobulin E measurement in identifying atopic children in a population-based birth cohort study. Pediatr Allergy Immunol. 2006 Mar; 17(2):118-24.
- Peters JH, Xu H, Ruppert J, Ostermeier D, Friedrichs D, Gieseler RK. Signals required for differentiating dendritic cells from human monocytes in vitro. Adv Exp Med Biol. 1993; 329:275-80.
- Peters MC, Mekonnen ZK, Yuan S, Bhakta NR, Woodruff PG, Fahy JV. Measures of gene expression in sputum cells can identify TH2-high and TH2-low subtypes of asthma. J Allergy Clin Immunol. 2014 Feb; 133(2):388-94.
- Petersen B, Austen KF, Bloch KD, Hotta Y, Ichinose F, Kanaoka Y, Zapol WM. Cysteinyl leukotrienes impair hypoxic pulmonary vasoconstriction in endotoxemic mice. Anesthesiology. 2011 Oct; 115(4):804-11.
- Piccinni MP, Beloni L, Giannarini L, Livi C, Scarselli G, Romagnani S, Maggi E. Abnormal production of T helper 2 cytokines interleukin-4 and interleukin-5 by T cells from newborns with atopic parents. Eur J Immunol. 1996 Oct; 26(10):2293-8.
- Pichler WJ, Peter H-H. Immunsystem. In: Klinische Pathophysiologie. Siegenthaler W, Blum HE. 9. Auflage 2006, Georg Thieme Verlag Stuttgart, S. 487
- Poljak RJ. Studies on the Three-Dimensional Structure of Immunoglobulins. Immunoglobulins Comprehensive Immunology Volume 5, 1978, pp 1-36
- Powell WS1, Rokach J. The eosinophil chemoattractant 5-oxo-ETE and the OXE receptor.Prog Lipid Res. 2013 Oct;52(4):651-65. doi: 10.1016/j.plipres.2013.09.001. Epub 2013 Sep 19.
- Profita M, Sala A, Riccobono L, Paternò A, Mirabella A, Bonanno A, Guerrera D, Pace E, Bonsignore G, Bousquet J, Vignola AM. 15-Lipoxygenase expression and 15(S)-hydroxyeicoisatetraenoic acid release and reincorporation in induced sputum of asthmatic subjects. J Allergy Clin Immunol. 2000 Apr; 105(4):711-6.
- Profita M, Sala A, Siena L, Henson PM, Murphy RC, Paternò A, Bonanno A, Riccobono L, Mirabella A, Bonsignore G, Vignola AM. Leukotriene B4 production in human mononuclear phagocytes is modulated by interleukin-4-induced 15-lipoxygenase. J Pharmacol Exp Ther. 2002 Mar; 300(3):868-75.
- Profita M, Vignola AM, Sala A, Mirabella A, Siena L, Pace E, Folco G, Bonsignore G. Interleukin-4 enhances 15lipoxygenase activity and incorporation of 15(S)-HETE into cellular phospholipids in cultured pulmonary epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 1999 Jan; 20(1):61-8.

- Püschel G, Kühn H, Kietzmann T, Höhne W, Christ B, Doenecke D, Koolman J. Taschenlehrbuch Biochemie. Thieme Verlag Stuttgart 2011
- Rajkovic I, Dragicevic A, Vasilijic S, Bozic B, Dzopalic T, Tomic S, Majstorovic I, Vucevic D, Djokic J, Balint B, Colic M. Differences in T-helper polarizing capability between human monocyte-derived dendritic cells and monocyte-derived Langerhans'-like cells. Immunology. 2011 Feb; 132(2):217-25.
- Rantala A; Jaakkola JJ; Jaakkola MS, Plos One, ISSN: 1932-6203, 2013 Jul 19; Vol. 8 (7), pp. e68582
- Reilly KB, Srinivasan S, Hatley ME, Patricia MK, Lannigan J, Bolick DT, Vandenhoff G, Pei H, Natarajan R, Nadler JL, Hedrick CC. 12/15-Lipoxygenase activity mediates inflammatory monocyte/endothelial interactions and atherosclerosis in vivo. J Biol Chem. 2004 Mar 5; 279(10):9440-50.
 Dirac L, Densen JL, Ataraja and Ataraja Flores Lipoxygenase activity for a second se
- Ring J, Darsow U. Atopie und atopisches Ekzem. In: Braun-Falco 2006, S. 377
- Ringholz FC, Buchanan PJ, Clarke DT, Millar RG, McDermott M, Linnane B, Harvey BJ, McNally P, Urbach V. Reduced 15-lipoxygenase 2 and lipoxin A4/leukotriene B4 ratio in children with cystic fibrosis. Eur Respir J. 2014 Aug; 44(2):394-404.
- Rodríguez-Lagunas MJ, Storniolo CE, Ferrer R, Moreno JJ. 5-Hydroxyeicosatetraenoic acid and leukotriene D4 increase intestinal epithelial paracellular permeability. Int J Biochem Cell Biol. 2013 Jul; 45(7):1318-26.
- Rogge JL, Hanifin JM. Immunodeficiencies in severe atopic dermatitis. Depressed chemotaxis and lymphocyte transformation. Arch Dermatol. 1976 Oct; 112(10):1391-6.
- Rose MJ, Page C. Glycosaminoglycans and the regulation of allergic inflammation. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2004 Sep; 3(3):221-5.
- Ruzicka T, Simmet T, Peskar BA, Ring J. Skin levels of arachidonic acid-derived inflammatory mediators and histamine in atopic dermatitis and psoriasis. J Invest Dermatol. 1986 Feb; 86(2):105-8.
- Ryan SO, Cobb BA. Roles for major histocompatibility complex glycosylation in immune function. Semin Immunopathol. 2012 May; 34(3):425-41.
- Sääf AM, Tengvall-Linder M, Chang HY, Adler AS, Wahlgren CF, Scheynius A, Nordenskjöld M, Bradley M. Global expression profiling in atopic eczema reveals reciprocal expression of inflammatory and lipid genes. PLoS One. 2008; 3(12):e4017.
- Sallusto F, Lanzavecchia A Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. J Exp Med. 1994 Apr 1; 179(4):1109-18.
- Saloga J, Grabbe S. Allergie vom Soforttyp (Typ I) antigenpräsentierende Zellen und Lymphozyten. In. Saloga J, Allergologie-Handbuch: Grundlagen und klinische Praxis. Thieme Verlag 2011, S. 70-77. S.218 ff.
- Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WH. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. J Cell Sci. 2009 May 1; 122(Pt 9):1285-94.
- Sayers I, Barton S, Rorke S, Sawyer J, Peng Q, Beghé B, Ye S, Keith T, Clough JB, Holloway JW, Sampson AP, Holgate ST. Promoter polymorphism in the 5-lipoxygenase (ALOX5) and 5-lipoxygenase-activating protein (ALOX5AP) genes and asthma susceptibility in a Caucasian population. Clin Exp Allergy. 2003 Aug; 33(8):1103-10.
- Schieck M, Michel S1, Suttner K, Illig T, Zeilinger S, Franke A, Vogelberg C, von Berg A, Bufe A, Heinzmann A, Laub O, Rietschel E, Simma B, Frischer T, Genuneit J, Kerzel S, Kabesch. Genetic variation in TH17 pathway genes, childhood asthma, and total serum IgE levels. J Allergy Clin Immunol. 2014 Mar; 133(3):888-91.
- Schleimer RP, Fox CC, Naclerio RM, Plaut M, Creticos PS, Togias AG, Warner JA, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. Role of human basophils and mast cells in the pathogenesis of allergic diseases. J Allergy Clin Immunol. 1985 Aug; 76(2 Pt 2):369-74.
- Schmitz J, Thiel A, Kühn R, Rajewsky K, Müller W, Assenmacher M, Radbruch A. Induction of interleukin 4 (IL-4) expression in T helper (Th) cells is not dependent on IL-4 from non-Th cells. J Exp Med. 1994 Apr 1; 179(4):1349-53.
- Seiler A, Schneider M, Förster H, Roth S, Wirth EK, Culmsee C, Plesnila N, Kremmer E, Rådmark O, Wurst W, Bornkamm GW, Schweizer U, Conrad M. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. Cell Metab. 2008 Sep; 8(3):237-48.
- Serhan CN, Chiang N. Lipid-derived mediators in endogenous anti-inflammation and resolution: lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins. ScientificWorldJournal. 2002 Jan 22; 2:169-204.
- Shah PS, Wegienka G, Havstad S, Johnson CC, Ownby DR, Zoratti EM. The relationship between cord blood immunoglobulin E levels and allergy-related outcomes in young adults. Ann Allergy Asthma Immunol. 2011 Mar;106(3):245-51. doi: 10.1016/j.anai.2010.12.006. Epub 2011 Jan 26.
- Shankaranarayanan P, Chaitidis P, Kühn H, Nigam S. Acetylation by histone acetyltransferases CREB-binding protein/p300 of STAT6 is required for transcriptional activation of the 15-lipoxygenase-1 gene. J. Biol. Chem. 2001; 276: 42

- Shankaranarayanan P, Nigam S. IL-4 induces apoptosis in A549 lung adenocarcinoma cells: evidence for the pivotal role of 15-hydroxyeicosatetraenoic acid binding to activated peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcription factor. J Immunol. 2003 Jan 15; 170(2):887-94.
- Sigal E, Sloane DL, Conrad DJ. Human 15-lipoxygenase: induction by interleukin-4 and insights into positional specificity. J Lipid Mediat. 1993 Mar-Apr;6(1-3):75-88.
- Song YS, Yang EM, Kim SH, Jin HJ, Park HS. Effect of genetic polymorphism of ALOX-15 on aspirin-exacerbated respiratory disease. Int Arch Allergy Immunol. 2012; 159(2):157-61.
- Song Z, Deng X, Chen W, Xu J, Chen S, Zhong H, Hao F. Toll-like receptor 2 agonist Pam3CSK4 up-regulates FccRI receptor expression on monocytes from patients with severe extrinsic atopic dermatitis. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2015 Apr 24.
- Spanbroek R, Hildner M, Köhler A, Müller A, Zintl F, Kühn H, Rådmark O, Samuelsson B, Habenicht AJ. IL-4 determines eicosanoid formation in dendritic cells by down-regulation of 5-lipoxygenase and up-regulation of 15-lipoxygenase 1 expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Apr 24; 98(9):5152-7.
- Speiran K, Bailey DP, Fernando J, Macey M, Barnstein B, Kolawole M, Curley D, Watowich SS, Murray PJ, Oskeritzian C, Ryan JJ. Endogenous suppression of mast cell development and survival by IL-4 and IL-10. J Leukoc Biol. 2009 May; 85(5):826-36.
- Steinke JW, Borish L. Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. Respir Res. 2001; 2(2):66-70.
- Stokes K, LaMarche NM, Islam N, Wood A, Huang W, August A. Cutting edge: STAT6 signaling in eosinophils is necessary for development of allergic airway inflammation. J Immunol. 2015 Mar 15; 194(6):2477-81.
- Strannegård IL. Adherent suppressor cells in atopic disease. Int Arch Allergy Appl Immunol. 1981; 64(3):308-13.
- Takahashi E, Hilmi OJ, Shepherd MC, Miller DK, McSharry C. Tolar P, Spillane KM. Force generation in B-cell synapses: mechanisms coupling B-cell receptor binding to antigen internalization and affinity discrimination. Adv Immunol. 2014; 123:69-100.
- Tavakkol Afshari J1, Farid Hosseini R, Hosseini Farahabadi S, Heydarian F, Boskabady MH, Khoshnavaz R, Razavi A, Ghayoor Karimiani E, Ghasemi G. Association of the expression of IL-4 and IL-13 genes, IL-4 and IgE serum levels with allergic asthma. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2007 Jun;6(2):67-72.
- Teder T, Boeglin WE, Brash AR. Lipoxygenase-catalyzed transformation of epoxy fatty acids to hydroxyendoperoxides: a potential P450 and lipoxygenase interaction. J Lipid Res. 2014 Dec; 55(12):2587-96.
- Thivierge M, Stanková J, Rola-Pleszczynski M. IL-13 and IL-4 up-regulate cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in human monocytes and macrophages. J Immunol. 2001 Sep 1; 167(5):2855-60.
- Thomson NC, Chaudhuri R, Spears M, Messow CM, Jelinsky S, Miele G, Nocka K, Arachidonic acid metabolites and enzyme transcripts in asthma are altered by cigarette smoking. Allergy. 2014 Apr; 69(4):527-36.
- Trandafir CC, Nishihashi T, Ji X, Wang A, Kurahashi K. Cysteinyl leukotrienes and leukotriene B mediate vasoconstriction to arginine vasopressin in rat basilar artery. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2005 Dec; 32(12):1027-33.
- Tu YL, Chang SW, Tsai HJ, Chen LC, Lee WI, Hua MC, Cheng JH, Ou LS, Yeh KW, Huang JL, Yao TC. PATCH study group Total serum IgE in a population-based study of Asian children in Taiwan: reference value and significance in the diagnosis of allergy. PLoS One. 2013 Nov 20; 8(11):e80996.
- Tugal D, Liao X, Jain MK. Transcriptional control of macrophage polarization. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013 Jun; 33(6):1135-44.
- Uderhardt S, Krönke G. 12/15-lipoxygenase during the regulation of inflammation, immunity, and self-tolerance. J Mol Med (Berl). 2012 Nov; 90(11):1247-56.
- Vakirlis E, Lazaridou E, Tzellos TG, Gerou S, Chatzidimitriou D, Ioannides D Investigation of cytokine levels and their association with SCORAD index in adults with acute atopic dermatitis. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2011 Apr; 25(4):409-16.
- Walther M, Wiesner R, Kühn H. Investigations into calcium-dependent membrane association of 15-lipoxygenase-1. Mechanistic roles of surface-exposed hydrophobic amino acids and calcium. J Biol Chem. 2004 Jan 30; 279(5):3717-25.
- Wang XH, Zhao W, Liu SG, Feng XP. Correlation of IL-4 and IL-13 gene polymorphisms with asthma and total serum IgE levels]. Zhonghua Jie He Hu Xi Za Zhi. 2009 Mar; 32(3):161-4.
- Wasserman SI. Mast cell biology. J Allergy Clin Immunol. 1990 Oct; 86(4 Pt 2):590-3.
- Weidinger S, Illig T, Baurecht H, Irvine AD, Rodriguez E, Diaz-Lacava A, Klopp N, Wagenpfeil S, Zhao Y, Liao H, *et al.* Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations. The Journal of allergy and clinical immunology 2006; 118:214-219.
- Weller K, Soost S, Worm M, Maurer M, Zuberbier T. Atopische Dermatitis und allergische Rhinitis gibt es Co-Effekte in der Therapie? JDDG 2012; 10:221–236
- Wenceslau CF, McCarthy CG, Szasz T, Webb RC. Lipoxin A4 mediates aortic contraction via RHOA/RHO kinase, endothelial dysfunction and reactive oxygen species. J Vasc Res. 2014; 51(6):407-17.

- Wills-Karp M. The gene encoding interleukin-13: a susceptibility locus for asthma and related traits. Respir Res. 2000; 1(1):19-23.
- Winge MC, Hoppe T, Berne B, Vahlquist A, Nordenskjöld M, Bradley M, Törmä H. Filaggrin genotype determines functional and molecular alterations in skin of patients with atopic dermatitis and ichthyosis vulgaris. PLoS One. 2011; 6(12):e28254.
- Woltmann G, McNulty CA, Dewson G, Symon FA, Wardlaw AJ. Interleukin-13 induces PSGL-1/P-selectindependent adhesion of eosinophils, but not neutrophils, to human umbilical vein endothelial cells under flow. Blood. 2000 May 15; 95(10):3146-52..
- Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Jia G, Abbas AR, Ellwanger A, Koth LL, Arron JR, Fahy JV. T-helper type 2driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2009 Sep 1; 180(5):388-95.
- Wu J, Lin R, Huang J, Guan W, Oetting WS, Sriramarao P, Blumenthal MN. Functional Fcgamma receptor polymorphisms are associated with human allergy. PLoS One. 2014 Feb 21; 9(2):e89196.
- Wu SH, Liao PY, Yin PL, Zhang YM, Dong L. Elevated expressions of 15-lipoxygenase and lipoxin A4 in children with acute poststreptococcal glomerulonephritis. Am J Pathol. 2009 Jan; 174(1):115-22.
- Wuest SJ, Crucet M, Gemperle C, Loretz C, Hersberger M. Expression and regulation of 12/15-lipoxygenases in human primary macrophages. Atherosclerosis 2012 Nov; 225(1):121-7.
- Xu B, Bhattacharjee A, Roy B, Feldman GM, Cathcart MK. Role of protein kinase C isoforms in the regulation of interleukin-13-induced 15-lipoxygenase gene expression in human monocytes. J Biol Chem. 2004 Apr 16; 279(16):15954-60.
- Yamaji-Kegan K, Takimoto E, Zhang A, Weiner NC, Meuchel LW, Berger AE, Cheadle C, Johns RA. Hypoxiainduced mitogenic factor (FIZZ1/RELMα) induces endothelial cell apoptosis and subsequent interleukin-4dependent pulmonary hypertension. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2014 Jun 15; 306(12):L1090-103.
- Yin PL, Wu SH, Yao WJ, Wu HM, Jiang HM, Su HP, Xu D, Ye XL. Reversed changes of the 15-lipoxygenase product lipoxin A₄ and the 5-lipoxygenase product leukotriene C4 in children with asthma. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi. 2010 Jul; 33(7):530-3.
- Zhang G, Liu X, Wang C, Qu L, Deng J, Wang H, Qin Z. Resolution of PMA-induced skin inflammation involves interaction of IFN-γ and ALOX-15. Mediators Inflamm. 2013; 2013:930124.
- Zhu M, Wang X, Schultzberg M, Hjorth E. Differential regulation of resolution in inflammation induced by amyloid-β42 and lipopolysaccharides in human microglia. J Alzheimers Dis. 2015; 43(4):1237-50.
- Zhu N, Gong Y, Chen XD, Zhang J, Long F, He J, Xia JW, Dong L. Association between the polymorphisms of interleukin-4, the interleukin-4 receptor gene and asthma. Chin Med J (Engl). 2013; 126(15):2943-51.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

"Ich, Andrea Kalledat, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

"Untersuchungen zum oxidativen Stoffwechsel mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Monozyten von Patienten mit atopischen Erkrankungen"

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe "Uniform Requirements for Manuscripts (URM)" des ICMJE *-www.icmje.org*) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst."

Datum

Unterschrift

Meinen herzlichsten Dank an...

Herrn Prof. Dr. Hartmut Kühn

Universitätsklinikum Charité, Institut für Biochemie, 10117 Berlin,

für sein unermüdliches Engagement und meine Studienbetreuung im Fach Biochemie,

allen **Mitarbeitern** seiner Arbeitsgruppe und den Kollegen anderer Fachabteilungen der Charité für die freundliche Zusammenarbeit,

meinem Chefarzt Herrn Prof. Dr. Michael Berliner

Helios Klinikum Berlin-Buch, Klinik für Physikalische Medizin und Geriatrie, 13125 Berlin,

für seine Mitarbeitermotivation, sich stetig weiter zu qualifizieren, berufliche Herausforderungen anzunehmen sowie Bildungsziele zu verwirklichen

und

meinem Partner Hubert Schafzahl und unseren Kindern Adrian, Juliana, Jessica, Andor, Christoph, Ailan und Wolfgang sowie meiner Familie

für das Zugeständnis der erforderlichen Freiräume zur Erstellung meiner Dissertation.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Lebenslauf

Anhang

ANHANG

Anhang 1: Patientendaten

Nichtatopiker: 44 Probanden (NA); Atopiker: 81 Probanden (A)

Einzelne Krankheitsbilder der Atopie (Entitäten):

Patienten mit Rhinitis allergica: 46 Probanden (Rhinall); mit Asthma bronchiale: 20 Probanden (Asthma), mit Atopischem Ekzem: 15 Probanden (Atopekzem)

| Entität / Nr. | Geburts- datum | Geschlecht | Diagnose | Medikation |
|-------------------|-------------------|------------|---------------------------------------|---|
| Nichtatopiker: NA | | | | |
| 44 Probanden | | | | |
| 1 | 11.04.73 | W | Psoriasis, Trigeminusneuralgie | Topische Therapie, Balneotherapie |
| 2 | 31.01.67 | m | Psoriasis | Topische Therapie |
| 3 | 03.02.68 | m | Psoriasis | Topische Therapie |
| 4 | 15.09.43 | W | Psoriasis, KHK, Arterielle Hypertonie | Ramipril 5 mg |
| | | | | 1-0-0, Beloc Zok mite 1-0-0, Simvastatin 20 mg 0-0-0-1, Plavix 75 |
| | | | | mg 1-0-0 |
| 5 | 13.01.67 | m | Psoriasis | keine |
| 6 | 23.03.44 | m | Ulcus cruris Arterielle Hypertonie | Beloc Zok mite 1-0-0, Ramipril 5 mg 1-0-0 |
| 7 | 19.02.40 | m | Seborrhoische Keratose | Keine |
| 8 | 11.06.40 | W | Ulcus cruris bei Diabetes mellitus | Insulintherapie |
| 9 | 15.09.62 | W | Onychomykose | Lokalbehandlung |
| 10 | 12.07.29 | m | Aktinische Keratose, Z.n. Apoplex, | Z.n. OP |
| | | | Hyperlipidämie | Simvastatin 20 mg 0-0-0-1 |
| 11 | 11.06.65 | m | Onychomykose | Lokalbehandlung |
| 12 | 12.06.49 | W | Onychomykose | Systemische Therapie mit Fluconazol |
| 13 | 01.09.52 | W | Vitiligo | Keine |
| 14 | 19.02.37 | W | Ulcus cruris bei Diabetes mellitus, | Insulintherapie, Simvastatin 20 mg 0-0-0-1 |
| | | | Adipositas per magna, Hyperlipidämie | |
| 15 | 25.05.67 | m | Ulcus cruris bei Diabetes mellitus | Metformin 500 mg, 1-0-1 |
| 16 | 03.05.74 | m | Impetigo | Keine |
| 17 | 24.05.75 | W | Impetigo, Migräne | Keine |
| 18 | 01.09.63 | m | Hypertrichose | Keine, Diagnostik laufend |
| 19 | 25.02.75 | W | Vitiligo | Keine |
| 20 | 05.02.84 | m | Akne conglobata, Hypothyreose | Phototherapie, L-Thyroxin 50 mg 1-0-0 |

| Entität / Nr. | Geburts- datum | Geschlecht | Diagnose | Medikation |
|--|-------------------|------------|--|---|
| 21 | 11.11.42 | m | Vd. a. Sklerodermie | Erstdiagnostik |
| 22 | 09.10.34 | W | Basaliom, Adipositas per magna, Hypothyreose | L-Thyroxin 75 µg |
| 23 | 28.04.71 | m | Pemphigus vulgaris | Kortikoidbehandlung |
| 24 | 18.1257 | W | Verdacht auf Basaliom | Erstdiagnostik |
| 25 | 03.05.56 | W | Rosazea | Keine |
| 26 | 23.10.67 | W | Onychomykose | Topische Therapie |
| 27 | 25.02.46 | m | Rosazea, Hypothyreose | L-Thyroxin 25 mg 1-0-0 |
| 28 | 29.07.70 | W | Hypertrichose | Keine |
| 29 | 09.06.60 | w | Soorösophagitis Zustand nach Chemotherapie bei Hypopharynxkarzinom | Antimykotische Systemtherapie |
| 30 | 28.12.69 | W | Akne inversa, Migräne | Carotinoide, Phototherapie |
| 31 | 05.03.79 | W | Akne inversa | Carotinoide |
| 32 | 20.09.69 | W | Akne comedonica | Topische Therapie |
| 33 | 25.10.21 | W | Aktinische Keratose, Arterielle Hypertonie, | Z.n. OP, |
| | | | Hypothyreose | Ramipril 10 mg 1-0-0, L-Thyroxin 75 µg |
| 34 | 09.04.43 | W | Alopecia areata, Adipositas per magna, Z.n. Mammakarzinom 1999 | Zytostatische Therapie: Tamoxifen |
| 35 | 27.07.51 | m | Herpes Zoster | Zostex |
| 36 | 09.05.75 | m | Alopecia areata | keine |
| 37 | 15.04.42 | W | Alopecia areata, Arterielle Hypertonie | Ramipril 5 mg 1-0-1 Beloc Zok mite 1-0-0 |
| 38 | 08.06.63 | W | Alopecia areata | keine |
| 39 | 12.06.71 | W | Onychomykose | Topische Therapie |
| 40 | 15.06.54 | W | Ichtyosis, Arterielle Hypertonie, Z.n. Mammakarzinom | Topische Therapie, Candesartan 8 mg 1-0-0, Zytostatische Therapie: Tamoxifen |
| 41 | 06.12.72 | m | Onychomykose | keine |
| 42 | 04.12.67 | W | Onychomykose | keine |
| 43 | 05.11.36 | m | Basaliom, Arterielle Hypertonie, Fortgeschrittene Demenz | Candesartan 16 mg 1-0-0, Ginkgo bilioba |
| 44 | 13.11.52 | m | Vd. a. Basaliom | keine |
| Atopiker A (81) | | | | |
| Rhinitis allergica: (Rhinall) 46 Probanden | | | | |

| Entität / Nr. | Geburts- datum | Geschlecht | Diagnose | Medikation |
|---------------|-------------------|------------|---|--|
| 1 | 02.05.65 | W | Rhinitis allergica | Antihistaminika, Hyposensibilisierung geplant |
| 2 | 19.03.61 | W | Rhinitis allergica Chronische Nephritis | Antihistaminika, Inhalativa, Glukokortikoide |
| 3 | 03.02.62 | m | Rhinitis allergica | Antihistaminika, Hyposensibilisierung geplant |
| 4 | 23.03.44 | m | Rhinitis allergica, | Antihistaminika, Inhalativa, Glukokortikoide |
| 5 | 20.11.62 | m | Rhinitis allergica, Chronische Pankreatitis | keine, Hyposensibiliserung geplant |
| 6 | 06.06.20 | W | Rhinitis allergica, Arterielle Hypertonie, | Ramipril 10, Beloc Zok 95, Metformin 1000 1/2-0-1/2 |
| | | | Hyperlipidämie, Diabetes mellitus | Antihistaminika |
| 7 | 06.06.41 | m | Rhinitis allergica Prostatakarzinom, | Antihistaminika, Alpha-1-Blocker |
| | | | Strahlenirritation | |
| 8 | 15.07.59 | W | Rhinitis allergica | Antihistaminika |
| 9 | 14.07.49 | W | Rhinitis allergica, Z.n. Mammakarzinom | Tamoxifen |
| 10 | 15.03.67 | m | Rhinitis allergica | Keine, Z.n. Akkupunktur |
| 11 | 13.03.57 | m | Rhinitis allergica, Arterielle Hypertonie | Ramipril 5 mg 1-0-0 |
| 12 | 18.08.83 | W | Rhinitis allergica | keine |
| 13 | 27.02.73 | m | Rhinitis allergica, Epilepsie | Valproat Dauermedikation nach Spiegel |
| 14 | 15.06.83 | m | Rhinitis allergica | keine |
| 15 | 26.01.50 | W | Rhinitis allergica, Arterielle Hypertonie, | Candesartan 8 mg 1-0-0, Beloc Zok mite 1/2-0-1/2, Plavix 75 1-0-0, |
| | | | КНК | Simvastatin 20 0-0-0-1 |
| 16 | 29.12.77 | m | Rhinitis allergica, Eisenmangelanämie | Ferrosanol duodenalis 1-0-1 |
| 17 | 28.04.74 | W | Rhinitis allergica | keine |
| 18 | 20.04.72 | m | Rhinitis allergica | keine |
| 19 | 09.06.66 | W | Rhinitis allergica, Hypothyreose | L-Thyroxin 50 1-0-0, Akkupunktur |
| 20 | 21.05.70 | W | Rhinitis allergica | Chromoglycinsäure Inhalationen und Augentropfen |
| 21 | 25.08.49 | W | Rhinitis allergica, Hepatitis C | keine |
| 22 | 21.05.61 | W | Rhinitis allergica | keine |
| 23 | 28.02.62 | m | Rhinitis allergica, Epilepsie | Antihistaminika |
| 24 | 20.03.76 | m | Rhinitis allergica | Antihistaminika |
| 25 | 28.09.74 | W | Rhinitis allergica | Antihistaminika |
| 26 | 24.04.73 | W | Rhinitis allergica | Antihistaminika |
| 27 | 14.04.79 | W | Rhinitis allergica, Anorexia nervosa | keine |
| 28 | 14.07.62 | m | Rhinitis allergica | keine |
| 29 | 10.07.51 | m | Rhinitis allergica, Glaukom, Zustand nach | Augendrucksenkende Augentropfen |
| | | | Cholezystektomie | |
| 30 | 21.03.75 | m | Rhinitis allergica | Chromoglycinsäure Inhalationen und Augentropfen |
| 31 | 09.08.69 | W | Rhinitis allergica | keine |
| 32 | 19.08.63 | W | Rhinitis allergica | Antihistaminika |
| 33 | 05.03.76 | m | Rhinitis allergica | Antihistaminika |

| Entität / Nr. | Geburts- datum | Geschlecht | Diagnose | Medikation |
|--------------------|-------------------|------------|---|---|
| 34 | 09.01.69 | W | Rhinitis allergica | Inhalative (Salbutamol) |
| 35 | 08.12.74 | W | Rhinitis allergica | keine |
| 36 | 10.01.63 | m | Rhinitis allergica, Hypothyreose | Antihistaminika, L-Thyroxin 25 1/2-0-0 |
| 37 | 15.01.76 | m | Rhinitis allergica | keine |
| 38 | 18.01.66 | W | Rhinitis allergica | Inahaltiva (Salbutamol) |
| 39 | 26.08.54 | m | Rhinitis allergica | keine |
| 40 | 30.08.71 | m | Rhinitis allergica | Antihistaminika |
| 41 | 04.12.47 | W | Rhinitis allergica, Arterielle Hypertonie | Antihistaminika, Ramipril 5 mg 1-0-0 |
| 42 | 25.12.43 | m | Rhinitis allergica, Onychomykose | Antihistaminika, topische Therapie |
| 43 | 23.11.59 | m | Rhinitis allergica, Vitiligo | topische Therapie |
| 44 | 25.03.73 | m | Rhinitis allergica, Migräne | Bedarfsmedikation bei Migräne, aktuell keine |
| 45 | 03.10.61 | W | Rhinitis allergica | keine |
| 46 | 25.10.76 | W | Rhinitis allergica | keine |
| Asthma bronchiale: | | | | |
| (Asthma) | | | | |
| 20 Probanden | | | | |
| 1 | 01.10.73 | m | Asthma bronchiale | Glukokortikoide systemisch, Inhalativ Atrovent/Salbutamol |
| 2 | 06.06.51 | W | Asthma bronchiale | Salbutamol-Spray bei Bedarf, topische Therapie mit Antimykotika |
| | | | Intertrigo bei Adipositas per magna | |
| 3 | 17.11.41 | m | Asthma bronchiale | Inhalativa bei Bedarf: Atrovent/Salbutamol |
| | | | Zustand nach Cholezystektomie, | |
| | | | Hepatitis C | |
| 4 | 05.07.76 | m | Asthma bronchiale | Keine Dauer-, nur Bedarfsmedikation mit kurzwirksamen ß2- |
| | | | | Sympathomimetika, Diagnostik |
| 5 | 07.07.74 | W | Asthma bronchiale | Keine Dauer-, nur Bedarfsmedikation mit kurzwirksamen ß2- |
| | | | | Sympathomimetika, Diagnostik |
| 6 | 12.07.55 | m | Asthma bronchiale, | Keine Dauer-, nur Bedarfsmedikation mit kurzwirksamen ß2- |
| | | | Arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus | Sympathomimetika, Metformin 500 1/2 -0-1/2 |
| 7 | 13.03.43 | W | Asthma bronchiale, Vitiligo | Glukokortikoide inhalativ, Atrovent/Salbutamol inhalativ |
| 8 | 17.05.68 | m | Asthma bronchiale | Glukokortikoide inhalativ, Atrovent/Salbutamol inhalativ |
| 9 | 08.10.77 | W | Asthma bronchiale, | Salbutamol-Spray bei Bedarf |
| | | | Persistierendes Foramen ovale | |
| 10 | 19.07.56 | m | Asthma bronchiale | Glukokortikoide inhalativ, |
| | | | Arterielle Hypertonie | Atrovent/Salbutamol inhalativ, Candesartan 8 mg 1-0-0 |
| 11 | 07.06.79 | m | Asthma bronchiale | Salbutamol-Spray bei Bedarf |
| 12 | 13.11.68 | m | Asthma bronchiale, Z.n. Cholezystektomie | Glukokortikoide inhalativ, |
| | | | Adipositas per magna | Atrovent/Salbutamol inhalativ |

| Entität / Nr. | Geburts- datum | Geschlecht | Diagnose | Medikation |
|-------------------|-------------------|------------|--|--|
| 13 | 26.08.72 | W | Asthma bronchiale | Salbutamol-Spray bei Bedarf |
| 14 | 29.07.75 | W | Asthma bronchiale, Epilepsie | Salbutamol-Spray bei Bedarf |
| 15 | 30.09.76 | m | Asthma bronchiale | Glukokortikoide inhalativ, Atrovent/Salbutamol inhalativ |
| 16 | 22.07.64 | m | Asthma bronchiale | Keine, Diagnostik laufend |
| 17 | 14.06.79 | W | Asthma bronchiale | Keine |
| 18 | 28.02.50 | m | Asthma bronchiale, | Salbutamol-Spray bei Bedarf, |
| | | | Arterielle Hypertonie, IG-A Nephropathie | Ramipril 5 mg 1-0-0, Metotrexat, Folsäure |
| 19 | 13.11.78 | W | Asthma bronchiale | Keine Dauer-, nur Bedarfsmedikation mit kurzwirksamen ß2- |
| | | | | Sympathomimetika |
| 20 | 15.01.77 | m | Asthma bronchiale | keine |
| Atopisches Ekzem: | | | | |
| (Atopekzem) | | | | |
| 15 Probanden | | | | |
| 1 | 27.07.76 | m | Atopisches Ekzem | Topische Therapie mit Immunmodulator (Tacrolimus) |
| 2 | 16.02.79 | W | Atopisches Ekzem | Balneotherapie, Basistherapie |
| 3 | 30.01.80 | m | Atopisches Ekzem | Kortikoidhaltige Salbe topisch, Balneotherapie, Basistherapie |
| 4 | 23.11.69 | m | Atopisches Ekzem | Balneotherapie und Basistherapie, Antihistaminika, |
| | | | | Psychologische Begleitbehandlung |
| 5 | 04.05.78 | m | Atopisches Ekzem | Topische Therapie der Hände, Gelenkbeugen mit rückfettender |
| | | | | Hautpflege/Urea |
| 6 | 16.10.77 | W | Atopisches Ekzem | Balneotherapieund Basistherapie, Antihistaminika |
| 7 | 03.08.79 | m | Atopisches Ekzem mit Superinfektion | Kortikoide systemisch, Balneotherapie, antiseptische Therapie |
| 8 | 15.06.80 | W | Atopisches Ekzem | Immunmodulator oral, Anwendung rückfettender Externa |
| 9 | 17.09.68 | W | Atopisches Ekzem, Cutis sicca, | Verbandstherapie, Balneotherapie, Kortikoidhaltige |
| | | | Hufeisenniere | Salbenanwendung |
| 10 | 28.03.76 | m | Atopisches Ekzem | Topische Therapie der Hände, Gelenkbeugen mit rückfettender |
| | | | | Hautpflege/Urea |
| 11 | 09.11.71 | m | Atopisches Ekzem, Z.n. Appendektomie | Topische Therapie der Hände, Gelenkbeugen mit rückfettender |
| | | | | Hautpflege/ Urea |
| 12 | 12.02.79 | W | Atopisches Ekzem | Topische Therapie mit kortikoidhaltigen Externa |
| 13 | 08.09.66 | W | Atopisches Ekzem, | Balneotherapie und Basistherapie, Psychologische Begleitbehandlung |
| | | | Rezidivierende Harnwegsinfekte | |
| 14 | 26.01.59 | m | Atopisches Ekzem | Balneotherapie und Basistherapie, Immunmodulator Tacrolimus |
| | | | | topisch |
| 15 | 13.03.74 | m | Atopisches Ekzem | Balneotherapie und Basistherapie, Psychologische Begleitbehandlung |