

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

DISSERTATION

Immunmodulatorische Einflüsse von probiotischem *Lactobacillus acidophilus* auf die allergische Immunantwort von peripheren und nasalen B- und T-Zellen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Christin Wolfram
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Worm
 2. Priv.-Doz. Dr. med. H. Olze
 3. Prof. Dr. med. Th. Werfel

Datum der Promotion: 27.03.2009

1	Einleitung	1
1.1	Die allergische Rhinitis	1
1.1.1	Epidemiologie und Symptomatik	1
1.1.2	Diagnostik	1
1.1.3	Therapeutische Möglichkeiten.....	2
1.1.4	Immunologische Mechanismen.....	5
1.1.4.1	Frühe Phase der allergischen Immunantwort.....	5
1.1.4.2	Späte-Phase-Reaktion.....	5
1.1.4.3	Sensibilisierungsphase	6
1.1.4.4	Mechanismen der IgE-Regulation.....	7
1.2	Hygiene-Hypothese	9
1.3	Probiotika.....	11
1.3.1	Was sind Probiotika?.....	11
1.3.2	Anti-allergische Effekte durch Probiotika?.....	12
2	Zielsetzung.....	15
3	Material und Methoden	16
3.1	Materialien	16
3.1.1	Ansätze	16
3.2	Methoden.....	17
3.2.1	Patienten	17
3.2.2	PBMC-Aufreinigung.....	18
3.2.3	Gewinnung von Lymphozyten aus der Nasenschleimhaut.....	18
3.2.4	Stimulation der lymphozytären Zellen des peripheren Bluts und der Nasenschleimhaut.....	19
3.2.5	Durchflusszytometrie.....	20
3.2.6	IgE-Bestimmung im Serum	22
3.2.7	Immunhistochemie der Nasenschleimhaut.....	22
3.3	Statistik.....	23
4	Ergebnisse	24
4.1	Phänotyp der lymphozytären Zellen des peripheren Bluts und der Nasenschleimhaut	24
4.1.1	Verteilung der Lymphozyten in der Nasenschleimhaut	24
4.1.2	Basale Expression von Oberflächenmolekülen auf T-Lymphozyten	25
4.1.2.1	CD69-Expression.....	25

4.1.2.2	Expression von CD45RO und CD45RA.....	26
4.1.2.3	CLA-Expression	26
4.1.2.4	Expression von CD152	27
4.1.3	Basale Expression von Oberflächenmolekülen auf B-Lymphozyten	28
4.1.3.1	Expression von CD23	28
4.1.3.2	IgE-Expression.....	29
4.1.3.3	Expression kostimulatorischer Moleküle: CD80 und CD86	30
4.2	Einfluss von Lactobacillus acidophilus auf die Expression lymphozytärer Oberflächenmoleküle.....	30
4.2.1	Wirkung von Lactobacillus acidophilus auf T-Zellen.....	31
4.2.1.1	CD69-Expression.....	31
4.2.1.2	CD152-Expression.....	33
4.2.2	Wirkung von Lactobacillus acidophilus auf B-Zellen.....	35
4.2.2.1	CD23-Expression im peripheren Blut.....	35
4.2.2.2	Expression von CD80 und CD86 im peripheren Blut	36
4.2.2.3	Einfluss der Stimulationen auf die nasalen B-Zellen	37
4.3	Einfluss von Lactobacillus acidophilus auf die Funktion differenzierter peripherer T-Helferzellen	38
5	Diskussion.....	40
5.1	Phänotyp nasaler und peripherer Lymphozyten bei der allergischen Rhinitis	40
5.1.1	Differenzierung und Aktivierung der T-Zellen	41
5.1.2	Die Rolle von IgE.....	42
5.1.3	Die Bedeutung kostimulatorischer Moleküle	44
5.1.4	Die idiopathische Rhinitis als „lokalisierte“ Form der allergischen Rhinitis?	45
5.2	Einfluss von Lactobacillus acidophilus auf die Lymphozyten des peripheren Bluts und der Nasenschleimhaut von Allergikern und Nichtallergikern.....	48
5.2.1	Aktivierungszustand der T-Lymphozyten	49
5.2.2	TH1/TH2-Balance.....	49
5.2.3	CD23-Expression und mögliche Effekte auf die IgE-Regulation	52
5.2.4	Expression von kostimulatorischen Molekülen und Beeinflussung der T-B- Zell-Interaktionen.....	54
5.2.5	Lactobacillus acidophilus für die „Allergieprophylaxe“?.....	57
6	Zusammenfassung	62
7	Materialverzeichnis	64

8	Abkürzungsverzeichnis	67
9	Literaturverzeichnis	69
10	Erklärung an Eides Statt	81
11	Danksagung	82
12	Lebenslauf	83
13	Publikationen	84

1 Einleitung

1.1 Die allergische Rhinitis

1.1.1 Epidemiologie und Symptomatik

Die allergische Rhinitis (AR) ist eine Erkrankung aus dem atopischen Formenkreis, bei der es Immunglobulin E (IgE)-vermittelt nach Allergenkontakt zur Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp und zur allergischen Entzündung der Nasenschleimhaut kommt.

In den letzten 40 Jahren wurde ein Anstieg der Prävalenz der allergischen Rhinitis beobachtet^[1-3]. Derzeit ist sie mit einer Lebenszeitprävalenz von über 20% die häufigste Typ-1-allergische Erkrankung und durch eine hohe Komorbidität mit anderen Erkrankungen des atopischen Formenkreises wie dem Asthma bronchiale und der atopischen Dermatitis (AD) gekennzeichnet^[2-5].

Inhalationsallergene (Aeroallergene), die von Hausstaubmilben, Katzen- und Hundehaaren, Schimmelpilzsporen, Gräser-, Getreide- oder Baumpollen stammen, stellen die hauptsächlichen Allergene dar^[2,6]. In Abhängigkeit von der Allergenpräsenz können die Symptome intermittierend oder persistierend auftreten. Ursprünglich wurde die saisonale von der perennialen allergischen Rhinitis unterschieden. Die ARIA-Initiative („Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma“), die in Zusammenarbeit mit der Weltgesundheitsorganisation (WHO) entstand, hat eine neue Klassifizierung vorgeschlagen, die die Dauer der Symptomatik in den Vordergrund stellt^[7].

Die Symptome der allergischen Rhinitis sind Pruritus, wässrige Rhinorrhö, rezidivierendes Niesen und nasale Obstruktion^[3,8]. Oft ist die allergische Rhinitis mit einer Begleitkonjunktivitis assoziiert (allergische Rhinokonjunktivitis). Diese Symptomkonstellation resultiert aus dem Zusammenspiel von Mediatoren und neuralen, vaskulären und glandulären Strukturen.

1.1.2 Diagnostik

Die Diagnose der allergischen Rhinitis basiert auf einer charakteristischen Anamnese mit korrespondierenden Symptomen, der klinischen Untersuchung (Rhinoskopie, Nasenendoskopie) und dem Nachweis von spezifischem IgE in der Hauttestung oder im Serum.

Mithilfe der klinischen Untersuchung der Nase werden andere Ursachen der persistierenden Nasenatmungsbehinderung – wie Nasenpolypen, Septumdeviationen,

Muschelhyperplasien oder andere Raumforderungen – abgegrenzt. Bei der allergischen Rhinitis ist typischerweise die untere, teilweise auch die mittlere Nasenmuschel ödematös mit bläulich-livider Schleimhautverfärbung und schleimig-wässriger Sekretion. Die Hauttestungen stellen das wesentliche diagnostische Verfahren zum Nachweis IgE-vermittelter Sensibilisierungen dar. Diagnostischer Standard ist der Prick-Test, der in Einzelfällen um den Intrakutantest ergänzt werden kann.

Der In-vitro-Nachweis spezifischer IgE-Antikörper (AK) bietet neben der Hauttestung keine größere diagnostische Sicherheit, wird jedoch vor allem dann eingesetzt, wenn eine Hauttestung nicht möglich ist (Hauterkrankung des Testareals, Einnahme interferierender Medikamente, Säuglinge, Kleinkinder).

Bei unklarer klinischer Relevanz kann ein nasaler Provokationstest mit Allergenen durchgeführt werden^[5]. Er dient insbesondere bei der persistierenden Rhinitis dazu, Patienten mit einer klinisch aktuellen Sensibilisierung (Allergie) von Patienten zu trennen, die zwar eine Sensibilisierung, aber unter natürlichen Expositionsbedingungen keine Symptomatik aufweisen (klinisch stumme Sensibilisierung). Beim nasalen Provokationstest wird das vermutete Allergen auf die Nasenschleimhaut gebracht und die resultierende klinische Sofortreaktion dokumentiert (anteriore Rhinomanometrie, Niesreiz, Sekretion, Fernsymptome).

1.1.3 Therapeutische Möglichkeiten

Neben Karenzmaßnahmen, die je nach Sensibilisierung oft nicht vollständig realisierbar sind, steht die Arzneimitteltherapie zur Behandlung der allergischen Rhinitis im Vordergrund^[3,5,6].

Mittel der ersten Wahl bei leichten Formen der allergischen Rhinitis sind orale Antihistaminika, die die inflammatorischen Effekte von Histamin durch kompetitive Hemmung der H₁-Rezeptoren antagonisieren^[3]. Vorwiegend werden Antihistaminika der zweiten und dritten Generation eingesetzt, die bei guter Wirksamkeit ein geringeres Nebenwirkungspotenzial als die erste Generation aufweisen^[2,3,6]. Bei der nasalen Obstruktion sind sie weniger effektiv. Doch werden auch für einige neuere Antihistaminika wie beispielsweise Fexofenadin antientzündliche und schleimhautabschwellende Wirkungen beschrieben^[3]. Topische Antihistaminika wie Azelastin sind alternativ bei der intermittierenden allergischen Rhinitis anwendbar^[6].

Topische Glukokortikosteroide sind neben den oralen Antihistaminika Mittel der ersten Wahl bei der allergischen Rhinitis. Sie gelten als die effektivsten Arzneisubstanzen für

die Therapie der allergischen Rhinitis und werden deshalb bevorzugt bei den mittelschweren und schweren Formen angewendet. Bei regelmäßigem Gebrauch reduzieren sie alle nasalen Symptome einschließlich der nasalen Obstruktion und wirken antientzündlich^[2]. Nachteilig sind die bei rund 5% der Patienten auftretenden lokalen Nebenwirkungen wie Nasentrockenheit und Epistaxis. Derzeit gängige Präparate können auf Langzeitbasis ohne Gefahr der Schleimhautatrophie angewendet werden^[2]. Das Risiko systemischer Nebenwirkungen wird als sehr gering eingeschätzt. Die systemische Glukokortikosteroidgabe ist aufgrund des breiten Nebenwirkungsprofils schwer beherrschbaren Fällen vorbehalten^[2,6].

Der genaue Wirkmechanismus der Cromone (Cromoglycinsäure, Nedocromil) ist nicht bekannt, steht aber in Zusammenhang mit Zellwandkomponenten der Mastzellen (Mastzellstabilisatoren) und/oder intrazellulären Prozessen nach Allergen-IgE-Bindung^[2]. Cromone sind weniger effektiv als Antihistaminika oder Kortikosteroide, müssen regelmäßig (2-4 mal täglich) topisch appliziert werden und mit der Anwendung sollte einige Wochen vor Allergenkontakt begonnen werden^[2,6]. Ihr Sicherheitsprofil ist ausgezeichnet.

In Kombinationspräparaten aber auch als Einzelpräparat können Dekongestiva wie Pseudoephedrin, Phenylephrin oder Oxymetazolin eine abschwellende Wirkung erzielen^[2,3,6]. Als Sympathomimetika wirken sie über adrenerge Rezeptoren vasokonstriktiv^[2]. Ihre Langzeitanwendung wird aufgrund von Tachyphylaxie und Rebound-Effekten, die schließlich zur Rhinitis medicamentosa führen können, nicht empfohlen^[2,3]. Damit ist die Indikation für die topische Anwendung allenfalls auf die initiale, kurzzeitige Gabe und additiv zur Therapie mit anderen Stoffgruppen beschränkt. Orale Vasokonstriktoren haben einen schwächeren antiobstruktiven Effekt bei höherem Nebenwirkungspotenzial, verursachen jedoch keine Rebound-Vasodilatation^[2,6].

In den letzten Jahren wurden weitere Therapieansätze verfolgt, die jedoch noch keine zufriedenstellende abschließende Datenlage ergeben haben. So wirken Leukotrienrezeptor-Antagonisten antiinflammatorisch, da sie wesentliche Mediatoren der allergischen Entzündung, die Leukotriene, inhibieren. Bisher sind sie als Einzelpräparat nicht ausreichend effektiv und in Kombination mit einem Antihistaminikum so wirksam wie die Monotherapie mit einem nasalen Steroid^[2].

Mit intranasal applizierten Parasympatholytika wie Ipratropiumbromid kann die wässrige Rhinorrhö kontrolliert werden^[2,6]. Aufgrund anticholinergischer Effekte kann es zu

Nebenwirkungen wie Nasen- und Mundtrockenheit, lokaler Irritation und Brennen sowie Kopfschmerzen kommen.

Für den monoklonalen IgE-AK Omalizumab wurden verbessernde Effekte auf die Symptomatik der allergischen Rhinitis gezeigt^[6]. Jedoch sind noch weitere Studien notwendig, um die Wirkung von anti-IgE mit anderen Therapien unter Berücksichtigung der Kosten zu vergleichen.

Die allergenspezifische Immuntherapie (SIT) ist neben der Allergenkenz die einzige kausale Therapie der allergischen Rhinitis und sollte möglichst frühzeitig begonnen werden, da so das Risiko für späteres Asthma bronchiale reduziert und die Entwicklung neuer Sensibilisierungen verhindert werden kann^[9]. Geeignet ist die SIT für mono- oder oligosensibilisierte Patienten und wird bislang hauptsächlich als subkutane Injektionsbehandlung durchgeführt (SCIT = spezifische subkutane Immuntherapie). Die Wirksamkeit ist für Baum-, Gräser- und Parietariapollen, Katzen- und Hundeallergene, *Alternaria* und Hausstaubmilben belegt^[2,9]. Eine Alternative stellt die spezifische sublinguale Immuntherapie (SLIT) dar, die die Symptomatik einer milden allergischen Rhinitis bei Sensibilisierung auf Hausstaubmilben, Gräserpollen und Parietaria verbessern kann^[2]. Es gibt verschiedene Applikationsschemata, beispielsweise die präseasonale Langzeit- und Kurzzeittherapie sowie die perenniale Therapie. Bei Therapieansprechen werden mindestens 3 Jahre Behandlungsdauer empfohlen.

Basierend auf der gezielten Beeinflussung des gestörten Th1/Th2-Gleichgewichts, modifiziert die spezifische Immuntherapie den zugrunde liegenden Krankheitsprozess. Sie führt zur Abnahme der Schleimhautinfiltration mit *cluster of differentiation 4* (CD4)+ T-Lymphozyten und aktivierten Eosinophilen sowie zur Zunahme von Interferon γ (IFN γ)+ Zellen^[10]. Letzteres impliziert einen Mechanismus, der auf einem protektiven lokalen Anstieg von Th1-Zellen beruht.

Eine chirurgische Intervention kann bei therapieresistenter nasaler Obstruktion durch Hypertrophie der unteren oder mittleren Muscheln indiziert sein; aber auch beim Vorliegen von Folgeerkrankungen wie z.B. einer chronischen Sinusitis oder von anatomischen Behinderungen (Septumdeviation), die den Effekt einer Muschelhypertrophie verstärken. Auch wenn die chirurgische Therapie der Muschelhypertrophie die allergische Inflammation nicht beeinflussen kann, so hat sie doch deutliche und persistierende Effekte auf alle Symptome einer perennialen

allergischen Rhinitis. Daher sind chirurgische Maßnahmen bei Versagen der Arzneimitteltherapie oder klinisch relevanten anatomischen Beeinträchtigungen indiziert.

1.1.4 Immunologische Mechanismen

1.1.4.1 Frühe Phase der allergischen Immunantwort

Die allergische Rhinitis wird als Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp verstanden, die mit der Verstärkung von Th2-Immunantworten und der Produktion von spezifischem IgE assoziiert ist^[6,8]. Die entscheidenden Effektorzellen in der frühen Phase der allergischen Immunantwort sind die Mastzellen. Entsprechend ihrer Lokalisation werden Bindegewebsmastzellen (*connective tissue mast cells*) mit Chymase- und Tryptase-Produktion und mukosale Mastzellen (*mucosal mast cells*) mit vorwiegender Tryptaseaktivität unterschieden^[8,11]. Erstere repräsentieren 85% der Interleukin 4 (IL-4)+ Mastzellen in der Nasenschleimhaut, letztere 15%^[8]. Es sind hauptsächlich die mukosalen Mastzellen, die bei der allergischen Rhinitis unter dem Einfluss von Th2-Zytokinen proliferieren und selbst auch IL-5 und IL-6 synthetisieren^[8]. Mastzellen binden über den hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI zirkulierendes allergenspezifisches IgE auf ihrer Membranoberfläche^[12]. Die Kreuzvernetzung zweier membrangebundener IgE (mIgE)-Moleküle durch das entsprechende Allergen mündet in einer Mastzell-Degranulation mit Freisetzung von Mediatoren wie Histamin, Tryptase und IL-4^[13,14]. Die Effektorphase der allergischen Soforttypreaktion beginnt. Schnell werden Leukotriene (LTC₄, LTD₄, LTE₄) und Prostaglandin D₂ (PGD₂) *de novo* synthetisiert^[6]. Histamin stimuliert über H₁-Rezeptoren sensorische Nerven und verursacht somit Niesen und Juckreiz^[2,6]. Es kommt über Vasodilatation, Plasmaexsudation und Ödembildung zur nasalen Obstruktion sowie durch Stimulation der Drüsen zur Rhinorrhö^[2,8]. Die freigesetzten Leukotriene fördern diese Prozesse und können zusätzlich eine Bronchokonstriktion vermitteln.

1.1.4.2 Späte-Phase-Reaktion

Die ausgeschütteten Botenstoffe setzen eine Kaskade in Gang, die in den nachfolgenden 4-8 Stunden zu einer Entzündungsreaktion führt, die als späte Phase bezeichnet wird^[6]. Hauptsymptom ist die Schwellung der Nasenschleimhaut, resultierend aus der Histamin-getriggerten Heraufregulation von Adhäsionsmolekülen wie *vascular cell adhesion molecule* (VCAM) und E-Selektin auf postkapillären

endothelialen Zellen mit darauffolgender Adhärenz zirkulierender Leukozyten^[2,6,8]. Zusammen mit Chemokinen wie IL-3, IL-5, Eotaxin und *regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted* (RANTES) wird die Infiltration der Lamina propria mit eosinophilen Granulozyten (Eosinophile), neutrophilen Granulozyten (Neutrophile), basophilen Granulozyten (Basophile), Mastzellen, CD4+ Th2-Lymphozyten und Makrophagen gefördert^[6,8,15]. Die rekrutierten Zellen werden ebenfalls aktiviert und fördern durch Freisetzung weiterer proinflammatorischer Mediatoren die allergische Inflammation im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus^[2,6,8]. Darüber kommt es insbesondere zur Anreicherung von Eosinophilen in der Nasenschleimhaut^[16].

1.1.4.3 Sensibilisierungsphase

Nach Inhalation lagern sich die Allergene auf der Nasenschleimhaut ab und diffundieren nach Verdünnung durch das Nasensekret ins Gewebe^[6,8]. Antigenpräsentierende Zellen (APZs) wie dendritische Zellen, Langerhans-Zellen und Makrophagen nehmen das Allergen auf, prozessieren es durch proteolytische Spaltung und präsentieren die Bruchstücke im *major histocompatibility complex II* (MHC-II)-Molekül an naive CD4+ Th0-Lymphozyten^[6,17]. Die aus dem Thymus stammenden T-Zellen erkennen über ihren T-Zell-Rezeptor (TZR) das prozessierte Allergen^[8]. Man vermutet, dass diese Th0-Zellen Oberflächenmarker exprimieren, die sie zum *homing* in Blutgefäße der respiratorischen Schleimhaut befähigen. Zusätzliche Stimuli durch kostimulatorische Moleküle als auch Zytokine triggern die Differenzierung zu Th2-Lymphozyten^[8]. IL-4 scheint das wichtigste Zytokin für die Th2-Differenzierung zu sein und wird durch natürliche 1.1-Killer (NK1.1)-Zellen, Basophile, Eosinophile und Mastzellen freigesetzt, getriggert durch die Produktion von IL-6 durch APZs^[18,19]. Des Weiteren wird IL-12 herunterreguliert, was zur Hemmung der Ausbildung von Th1-Zellen führt. Die stimulierten Th2-Zellen setzen neben IL-4 auch Zytokine wie IL-3, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 und *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) frei^[6,8]. Dies führt zur Kaskade von Ereignissen, die die lokale und systemische IgE-Produktion durch Plasmazellen sowie die Chemotaxis und Rekrutierung inflammatorischer Zellen fördern, und die Entstehung von Th1-Immunantworten hemmen^[6,8].

IgM-tragende B-Zellen, die das entsprechende Allergen erkennen, vollführen durch somatische Rekombination einen AK-Klassenwechsel zu IgE^[8]. Dazu sind zwei Signale nötig^[20,21]. Das erste Signal wird im Wesentlichen durch IL-4 oder IL-13 geliefert, was

durch Transkriptions- und Spleißvorgänge zur Entstehung des ϵ -Keimbahn-Transkripts führt. Das zweite Signal, das zur Entstehung des reifen RNA-Transkripts führt, kommt durch Kreuzvernetzung von CD40 auf den aktivierten B-Zellen mit CD40-Ligand (CD40L) auf den aktivierten T-Zellen zustande. Diese allergenspezifisch geprägten IgE-produzierenden B-Zellen können dann bei erneutem Allergenkontakt unter dem Einfluss kostimulatorischer Signale, die im Wesentlichen von den Th2-Zellen geliefert werden, schnell proliferieren und IgE freisetzen.

Während ihres Differenzierungsprozesses erwerben die T-Helferzellen die Fähigkeit, bei erneutem Allergenkontakt schnell und spezifisch zu reagieren^[17]. Diese sogenannten *T-memory*- bzw. T-Gedächtniszellen sind durch die Expression von CD45RO gekennzeichnet^[22]. CD45RO ist eine Isoform des *leucocyte common antigen*, CD45. Die andere Isoform CD45RA wird von naiven T-Helferzellen exprimiert^[22].

1.1.4.4 Mechanismen der IgE-Regulation

In Abhängigkeit von den gelieferten Stimuli differenzieren naive Th0-Zellen entweder in Th1- oder Th2-Zellen aus. Sie unterscheiden sich am meisten durch ihr Zytokinprofil. Während Th1-Zellen vor allem IL-2, IFN γ und *tumor necrosis factor α* (TNF α) sezernieren und darüber wichtige Funktionen bei der zellvermittelten Immunität gegenüber intrazellulären Erregern innehaben, produzieren Th2-Zellen im Wesentlichen IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13^[21]. Th2-Zellen sind verantwortlich für AK-vermittelte humorale Immunantworten. Zu den wichtigsten Effektorfunktionen der Th2-Zellen gehören die Regulation der IgE-Produktion und die Unterhaltung von IgE-abhängigen Immunreaktionen, die durch Eosinophile und Mastzellen als weitere Effektorzellen vermittelt werden^[18].

Th2-Zellen initiieren den AK-Klassenwechsel der B-Zellen, woraufhin diese allergenspezifisches IgE bilden. Wie oben ausgeführt, sind zwei Signale für die B-Zellstimulation erforderlich, wobei für die IgE-Produktion IL-4 die zentrale Rolle zu spielen scheint^[21]. Zytokine wie IL-5 und IL-6 führen zum Anstieg der IgE-Synthese, während IFN γ inhibitorische Einflüsse hat. Allergenspezifisch geprägte B-Zellen werden bei erneutem Allergenkontakt über IL-4 und IL-13 sowie die entsprechenden kostimulatorischen Signale, die von den T-Zellen geliefert werden, zur Proliferation und IgE-Produktion stimuliert.

Für T-B-Zell-Interaktionen spielt nicht nur die CD40-CD40L-Interaktion eine Rolle, sondern auch andere kostimulatorische Moleküle wie das CD28/CD152-CD80/CD86-

System sind von Bedeutung. So wird nach Bindung von CD40 an CD40L die CD80-Expression auf B-Lymphozyten heraufreguliert. CD80 kann durch Interaktion mit CD28 stimulatorische Signale an die T-Zellen liefern, die zur Zytokinsynthese und T-Zellproliferation führen. So werden von den aktivierten Th2-Zellen IL-4 und IL-13 ausgeschüttet, was die B-Zellen weiter zur Proliferation, Klassenwechsel und Differenzierung in IgE-produzierende Zellen stimuliert. Daneben ist das CD28/CD152-CD80/CD86-System auch im Rahmen der Th1/Th2-Differenzierung von Bedeutung. So scheint die Entstehung von Th2-Zellen hauptsächlich auf der Interaktion von CD86 mit CD28 zu beruhen, denn CD86 wird selektiv und allergenspezifisch auf B-Zellen des peripheren Bluts von atopischen Individuen heraufreguliert^[23,24]. Auch wurde die Abhängigkeit der allergenspezifischen T-Zell-Aktivierung von der Kostimulation via CD86-CD28 beschrieben^[25]. Dagegen scheint CD80 die Zytokinproduktion nach Th1 auszurichten^[26].

IgE kann ungebunden vorliegen^[13,21]. Die meisten IgE-Moleküle liegen jedoch zellgebunden über die Rezeptoren FcεRI oder FcεRII vor. Ersterer ist der *high-affinity*-Rezeptor für IgE und wird exprimiert von Mastzellen, Basophilen, Eosinophilen, Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen, Langerhans-Zellen und Thrombozyten^[21]. Nach Kreuzvernetzung durch Allergen werden präformierte Mediatoren wie Histamin, Leukotriene und IL-4 ausgeschüttet, was die Entzündungskaskade bei der allergischen Inflammation in Gang setzt und unterhält. FcεRI+ APZs scheinen wesentlich an der Allergenaufnahme und MHC-vermittelten Präsentation an T-Zellen beteiligt zu sein^[13,21]. FcεRII (CD23) ist der *low-affinity*-Rezeptor für IgE und wird nach Aktivierung durch IL-4 von B-Zellen, Monozyten und Langerhans-Zellen exprimiert^[13,14,27]. Die genaue Rolle von CD23 bei der IgE-Regulation ist noch nicht endgültig geklärt, jedoch wird CD23 eine zentrale Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Allergien und bei der Induktion der IgE-Synthese zugeschrieben^[13,27,28]. So wird CD23 durch IgE selbst aber auch durch IL-4 heraufreguliert, während IFNγ antagonistische Effekte hat^[27]. Auch hat die Bindung von IgE an CD23 eine negative Rückkopplung auf die IgE-Synthese zur Folge. Dies geschieht über die verminderte autokatalytische Abspaltung des löslichen Fragments *soluble* CD23 (sCD23). Wird jedoch die Autokatalyse des labilen Proteins CD23 nicht gehemmt, fördern die abgespaltenen sCD23-Fragmente die kontinuierliche IgE-Produktion über zwei Mechanismen: 1) sCD23 stimuliert direkt die IgE-Produktion über Interaktion mit CD21; 2) sCD23 kann ungebundenes IgE binden und damit die negative Rückkopplung, die durch mIgE getriggert wird, verhindern. Die erhöhte sCD23-

Abspaltung wird zusammen mit der Heraufregulation von CD23 auf B-Zellen und Monozyten bei allergischen Erkrankungen beobachtet. Man nimmt bei allergischen Individuen eine Dysregulation der CD23-Immunkfunktionen an, die mit der erhöhten IgE-Produktion in Zusammenhang steht^[27].

1.2 Hygiene-Hypothese

Die in den letzten Jahren beobachtete, steigende Inzidenz von Allergien und ihr fortdauernder Anstieg in industrialisierten Ländern wird hauptsächlich darauf zurückgeführt, dass mit zunehmender Industrialisierung die mikrobielle Exposition während der frühen Kindheit abnimmt^[11,29]. Diese sogenannte „Hygiene-Hypothese“^[30] erklärt die steigende Allergie-Inzidenz mit verbesserten hygienischen Bedingungen, die zu einer verringerten Vielfalt und einem reduzierten Ausmaß an natürlichen mikrobiellen Stimuli in der frühen Kindheit führen und somit eine eingeschränkte Aktivierung des mukosalen Immunsystems durch Bakterien(produkte) und ein Ungleichgewicht in der Entwicklung von T-Zell-Subklassen zur Folge haben^[11,31].

So weist das noch nicht vollständig entwickelte Immunsystem des Neugeborenen zunächst eine Th2-dominante Aktivität auf. Unter ausreichender Exposition gegenüber mikrobiellen Stimuli kommt es in der frühen Postnatalperiode zur Reifung des Immunsystems mit Ausbildung von Th1-Immunantworten und zur Reifung von APZs und regulatorischen T-Zellen, die für die T-Zell-Homöostase von Bedeutung sind^[11,29]. Für diesen Effekt wird hauptsächlich die intestinale Mikroflora verantwortlich gemacht, da die den Darm besiedelnden Mikroorganismen die wesentlichen infektiösen Stimuli liefern, denen das Neugeborene kurz nach der Geburt ausgesetzt ist. Die Darmschleimhaut ist mit einem gut entwickelten und hoch spezialisierten Immunsystem ausgestattet, welches als *gut-associated lymphoid tissues* (GALT) bezeichnet wird^[11]. Es befindet sich in der Lamina propria^[32] und steht nach Kolonisierung des Darms im ständigen Dialog mit der kommensalen Mikroflora^[29]. Dabei nimmt das GALT nicht nur immunregulatorische Aufgaben wahr, sondern übernimmt auch wichtige Aufgaben bei der Aufrechterhaltung der Schleimhautbarriere, der Entstehung von oraler Toleranz gegenüber harmlosen Nahrungsbestandteilen und mikrobiellen Antigenen und der Abwehr pathogener Keime^[11].

Die Darmschleimhaut zeichnet sich im Besonderen gegenüber der systemischen Immunität auch dadurch aus, dass es mit dem GALT über ein hoch entwickeltes

angeborenes Immunsystem verfügt. Das angeborene Immunsystem wird durch dendritische Zellen, Granulozyten, Makrophagen und NK-Zellen realisiert, die nach Kontakt mit pathogenen Strukturen eine schnelle unspezifische Abwehrreaktion mit Produktion von Zytokinen und antimikrobiellen Molekülen induzieren. Eine Besonderheit des angeborenen Immunsystems ist die Fähigkeit, Strukturen potenziell gefährlicher Mikroorganismen, die sogenannten *pathogen-specific molecular patterns* (PAMPs), über *pattern recognition receptors* (PRRs) zu erkennen^[11]. PAMPs sind Strukturen, die im Wirt nicht vorkommen, beispielsweise bakterielle Zellwandstrukturen wie bestimmte Peptidoglykane oder Lipopolysaccharid (LPS) sowie Cytidin-Phosphat-Guanosin-Dinukleotid-reiche (CpG-reiche) DNA. Zu den PRRs gehören neben CD14 auch die *Toll-like-Rezeptoren* (TLRs)^[11]. Die Bindung von PAMPs an TLRs aktiviert Transkriptionsfaktoren wie *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) in APZs, woraufhin proinflammatorische Zytokine wie TNF α , IL-12 und IFN γ synthetisiert werden. Über die zusätzliche Heraufregulation kostimulatorischer Moleküle wird nachfolgend die Interaktion mit dem erworbenen Immunsystem ermöglicht^[33]. So wird durch aktivierte reife dendritische Zellen die Entstehung von Th1-Zellen aus naiven T-Lymphozyten gefördert^[11,33].

Da PRRs keine Unterscheidung zwischen pathogenen und kommensalen Keimen treffen können, scheint das angeborene Immunsystem nicht nur durch Infektionen mit pathogenen Erregern modifiziert zu werden, sondern auch durch die ständige Auseinandersetzung mit der intestinalen Mikroflora. Vor diesem Hintergrund ist in den letzten Jahren das Interesse daran gestiegen, die Zusammensetzung der Darmflora näher zu untersuchen. So wurde gezeigt, dass sich die Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora nicht nur zwischen gesunden und allergischen Kindern unterscheidet, sondern auch zwischen Ländern mit hoher und niedriger Allergieprävalenz^[34]. So wurde in der Darmflora von estnischen Kindern eine stärkere Besiedlung durch Lactobazillen (LC) gefunden als bei schwedischen Kindern, die gleichzeitig häufiger Allergien entwickeln^[35]. Zudem wurde gezeigt, dass der Darm schwedischer allergischer Kinder, verglichen mit nichtallergischen Kindern, in den ersten Lebensjahren seltener mit Lactobazillen, Bifidobakterien und Enterokokken besiedelt ist, jedoch häufiger mit Clostridien und Staphylokokken^[36,37]. Solche Beobachtungen richteten in der Vergangenheit das Interesse auf die Verwendung von probiotischen Bakterien, um durch sie allergische Immunantworten zu verhindern bzw. zu hemmen.

1.3 Probiotika

1.3.1 Was sind Probiotika?

Probiotika (*griechisch*: für das Leben) sind definiert als oral applizierbare, lebende mikrobielle, apathogene Kulturen, die die Entwicklung und Stabilität der Mikroflora positiv beeinflussen, die Kolonisierung durch pathogene Keime hemmen, die Schleimhautbarriere durch trophische Effekte auf das Darmepithel unterstützen und das Immunsystem stimulieren^[11]. Diese Überlegungen wurden erstmals vor ungefähr 100 Jahren von Elie Metchnikoff^[38] angestellt, der nützliche Eigenschaften von Milchsäurebakterien postulierte und die Einnahme in größeren Mengen forderte. Im Laufe des Jahrhunderts wurde das Konzept Metchnikoffs kontrovers diskutiert, bis in den letzten Jahrzehnten tatsächlich für probiotische Stämme gesundheitsfördernde Effekte beschrieben wurden.

Die am häufigsten verwendeten Probiotika sind Lactobazillen- und Bifidobakterien-Stämme, aber auch Enterokokken und non-pathogene *E. coli* (z.B. Stamm Nissle 1917) werden ihnen zugeordnet^[11,39]. Neben ihrer Verwendung in Lebensmitteln werden sie meist als Reinkulturen oder als definiertes Gemisch verschiedener Bakterienstämme für medizinische Zwecke angeboten^[31]. Im menschlichen Organismus sind sie als apathogene Mikroorganismen wesentlicher Bestandteil der natürlichen Darmflora. So werden sie erfolgreich zur Stabilisierung der Darmflora bei infektiösen und Antibiotika-induzierten Diarrhöen, Obstipation, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und dem Reizdarmsyndrom eingesetzt; also bei intestinalen Erkrankungen, die mit einer gestörten intestinalen Permeabilität einhergehen. Für *L. rhamnosus* GG hatte man in Form von Joghurt sowie als gefriergetrocknetes Pulver in Kapseln gezeigt, dass die Symptome akuter Diarrhö bei Rotavirus-Infektion gemildert werden und die Dauer der Rotavirus-Ausscheidung reduziert wird^[40].

Lactobazillen, die zu den Milchsäurebakterien gehören, werden weit verbreitet in fermentierten Milchprodukten wie Joghurt oder Trinkzubereitungen eingesetzt^[41,42]. Als wichtige Vertreter der grampositiven Milchsäurebakterien mit probiotischer Anwendung sind *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* GG, *L. delbrueckii* subsp., *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum* und *Streptococcus thermophilus* zu nennen^[43,44]. Als Hauptbestandteil der vaginalen Mikroflora stellt insbesondere *Lactobacillus acidophilus* eine entscheidende Inokulationsquelle für das Kind während der Geburt dar^[41]. *Lactobacillus acidophilus* wird auch erfolgreich in der

Therapie infektiöser und entzündlicher Vaginalerkrankungen zur Wiederherstellung der natürlichen Mikroflora genutzt.

1.3.2 Anti-allergische Effekte durch Probiotika?

Neben der gesundheitsfördernden Wirkung werden den Probiotika vorteilhafte Effekte auf die Prävention und Therapie allergischer Erkrankungen zugeschrieben. Das Interesse an intestinalen Mikroorganismen basiert dabei hauptsächlich auf der Beobachtung, dass die Darmbakterien für die Entwicklung eines normalen Immunsystems und für die Entstehung oraler Toleranz essenziell sind und dass schon früh Unterschiede in der Darmbesiedlung bei Neugeborenen gesehen wurden, die nachfolgend Allergien entwickelten. Auf dieser Basis versuchte man, mit lebenden Darmbakterienstämmen die frühe Kolonisierung des Darms und nachfolgend die Reifung des Immunsystems und damit verbundene Mechanismen der allergischen Immunreaktionen zu beeinflussen. Erste Studien scheinen diesen Ansatz zu unterstützen.

So wurde in placebokontrollierten doppelblinden Studien gezeigt, dass die frühe Kolonisierung des Darms mit *L. rhamnosus GG* zur Verringerung der Atopieprävalenz prädisponierter finnischer Kinder in einem Nachbeobachtungszeitraum von 7 Jahren führte^[45-47] (Tabelle 1). Durch Verabreichung von *L. rhamnosus GG* an stillende Mütter wurde ebenfalls nach 2 Jahren eine Reduktion des Atopierisikos beobachtet, insbesondere bei den Kindern mit einer hohen IgE-Konzentration im Nabelschnurblut^[48].

Erstautor	Probiotikum	Verabreichung	Erkrankung	Ergebnisse
Kalliomäki [45-47]	<i>L. rhamnosus GG</i>	1 Monat präpartal (Schwangere) bis 6 Monate postnatal (Stillende oder Neugeborene)	AD	Verringerung der Häufigkeit nach 2, 4 und 7 Jahren
Rautava [48]	<i>L. rhamnosus GG</i>	1 Monat präpartal (Schwangere) bis 3 Monate postpartal (Stillende)	AD	Prävalenzverringerng in ersten 2 Lebensjahren; mehr TGFβ2 in Muttermilch
Lodinova- Zadnikova [49]	probiotischer <i>E. coli</i>	postnatale Gabe	Allergien	Prävalenzreduktion nach 10 und 20 Jahren; weniger rezidivierende Infekte nach 10 Jahren
Taylor [50]	<i>L. acidophilus</i>	Neugeborene über 6 Monate	AD	keine Risikoreduktion; höhere Darmkolonisierung

Tabelle 1. Klinische Studien mit probiotischen Bakterien zur Allergieprävention.

In diesen ersten Studien erhielten die werdenden Müttern bereits 4 Wochen präpartal die Lactobazillen^[45-48]. Auch reduzierte die postnatale Gabe probiotischer *E.-coli*-Stämme die Häufigkeit von Allergien und rezidivierenden Infekten nach 10 und 20 Jahren^[49]. Die meisten Studien bestätigen die Wirkung der probiotischen Bakterien im Rahmen der Allergieprävention. Jedoch gibt es Studien, die diese Effekte trotz erzielter Zunahme der Darmkolonisierung nicht nachweisen konnten^[50].

Interessant sind die vielfältigen randomisierten kontrollierten klinischen Studien an Kindern und Erwachsenen mit bereits manifesten atopischen Erkrankungen (Tabelle 2).

Erstautor	Probiotikum	Verabreichung	Erkrankung	Ergebnisse
Majamaa [51]	<i>L. rhamnosus</i> GG	1 Monat lang Neugeborene oder stillende Mütter	AD bei Kuhmilch- allergie	Verringerung der Krankheitsschwere (AD); Abnahme von fäkalem α 1- Antitrypsin und TNF α
Wheeler [52]	Joghurt * mit oder ohne <i>L. acidophilus</i>	Erwachsene 1 Monat lang	allergisches Asthma bronchiale	keine Symptomverbesserung; erhöhte Produktion von IFN γ in stimulierten PBMCs; Abnahme der Eosinophilen im Blut
Van de Water ^[53]	Joghurt *	Erwachsene 1 Jahr	allergische Erkrankungen	Verringerung allergischer Symptome
Isolauri [54]	<i>B. lactis</i> oder <i>L. rhamnosus</i> GG	Babys im 4. bis 6. Lebensmonat	AD	Symptomverbesserung und Änderung von Serumparametern
Helin [55]	<i>L. rhamnosus</i> GG	Teenager und junge Erwachsene 5,5 Monate lang	AR und Asthma bronchiale (Birke)	keine Symptomreduktion
Aldinucci [56]	Joghurtkulturen	Erwachsene 4 Monate lang	AR	Symptomverbesserung; erhöhte Produktion von IFN γ in stimulierten PBMCs
Rosenfeldt [57]	<i>L. rhamnosus</i> GG und <i>L. reuteri</i>	1-13 Jahre alte Kinder 6 Wochen	AD	Symptomverbesserung; Abnahme des eosinophilen kationischen Serumproteins
Kirjavainen [58]	<i>L. rhamnosus</i> GG	5,5 Monate alte Kinder für 7,5 Wochen	AD bei Kuhmilch- allergie	Symptomverbesserung (AD)
Wang [1]	<i>L. paracasei</i>	Kinder für 30 Tage	AR	subjektive Symptomverbesserung
Ishida [59]	<i>L. acidophilus</i>	Erwachsene über 8 Wochen	AR	Symptomreduktion

Tabelle 2. Klinische Studien mit probiotischen Bakterien zur Therapie von Allergien.

* bestehend aus *L. bulgaricus* und *S. thermophilus*.

Insbesondere für die atopische Dermatitis, aber auch für die allergische Rhinitis verweist die Datenlage zumeist auf die therapeutischen Effekte der probiotischen Milchsäurebakterien^[1,51,53,54,56,57,59]. Auffällig ist, dass Studien mit fehlendem Nachweis dieser anti-allergischen Wirkung meist mit erwachsenen Individuen durchgeführt wurden^[52,55]. Offenbar ist der Effekt der Allergiereduktion nur dann zu erzielen, wenn das Probiotikum in der Phase der Entwicklung der Darmflora und damit während der Prägung des Darmmukosa-assoziierten Immunsystems verabreicht wird.

Über welchen Mechanismus die probiotischen Bakterien ihre immunmodulatorische Wirkung entfalten, war zu Beginn der vorliegenden Arbeit nicht vollständig geklärt. Zur Klärung dieser Frage wurden die klinischen Studien bereits teilweise um die Bestimmung verschiedener Laborparameter sowie um experimentelle Untersuchungen ergänzt. So führten die oral applizierten Probiotika zur Reduktion von fäkalem, inflammatorisch wirkendem TNF α und α 1-Antitrypsin^[51], zur Erhöhung der IL-10-Serumkonzentration und der IL-10-Produktion in Mitogen-stimulierten *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs)^[60], zur Zunahme des Th1-Zytokins IFN γ ^[52,56] und Abnahme der Eosinophilen im Blut^[52] sowie zum Anstieg von *transforming growth factor* β ₂ (TGF β ₂) in der Muttermilch^[48]. Daneben verweisen diverse In-vitro-Untersuchungen auf die immunmodulatorische Wirkung der Probiotika wie die Induktion der Th1-Zytokine IFN γ ^[61,62], IL-12^[61-63], IL-10^[63] und IL-18^[61] in stimulierten PBMCs. In allergenstimulierten PBMCs wurde eine Hemmung der Th2-Zytokine IL-4 und IL-5 beobachtet^[64]. Neben diesen Hinweisen auf eine Beeinflussung der Th1/Th2-Balance durch Lactobazillen wurden auch Daten ermittelt, die eine Heraufregulation der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 auf humanen^[65] und murinen^[66] dendritischen Zellen und Makrophagen^[67] zeigen. Untersuchungen in Mausmodellen mit Ovalbumin-sensibilisierten Mäusen lassen Rückschlüsse auf eine Beeinflussung der IgE-Regulation zu, da es nach Fütterung mit Lactobazillen zur Hemmung der Serum-IgE-Produktion kam^[67-69].

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, am Beispiel der allergischen Rhinitis die allergenspezifische Immunantwort zu charakterisieren. Hierzu wurden residente T- und B-Lymphozyten aus der Nasenschleimhaut erwachsener Allergiker und Nichtallergiker isoliert und mittels direkter Ex-vivo-Analyse hinsichtlich ihres Aktivierungs- (CD69, CD152, CD80, CD86) und Differenzierungszustandes (CD45RO, CD45RA, CLA, CD23, mIgE) untersucht und mit dem Phänotyp der Lymphozyten des peripheren Bluts verglichen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die immunmodulatorischen Effekte von inaktiviertem probiotischem *Lactobacillus acidophilus* auf die isolierten peripheren und nasalen T- und B-Lymphozyten untersucht. In einem In-vitro-Versuchsaufbau wurde die Beeinflussung der allergeninduzierten Immunreaktion durch gleichzeitige mikrobielle Stimulation analysiert. Durch Bestimmung der Expression von Aktivierungsmarkern (CD69), Differenzierungsmarkern (CD23), kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD86, CD152) sowie der Zytokinproduktion von T-Helferzellen (IL-4, IFN γ) wurden die möglichen Auswirkungen von *Lactobacillus acidophilus* auf T-B-Zell-Interaktionen, die Th1/Th2-Balance und die IgE-Regulation im Rahmen allergenspezifischer Immunantworten untersucht. Die Stimulation der peripheren Lymphozyten sollte die möglichen systemischen Wirkungen der Lactobazillen, wie sie beispielsweise nach oraler Applikation auftreten können, simulieren. Um die potenzielle Anwendung von *Lactobacillus acidophilus* als Probiotikum mit anti-allergischer Kompetenz bewerten zu können, erfolgten hierzu ergänzende Stimulationen der isolierten Nasenschleimhaut-Lymphozyten.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Alle verwendeten Materialien sind im Materialverzeichnis (Kapitel 7) in tabellarischer Form aufgelistet (Tabelle 7-11).

Alle Chemikalien wurden wie vom Hersteller angegeben gelöst, verdünnt und gelagert. In Tabelle 7 sind alle verwendeten Reagenzien dargestellt. Tabelle 8 enthält die AK für die immunhistochemischen und durchflusszytometrischen Untersuchungen.

Die benötigten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Die Laborgeräte und anderen Hilfsmittel gibt Tabelle 10 wieder.

Die Substanzen für die Prick-Testung fasst Tabelle 11 zusammen.

3.1.1 Ansätze

Kulturmedium

- RPMI-Medium 1640 w 2,0 g/l NaHCO₃ w/o L-Glutamin
- 10% Fetal Calf Serum, 20 Minuten bei 60°C hitzeinaktiviert
- 2% L-Glutamin
- 1% Penicillin/Streptomycin

BSA-PBS

- Phosphate Buffered Saline (PBS) w/o Ca²⁺/Mg²⁺
- 0,5% Bovine Serum Albumine (BSA)

FACS-Puffer

- PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺
- 2% BSA
- 0,02% Natriumazid

Paraformaldehyd (PFA)

- PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺
- 1 bzw. 2% PFA

Lactobazillen

Die Lactobazillen (LC) wurden aus Paidoflor®-Kautabletten gewonnen, die traditionell als mild wirkendes Arzneimittel zur Unterstützung der Darmfunktion z.B. bei Darmträgheit und Diarrhö eingesetzt werden. Zur Vorbereitung einer Lactobazillen-Lösung wurde eine Tablette (entsprechend 20 mg Trockenpulver aus Lactobacillus acidophilus) unter sterilen Bedingungen in 20 ml Kulturmedium aufgenommen.

Entsprechend den Herstellerangaben (Schwankungsbreite von 10^9 - 10^{10} lebensfähigen Bakterien pro Gramm) ist davon auszugehen, dass die Lactobazillen in einer Konzentration von mindestens 1×10^6 Bakterien pro Milliliter vorliegen. Nachfolgend wurden die Aliquots bei -80°C kälteinaktiviert^[70,71].

3.2 Methoden

3.2.1 Patienten

Für die Untersuchungen wurden aus der Abteilung für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Bundeswehrkrankenhauses Berlin 41 Patienten rekrutiert, die aufgrund chronischer Nasenatembeschwerden eine Conchotomie und teilweise zusätzlich eine Septumplastik vornehmen ließen. Die Atembeschwerden resultierten aus einer nasalen Obstruktion entweder infolge anatomischer Veränderungen (Septumdeviation, posttraumatische Nasenskelettveränderungen) oder aufgrund einer Nasenmuschelhyperplasie, wie sie bei der perennalen oder saisonalen allergischen Rhinitis vorkommt. Jeder Patient gab sein schriftliches Einverständnis zur Studienteilnahme. Das Studienprotokoll wurde vorab von der Ethikkommission bewilligt.

Das Alter der 8 weiblichen und 33 männlichen Patienten lag zum Untersuchungszeitpunkt zwischen 19 und 71 Jahren (Durchschnittsalter: 29 Jahre). Die Zuordnung zur Gruppe der Allergiker (A) oder Nichtallergiker (NA) wurde anhand der Anamnese, des Haut-Pricktests und der Bestimmung von Gesamt- und spezifischem IgE im Serum getroffen. Alle allergischen Individuen ($n=16$) gaben saisonale rhinitische Beschwerden an, reagierten positiv im Prick-Test und hatten im Serum Gräser- ($n=14$) oder Birkenpollen-spezifische ($n=2$) IgE-AK (Abbildung 1). Die Patienten der Nichtallergiker-Gruppe ($n=25$) hatten einen negativen Hauttest für Hausstaubmilben, Katze, Pollen und *Alternaria* sowie fehlende Titer für spezifisches IgE.

Kein Patient erhielt in den letzten drei Tagen vor der Operation Antihistaminika bzw. 14 Tage präoperativ immunsuppressive Substanzen wie topische oder systemische Steroide. Patienten mit einer bekannten atopischen Dermatitis, einer Immuntherapie in der Vorgeschichte oder mit anderen schweren Erkrankungen wurden ausgeschlossen. Die Studie wurde außerhalb der Pollensaison durchgeführt, während der die Patienten keine Beschwerden hatten.

Pro Patient wurden 10 ml Blut für die serologischen Bestimmungen und 40 ml heparinisieretes Blut für die experimentellen Untersuchungen gewonnen sowie die unteren Nasenmuscheln für die Stimulationsversuche asserviert.

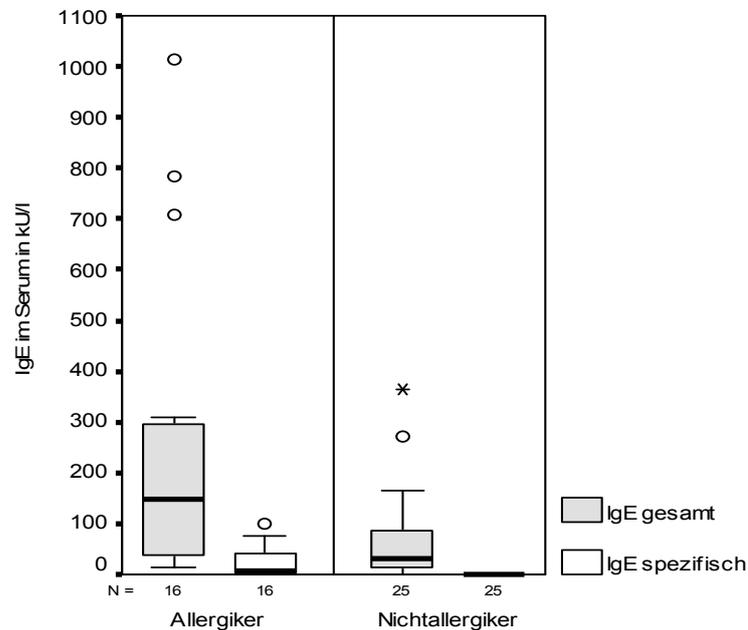


Abbildung 1. Gesamt-IgE und spezifisches IgE im Serum von Allergikern und Nichtallergikern. Darstellung der Gesamt-IgE- und spezifischen Gräser- bzw. Birken-IgE-Spiegel im Serum in kU/l für Allergiker und Nichtallergiker. N = Anzahl der Individuen der Gruppe. ° Extremwerte. * Ausreißer.

3.2.2 PBMC-Aufreinigung

Zur Gewinnung von PBMCs wurde mit dem heparinisiereten Blut bei Raumtemperatur und 450 g für 30 Minuten eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Diese Methode ermöglicht aufgrund von Dichteunterschieden eine Trennung der mononukleären Zellen (Monozyten und Lymphozyten) von Erythrozyten und polymorphkernigen Granulozyten. Nach vorsichtiger Abnahme der PBMC-Schicht (Interphase) mit einer Pasteur-Pipette folgten zwei zehnmütige Waschschrirte mit zwei millimolarem EDTA-PBS bzw. PBS bei 4°C und 400 g bzw. 250 g. Mithilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Anzahl der isolierten Zellen bestimmt, wobei durch Anfärbung mit Trypanblau eine Unterscheidung von toten Zellen getroffen werden konnte. Danach wurden 2×10^6 lebende Zellen pro Milliliter Medium aufgenommen.

3.2.3 Gewinnung von Lymphozyten aus der Nasenschleimhaut

Von der Operation bis zur Zellisolierung wurden die Nasenmuscheln in Medium unter sterilen Bedingungen und bei 4°C aufbewahrt. Nach Entfernung des Knochens wurde

die Nasenschleimhaut (NSH) mit der Schere in 1-3 mm² kleine Stückchen zerteilt. Anschließend wurden 5-10 Schleimhautstückchen unter das rotierende Schneideblatt eines Medicons (50 µm Poren) gelegt und nach Zugabe von 1,5-2 ml Medium für 2-3 Minuten in der *Medimachine* bei 100 U/min geschreddert. Danach wurde das Medium abgesaugt, das Medicon zweimal mit Medium ausgespült und die gewonnene Suspension durch einen Filcon-Filter mit 50 µm Porengröße filtriert. Die im Medicon verbliebenen Schleimhautreste wurden gründlich entfernt. Nach Schredderung aller Schleimhautstücke wurde die Zellsuspension für mindestens 6 Minuten bei 300 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet einmal mit PBS gewaschen. Es folgte eine einminütige Erylyse mit 4 ml 0,2%iger NaCl-Lösung, danach Zugabe gleichen Volumens 1,6%iger NaCl-Lösung und Waschen mit PBS. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das gewonnene Zellpellet in 4 ml Medium aufgenommen.

3.2.4 Stimulation der lymphozytären Zellen des peripheren Bluts und der Nasenschleimhaut

Die PBMCs wurden auf 24-Multiwellplatten eingesät und bei 37°C und 5%igem CO₂-Gehalt der Luft inkubiert. Für die Stimulation der isolierten Nasenschleimhautzellen wurden für jeden Stimulationsansatz jeweils 600 µl der Nasenzellsuspension verwendet. Stimuliert wurde entweder mit Gräser- bzw. Birkenallergen (A), *Lactobacillus acidophilus* (LC) oder mit *Lactobacillus acidophilus* plus Allergen (LC+A). Gräser- bzw. Birkenpollenextrakt wurde in einer Konzentration von 500 SQ/ml eingesetzt. Dies erfolgte unter Zugabe von kostimulatorisch wirkendem anti-CD28 in einer Konzentration von 0,5 µg/ml. Die PBMCs wurden mit den Lactobazillen in einer Konzentration von 0,5x10⁶/ml stimuliert. Zur Stimulation der nasalen Zellen wurden 1x10⁵ Lactobazillen/ml eingesetzt. Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) in einer Konzentration von 1 µg/ml, 500 SQ-Einheiten Birken- bzw. Gräserallergen pro Milliliter und 0,5 µg anti-CD28 pro Milliliter. Die Negativkontrolle bestand aus unstimulierten Zellen (U). Nach 18 Stunden Inkubation wurden die PBMCs und die Nasenschleimhautzellen für die durchflusszytometrische Analyse geerntet. Für die Messung des intrazellulären Zytokingehalts wurden die PBMCs nach 16 Stunden geerntet.

3.2.5 Durchflusszytometrie

Lymphozyten können mithilfe der Durchflusszytometrie durch Bestimmung ihrer relativen Zellgröße und der Granularität von den anderen Zellen (Monozyten, Granulozyten, Erythrozyten) des peripheren Bluts unterschieden werden. Der Einsatz fluoreszenzmarkierter AK, die gegen zelluläre Oberflächenmoleküle gerichtet sind, ermöglicht eine Charakterisierung des Phänotyps und Differenzierungszustandes der Lymphozyten. Dieses Prinzip wird als *fluorescence activated cell sorting* (FACS) bezeichnet. Die verwendeten Fluoreszenzmarker sind Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin-Chlorophyll- α -Protein (PerCP) und Allophycocyanin (APC). So identifizieren gegen CD4 gerichtete AK die T-Helferzell-Subpopulation, gegen CD20 gerichtete AK die B-Lymphozyten. Durch zusätzliche Verwendung von Antikörpern, die mit einer anderen Fluoreszenzfarbe markiert sind und außerdem an andere zelluläre Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Strukturen (z.B. Zytokine) binden, kann eine weiterführende Einschätzung des Differenzierungs- und Funktionszustandes der Zelle getroffen werden.

FACS-Färbung der Oberflächenmarker von unstimulierten und kultivierten Lymphozyten

Nach Überführung der PBMCs bzw. der Nasenschleimhaut-Zellen in Färberöhrchen wurden Medium und die Stimulationszusätze bei 250 g und 4°C über zehn Minuten abzentrifugiert und das Zellpellet einmal mit PBS gewaschen. Um zu verhindern, dass die AK über unspezifische Mechanismen an der Zelloberfläche binden, wurden dem aufgeklopften Pellet 5 μ l Venimmun N oder Beriglobin in 100 μ l FACS-Puffer zugesetzt. Dabei stellt man sich vor, dass die Immunglobuline (Venimmun bzw. Beriglobin sind Gemische humaner Immunglobuline) über ihren Fc-Teil unspezifisch an membranständige Oberflächenmoleküle (z.B. Fc-Rezeptoren) binden und damit diese Bindungsstellen abblocken. Nach einer zehnminütigen Inkubationsdauer wurden die spezifischen AK nach dem entsprechenden Pipettierschema (Tabelle 3) zugegeben und 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Die nötigen AK-Mengen wurden durch vorangegangene Titrierungsversuche ermittelt. Zur Abgrenzung der Markierungsfluoreszenz von der Eigenfluoreszenz der Zellen wurde jeweils ein Röhrchen mit ungefärbten Zellen mitgeführt. Anschließend wurden unter gleichen Bedingungen wie oben die ungebundenen AK mit PBS abzentrifugiert, die Zellen aufgeklopft und mit 250 μ l (Nasen-Zellen) bzw. 500 μ l (PBMCs) 2%igem PFA fixiert.

Markierung	FITC	PE	PerCP	APC
B-Zellfärbung 1	10 µl CD23	5 µl CD80	5 µl CD20	5 µl CD86
B-Zellfärbung 2	2,5 µl IgE	-	5 µl CD20	-
T-Zellfärbung 1	5 µl CLA	5 µl CD152	10 µl CD4	2,5 µl CD69
T-Zellfärbung 2	10 µl CD45RO	10 µl CD45RA	10 µl CD4	-

Tabelle 3. AK-Panel für die Oberflächenfärbung. Mengenangaben pro 100 µl Zellsuspension.

Für die Ausgangswerte (unstimulierte, nichtinkubierte Zellen) wurden die B- und T-Zellfärbungen 1 + 2 durchgeführt. Die kultivierten Zellen wurden nur mit der B- und T-Zellfärbung 1 gefärbt. Es wurden 1×10^6 PBMCs pro Färberöhrchen eingesetzt. Die Menge der verwendeten Nasenzellen pro Färberöhrchen variierte je nach zu markierender Lymphozytenart. So wurden zur Färbung der Ausgangswerte 100 µl der Nasenzellsuspension für die unmarkierte Probe, je 200 µl für die T-Zellmarkierung und je 250 µl für die B-Zellfärbung eingesetzt. Die Markierung der kultivierten nasalen T-Lymphozyten erfolgte mit 600 µl der Kultursuspension, die der B-Zellen mit 900 µl. Die ungefärbte Vergleichsprobe enthielt 300 µl.

Intrazelluläre FACS-Färbung der stimulierten PBMCs

Nach 13 Stunden Inkubationszeit wurden die PBMCs mit 2 µl Brefeldin A pro Ansatz versetzt, um die Sekretion der produzierten Zytokine zu verhindern. Brefeldin A bewirkt eine Hemmung des Zytokintransports vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat. Danach wurden die PBMCs für weitere drei Stunden inkubiert und nach insgesamt 16-stündiger Inkubation zu jeweils 1×10^6 Zellen pro Färberöhrchen vorbereitet. Für jeden Stimulationsansatz wurden PBMCs mitgeführt, die mit den entsprechenden Isotypenkontrollen (IK) in konzentrationsäquivalenter Menge gefärbt wurden. Man geht davon aus, dass Isotypen als Immunglobuline der gleichen Klasse sowie gleicher Fluoreszenzmarkierung die gleichen unspezifischen Bindungsstellen besetzen und gleiche biochemische Eigenschaften besitzen wie die spezifischen Test-AK (Tabelle 4).

Markierung	FITC	PE	PerCP	APC
Isotypenkontrolle	10 µl IgG2b	10 µl IgG1	10 µl IgG1	2,5 µl IgG1
T-Zellfärbung	10 µl IFN γ	10 µl IL-4	10 µl CD4	2,5 µl CD69

Tabelle 4. AK-Panel zur Bestimmung der intrazellulären Zytokine von T-Lymphozyten. Mengenangaben pro 1×10^6 PBMCs in 100 µl Zellsuspension.

Nach zweimaligem Waschen mit 0,5%igem BSA-PBS (10 Minuten bei 250 g und 4°C) wurden die aufgeklopften Zellen mit 500 µl PFA (1-2%) 15 Minuten vorfixiert. Danach wurde wie oben zweimal mit BSA-PBS gewaschen. Zur Abblockung der unspezifischen Bindungsstellen wurden die PBMCs mit 5 µl Venimmun N oder Beriglobin in 100 µl FACS-Puffer für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Markierung der Oberflächenmoleküle CD4 und CD69 (Tabelle 4). Nach 20-minütiger Inkubation bei 4°C wurden die ungebundenen AK durch Waschen mit BSA-PBS entfernt. Um die Penetration der Zytokin-AK zu ermöglichen, wurde die Lymphozytenmembran mit jeweils 500 µl FACS-Permeabilizing-Solution (nach Herstellerangaben 1:10 mit Aqua dest. vorverdünnt) über 10 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach Waschen mit 2,5 ml FACS-Puffer wurden die folgenden Schritte bei 4°C durchgeführt. Es wurden die Zytokin-AK und die entsprechenden IK zugegeben (Tabelle 4), im Anschluss an die 20-minütige Inkubation die ungebundenen AK durch Waschen mit BSA-PBS entfernt und die aufgeklopften Zellen erneut mit jeweils 500 µl PFA (2%) fixiert.

3.2.6 IgE-Bestimmung im Serum

Im IgE-Labor der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin wurde die Bestimmung des Gesamt-IgE und des spezifischen IgE aus dem Serum mithilfe des *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) von Pharmacia durchgeführt (Abbildung 1).

3.2.7 Immunhistochemie der Nasenschleimhaut

Zur Darstellung der Verteilung der lymphozytären Zellen in der Nasenschleimhaut wurden in der histologischen Abteilung der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin exemplarisch jeweils zwei Hämatoxylin-Eosin-Schnitte von der Nasenschleimhaut zweier Allergiker und zweier Nichtallergiker angefertigt. Ferner wurden einerseits die T-Lymphozyten mit einem gegen CD3 gerichteten AK markiert, andererseits die B-Lymphozyten mit einem gegen CD20 gerichteten AK.

3.3 Statistik

Für den Gruppenvergleich zwischen Allergikern und Nichtallergikern in Hinsicht auf die basale Expression der Oberflächenmoleküle und die IgE-Werte wurde der U-Test nach Mann-Whitney für zwei unverbundene Stichproben verwendet. Der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben sollte Unterschiede zwischen der basalen Expression von Oberflächenmolekülen auf lymphozytären Zellen des peripheren Bluts und der Nasenschleimhaut auf Signifikanz prüfen.

Zur Überprüfung der Ergebnisse aus den Stimulationsversuchen hinsichtlich Signifikanz wurde die Rangvarianzanalyse nach Brunner eingesetzt, mit der sich Abweichungen zweier Gruppen bezüglich ihres Gruppen- und Stimulationsverhaltens und der gegenseitigen Wechselwirkungen aufzeigen lassen. Dieses Testverfahren fand bei der Analyse der stimulierbaren Expression von Oberflächenmolekülen und Produktion von Zytokinen im Rahmen eines Paarvergleiches Anwendung.

4 Ergebnisse

4.1 Phänotyp der lymphozytären Zellen des peripheren Bluts und der Nasenschleimhaut

4.1.1 Verteilung der Lymphozyten in der Nasenschleimhaut

Die Immunhistochemie stellt exemplarisch die Lokalisation der untersuchten nasalen Lymphozyten dar. Es zeigte sich, dass CD3⁺ T-Lymphozyten hauptsächlich an der epithelialen Grenzschicht sowie in der Nähe der nasalen Drüsen lokalisiert sind (Abbildung 2A). CD20⁺ B-Lymphozyten waren ohne deutliche Assoziation zu anatomischen Strukturen diffus in der Submukosa verteilt (Abbildung 2B). Sie fanden sich sowohl in der Nähe von glandulären Strukturen als auch perivaskulär.

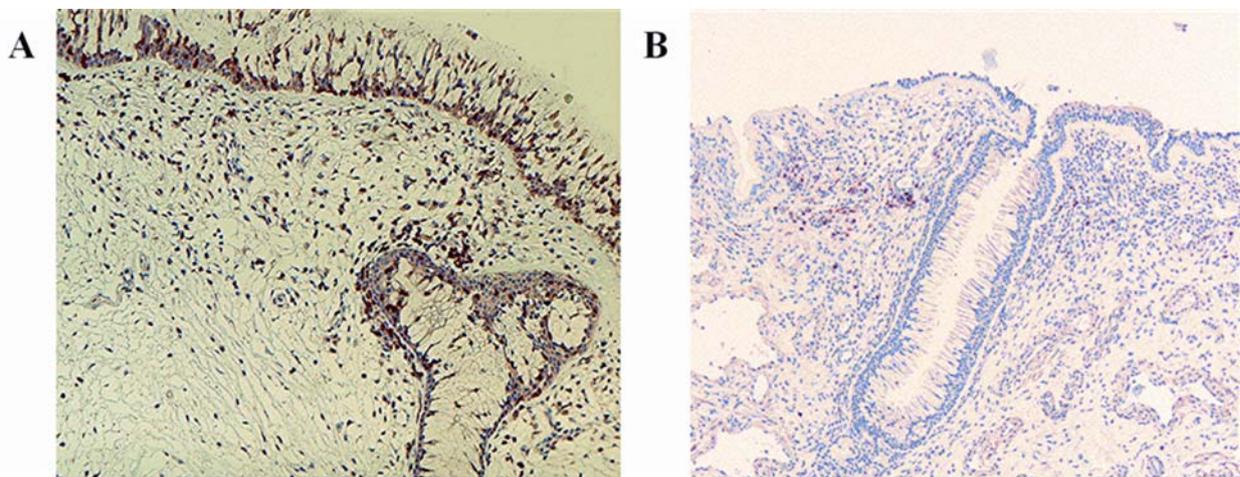


Abbildung 2. Immunhistochemischer Nachweis der CD3⁺ T-Lymphozyten (A) und CD20⁺ B-Lymphozyten (B) in der Nasenschleimhaut. 10x Vergrößerung.

Mit der angewendeten Zellseparationsmethode wurden aus den zwei Nasenmuscheln eines Probanden im Mittel 8.000 CD4⁺ T-Lymphozyten und 5.000 CD20⁺ B-Lymphozyten isoliert. Die B-Lymphozyten-Gesamtzellzahl war bei den Nichtallergikern durchschnittlich 10% höher als bei den Allergikern; die T-Lymphozyten-Gesamtzellzahl war um durchschnittlich 30% höher.

4.1.2 Basale Expression von Oberflächenmolekülen auf T-Lymphozyten

4.1.2.1 CD69-Expression

Die T-Lymphozyten des peripheren Bluts waren schwach aktiviert (Abbildung 3; Median_A 1,5%, Median_{NA} 1,9%). Aus der Nasenschleimhaut wurden hauptsächlich aktivierte T-Lymphozyten isoliert (Median_A 73,4%, Median_{NA} 43,4%). In der Nasenschleimhaut von Nichtallergikern waren die T-Zellen geringer aktiviert als bei den Allergikern. Dies war nicht signifikant.

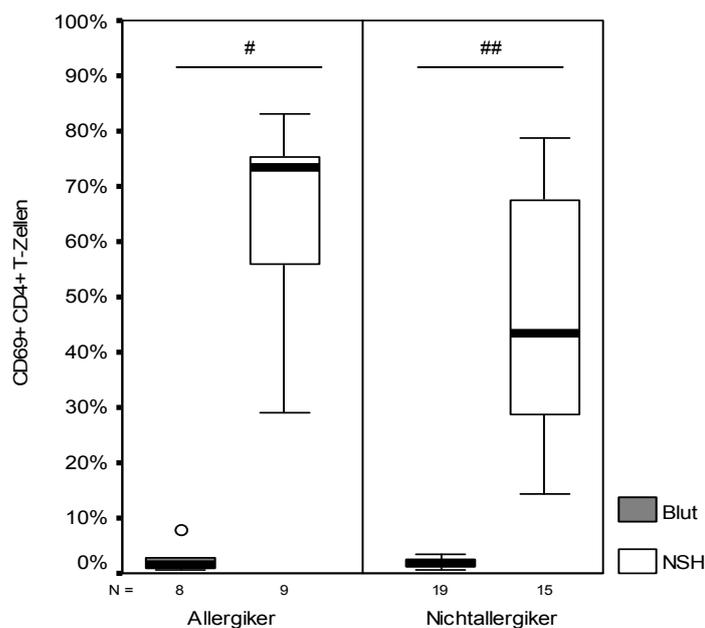


Abbildung 3. CD69-Expression der CD4+ T-Zellen bei Allergikern und Nichtallergikern.

Angaben in Prozent der CD4+ peripheren (Blut) und nasalen (NSH) Zellen. Schwarzer Querbalken = Median, N = Anzahl der untersuchten Individuen, # p<0,05, ## p<0,01, o Ausreißer.

4.1.2.2 Expression von CD45RO und CD45RA

Aus der Nasenschleimhaut wurden hauptsächlich CD45RO+ T-Gedächtniszellen isoliert (Median_A, Median_{NA} 97%; Abbildung 4A). 8,4% (Median_{NA}) bzw. 10,6% (Median_A) der nasalen T-Zellen exprimierten CD45RA (Abbildung 4B).

Im peripheren Blut kamen CD45RA+ naive T-Zellen (Median_A 53,8%, Median_{NA} 61,2%) in ähnlichem Ausmaß wie CD45RO+ T-Gedächtniszellen (Median_A 53,2%, Median_{NA} 46,3%) vor.

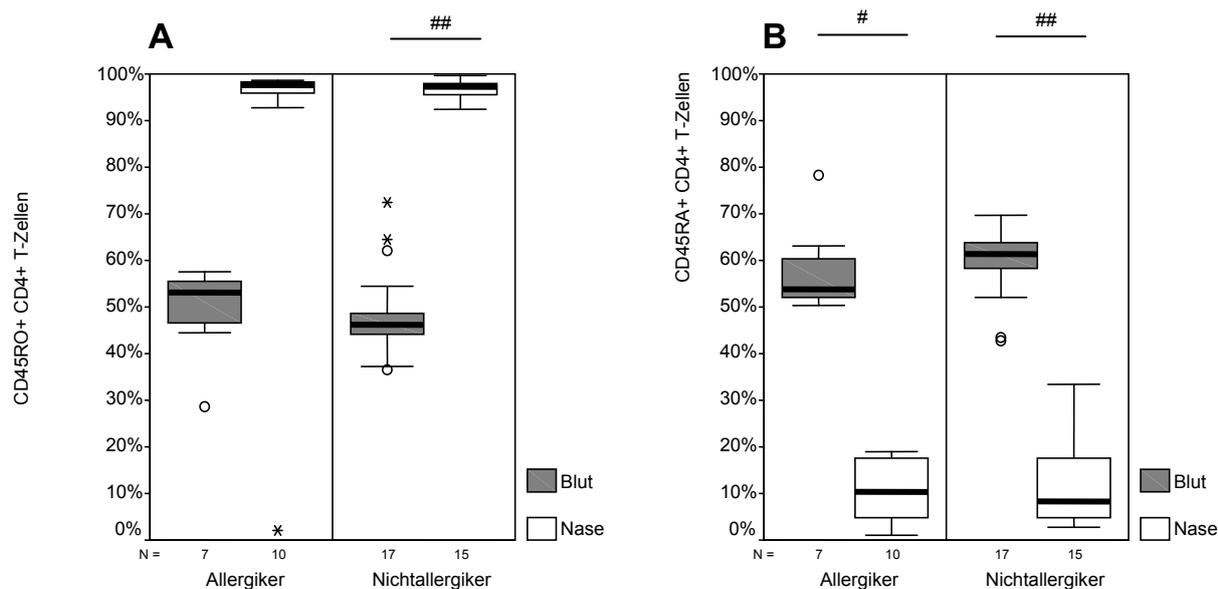


Abbildung 4. Basale Expression von CD45RO (A) und CD45RA (B) auf T-Helferzellen.

Angaben in Prozent der CD4+ Zellen des peripheren Bluts (Blut) und der Nasenschleimhaut (NSH). Vergleich von Allergikern und Nichtallergikern. Schwarzer Querbalken = Median, N = Anzahl der untersuchten Individuen, # p<0,05, ## p<0,01, o Ausreißer, * Extremwert.

4.1.2.3 CLA-Expression

Im peripheren Blut präsentierten mehr T-Lymphozyten das *cutaneous lymphocyte-associated antigen* (CLA) als in der Nasenschleimhaut (Tabelle 5). Es bestand kein Unterschied zwischen Allergikern und Nichtallergikern.

	peripheres Blut	Nasenschleimhaut
Allergiker	15,12 ± 3,14	4,02 ± 1,59
Nichtallergiker	12,20 ± 1,37	4,96 ± 3,07

Tabelle 5. CLA-Expression auf CD4-positiven T-Zellen des peripheren Bluts und der Nasenschleimhaut. Angaben als Mittelwert ± Standardabweichung in Prozent der CD4-positiven Zellen.

4.1.2.4 Expression von CD152

In beiden Gruppen war die CD152-Expression signifikant stärker auf nasalen (Median_A 5,2%, Median_{NA} 4,9%) als auf peripheren T-Lymphozyten (Median_A 1%, Median_{NA} 1,1%; Abbildung 5). Gruppenunterschiede zwischen Allergikern und Nichtallergikern bestanden nicht.

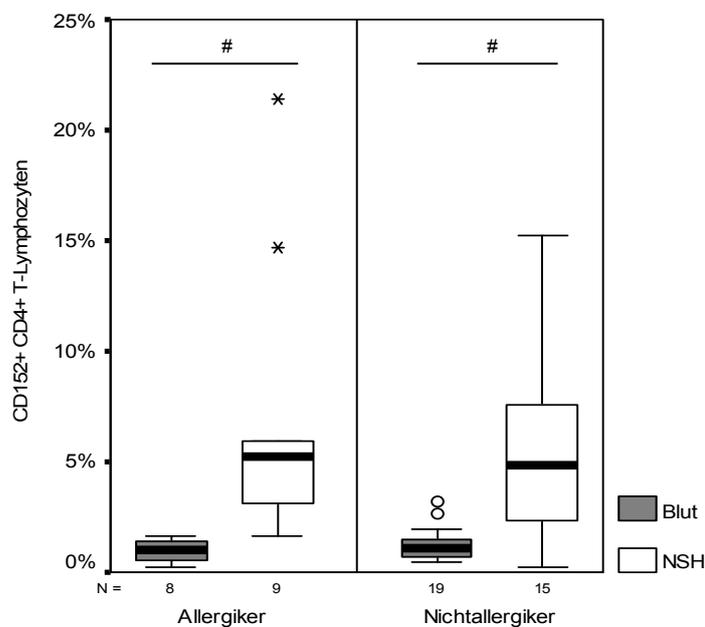


Abbildung 5. Basale CD152-Expression der T-Helferzellen.

Angaben in Prozent der CD4+ Zellen des peripheren Bluts (Blut) und der Nasenschleimhaut (NSH). Vergleich von Allergikern und Nichtallergikern. Schwarzer Querbalken = Median, N = Anzahl der untersuchten Individuen, # $p < 0,05$, o Ausreißer, * Extremwert.

4.1.3 Basale Expression von Oberflächenmolekülen auf B-Lymphozyten

4.1.3.1 Expression von CD23

Im peripheren Blut war die CD23-Expression bei den Allergikern (Median_A 55%) höher als bei den Nichtallergikern (Median_{NA} 25,5%; Abbildung 6). Dieser Unterschied war nicht signifikant. CD23 wurde auf B-Lymphozyten der Nasenschleimhaut (Median_A 13,2%, Median_{NA} 21,7%) signifikant geringer exprimiert. Am schwächsten war die CD23-Expression auf nasalen B-Zellen von Allergikern.

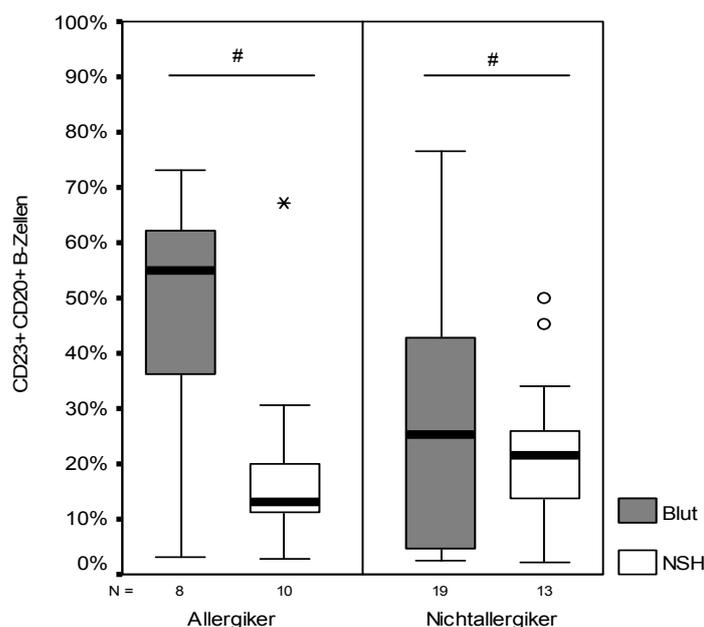


Abbildung 6. Basale CD23-Expression der B-Lymphozyten.

Angaben in Prozent der CD20+ Zellen des peripheren Bluts (Blut) und der Nasenschleimhaut (NSH) von Allergikern und Nichtallergikern. Schwarzer Querbalken = Median, N = Anzahl der untersuchten Individuen, # $p < 0,05$, o Ausreißer, * Extremwert.

4.1.3.2 IgE-Expression

Auf den peripheren B-Lymphozyten (Median_A 4,6%, Median_{NA} 3,5%) wurde signifikant weniger membrangebundenes IgE nachgewiesen als auf den nasalen B-Zellen (Median_A 10,5%, Median_{NA} 19%; Abbildung 7). Die meisten IgE+ B-Zellen fanden sich in der Nasenschleimhaut von Nichtallergikern.

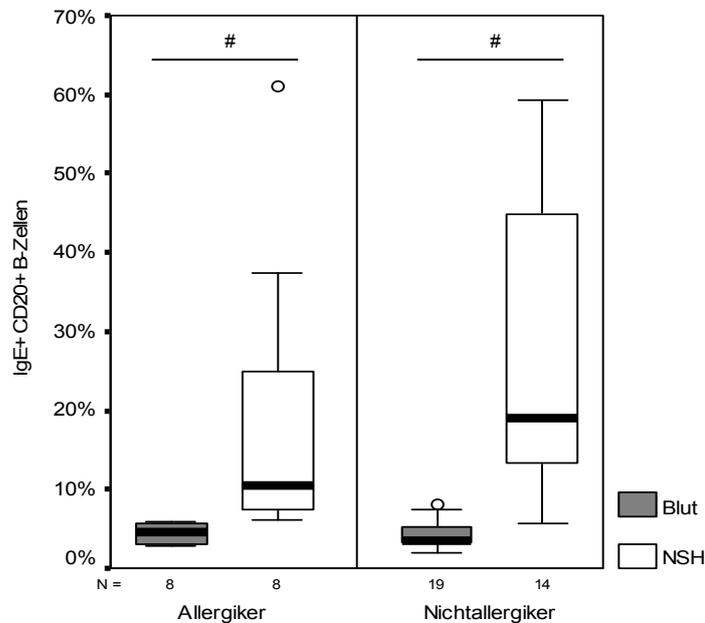


Abbildung 7. Expression von membrangebundenem IgE auf CD20+ B-Zellen.

Angaben in Prozent der CD20+ Zellen des peripheren Bluts (Blut) und der Nasenschleimhaut (NSH) bei Allergikern und Nichtallergikern. Schwarzer Querbalken = Median, N = Anzahl der untersuchten Individuen, # $p < 0,05$, o Ausreißer.

4.1.3.3 Expression kostimulatorischer Moleküle: CD80 und CD86

Aus der Nasenschleimhaut wurden CD80+ (Median_A 4%, Median_{NA} 4,2%; Abbildung 8A) sowie CD86+ (Median_A 6,4%, Median_{NA} 5%; Abbildung 8B) B-Zellen isoliert. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen Allergikern und Nichtallergikern. Auf den nasalen B-Zellen von Allergikern war die CD86-Expression am stärksten. Im peripheren Blut war die CD80-Expression (Median_A 20,7%, Median_{NA} 16,6%) signifikant höher und die CD86-Expression (Median_A, Median_{NA} 1,1%) signifikant geringer als in der Nasenschleimhaut.

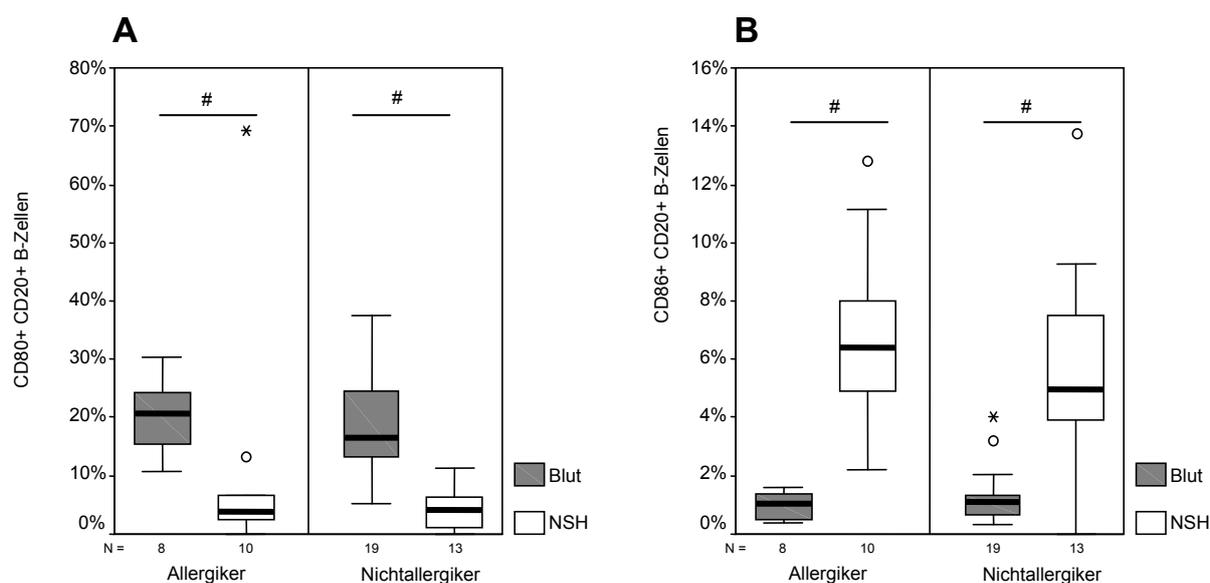


Abbildung 8. Expression von CD80 (A) und CD86 (B) auf B-Lymphozyten.

Angaben in Prozent der CD20+ Zellen des peripheren Bluts (Blut) und der Nasenschleimhaut (NSH) bei Allergikern und Nichtallergikern. Schwarzer Querbalken = Median, N = Anzahl der untersuchten Individuen, # $p < 0,05$, o Ausreißer, * Extremwert.

4.2 Einfluss von *Lactobacillus acidophilus* auf die Expression lymphozytärer Oberflächenmoleküle

Auf PBMCs und Lymphozyten der Nasenschleimhaut wurde nach 18-stündiger Inkubation mit Allergen, SEB, Lactobazillen oder Lactobazillen plus Allergen die Expression von Oberflächenantigenen durchflusszytometrisch bestimmt. Bei den CD4+ T-Zellen wurde die Expression von CD69 und CD152 ermittelt. Die CD20+ B-Zellen wurden hinsichtlich ihrer CD23-, CD80- und CD86-Expression untersucht.

4.2.1 Wirkung von *Lactobacillus acidophilus* auf T-Zellen

4.2.1.1 CD69-Expression

Nach Stimulation mit Allergen (A: Median_A 3,9%, Median_{NA} 2,9%) sowie nach bakterieller Stimulation (LC: Median_A 5%, Median_{NA} 3,7%; LC+A: Median_A 5,7%, Median_{NA} 4,4%) erfolgte eine signifikante Zunahme der CD69-Expression (Abbildung 9). Lactobazillen bewirkten in beiden Gruppen eine stärkere Zunahme als Allergen. Signifikant war dies nur für die Nichtallergiker. Die T-Lymphozyten der Allergiker waren in allen Stimulationen am stärksten aktiviert. Im peripheren Blut bewirkte der SEB-Stimulus als Positivkontrolle eine signifikante Zunahme der CD69-Expression in beiden Gruppen (SEB: Median_A 60,2%, Median_{NA} 59,5%, $p < 0,01$, Werte nicht dargestellt). Der Aktivierungszustand der unstimulierten Kontrollen (U: Median_A 2,1%, Median_{NA} 2%; Abbildung 9) war vergleichbar mit den Basalwerten vor Inkubation (Abbildung 3).

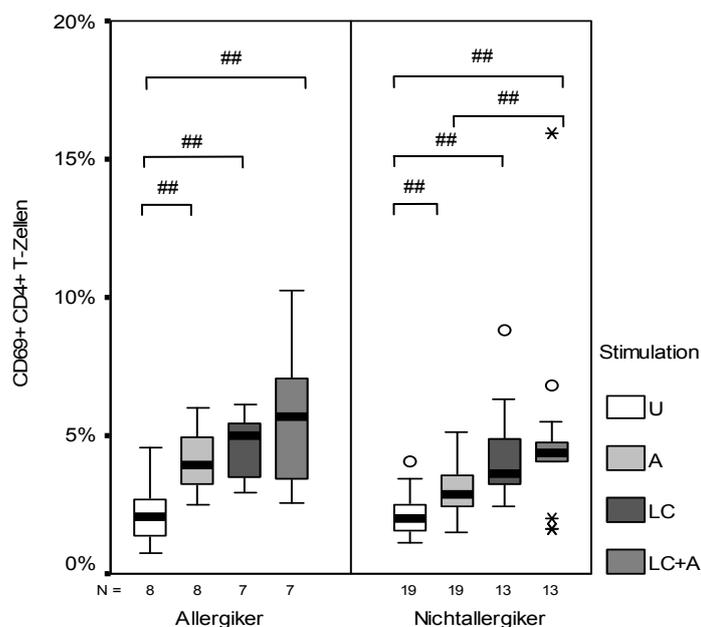


Abbildung 9. CD69-Expression auf peripheren T-Helferzellen unter Stimulationsbedingungen.

Angaben in Prozent der CD4+ Zellen. Legende: unstimuliert (U), Stimulation mit Allergen (A), Lactobazillen (LC), Lactobazillen plus Allergen (LC+A). Schwarzer Querbalken = Median, N = Anzahl der untersuchten Individuen, ## $p < 0,01$, o Ausreißer, * Extremwert.

Für die isolierten T-Zellen der Nasenschleimhaut erfolgte während der Inkubation eine signifikante Aktivierungsabnahme (U: Median_A 49,5%, Median_{NA} 33,6%; Abbildung 10) im Vergleich zu den Basalwerten vor Inkubation (Abbildung 3). Weder bei den Allergikern, noch bei den Nichtallergikern hatten die eingesetzten Stimuli einen signifikanten Einfluss auf den Aktivierungszustand der T-Zellen (Abbildung 10). Signifikant stärker war die CD69-Expression in allen Stimulationen bei den Allergikern verglichen mit den Nichtallergikern (A: Median_A 60,9%, Median_{NA} 37,1%; SEB: Median_A 62,6%, Median_{NA} 42,6%; LC: Median_A 58,1%, Median_{NA} 37,2%; LC+A: Median_A 67,3%, Median_{NA} 34,2%).

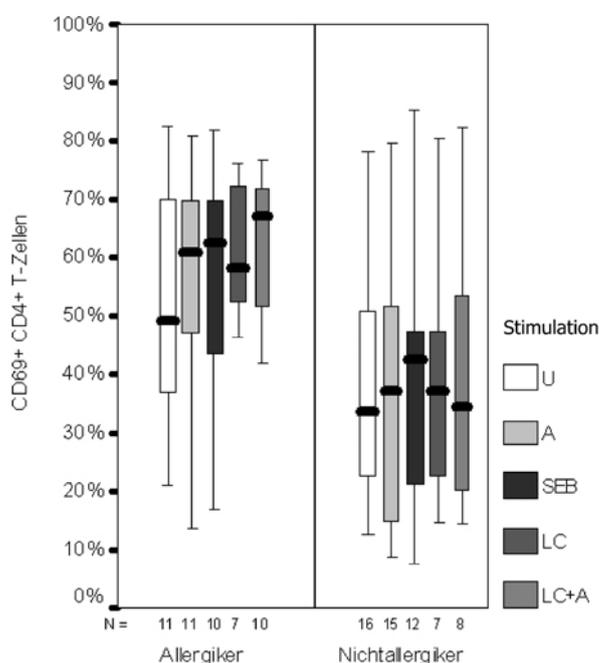


Abbildung 10. CD69-Expression auf nasalen T-Helferzellen unter Stimulationsbedingungen. Angaben in Prozent der CD4+ Zellen. Legende: unstimuliert (U), Stimulation mit Allergen (A), Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB), Lactobazillen (LC), Lactobazillen plus Allergen (LC+A). Schwarzer Querbalken = Median, N = Anzahl der untersuchten Individuen.

4.2.1.2 CD152-Expression

Nach Inkubation der PBMCs mit Lactobazillen erfolgte nur in der Allergiker-Gruppe eine signifikante Heraufregulation von CD152 (U: Median_A, Median_{NA} 0,6%; LC: Median_A 1,4%, Median_{NA} 0,9%; Abbildung 11). In beiden Gruppen führte der SEB-Stimulus zur stärksten Heraufregulation (SEB: Median_A 3,8%, Median_{NA} 3,5%). Die mediane CD152-Expression nach Stimulation mit Allergen (A: Median_A, Median_{NA} 0,7%) bzw. mit Lactobazillen plus Allergen (LC+A: Median_A 0,7%, Median_{NA} 1,1%) war vergleichbar mit den unstimulierten Zellen.

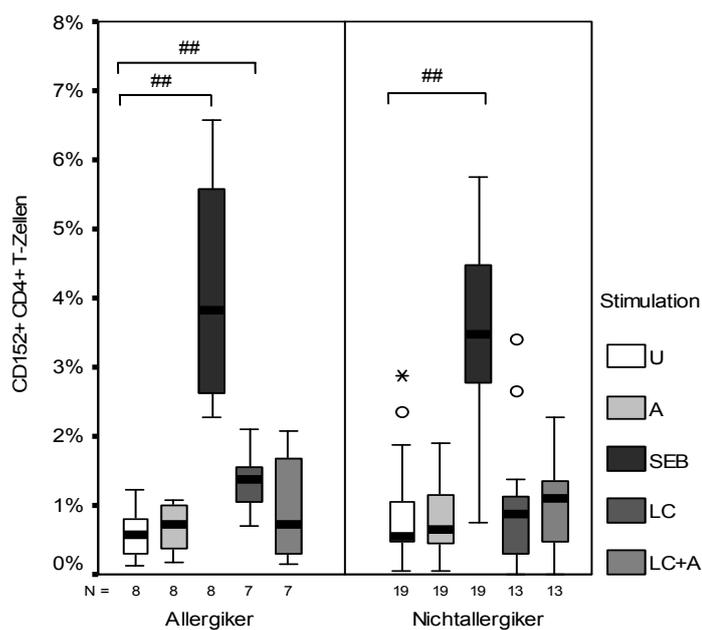


Abbildung 11. CD152-Expression auf peripheren T-Helferzellen unter Stimulationsbedingungen.

Angaben in Prozent der CD4+ Zellen. Legende: unstimuliert (U), Stimulation mit Allergen (A), Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB), Lactobazillen (LC), Lactobazillen plus Allergen (LC+A). Schwarzer Querbalken = Median, N = Anzahl der untersuchten Individuen, ## p<0,01, o Ausreißer, * Extremwert. Der Ausreißer der SEB-Stimulation bei 12,04% in der Allergiker-Gruppe wurde nicht dargestellt.

Auf den T-Zellen der Nasenschleimhaut von Nichtallergikern zeigte sich nach Inkubation eine signifikante Herabregulation von CD152 (U: Median_{NA} 2,2%; Abbildung 12) im Vergleich zu den Basalwerten (Abbildung 5). Nach SEB-Stimulation nahm die CD152-Expression signifikant zu (SEB: Median_{NA} 5,5%). Bei den Allergikern wurden diese Effekte nicht beobachtet (U: Median_A 5,9%; SEB: Median_A 5,7%). In dieser Gruppe erfolgte eine signifikante CD152-Herabregulation durch die Stimulation mit Lactobazillen plus Allergen (LC+A: Median_A 3,6%), die bei den Nichtallergikern entgegengesetzt zur Heraufregulation führte (LC+A: Median_{NA} 4,2%). In den Stimulationsversuchen mit Allergen (A) sowie mit Lactobazillen (LC) wurden keine signifikanten Änderungen der CD152-Expression beobachtet (A: Median_A 4,8%, Median_{NA} 2,6%; LC: Median_A 5,3%, Median_{NA} 2,5%).

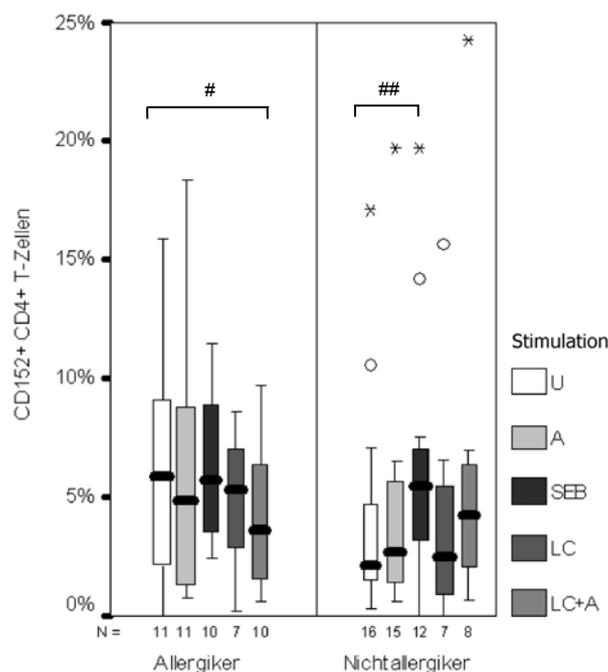


Abbildung 12. CD152-Expression auf nasalen T-Helferzellen unter Stimulationsbedingungen.

Angaben in Prozent der CD4+ Zellen. Legende: unstimuliert (U), Stimulation mit Allergen (A), Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB), Lactobazillen (LC), Lactobazillen plus Allergen (LC+A). Schwarzer Querbalken = Median, N = Anzahl der untersuchten Individuen, # p<0,05, ## p<0,01, o Ausreißer, * Extremwert.

4.2.2 Wirkung von *Lactobacillus acidophilus* auf B-Zellen

4.2.2.1 CD23-Expression im peripheren Blut

Im Vergleich zur basalen Expression (Abbildung 6) nahm die CD23-Expression während der Inkubation ab (U: Median_A 11,9%, Median_{NA} 5,1%; Abbildung 13). Bei den Allergikern erfolgte nach allergener Stimulation eine signifikante Heraufregulation von CD23 (A: Median_A 15%), nach bakterieller Stimulation eine deutliche Herabregulation von CD23 (LC: Median_A 8,3%). Dieser Effekt wurde bei den Nichtallergikern nicht beobachtet (A: Median_{NA} 5,4%; LC: Median_{NA} 6,1%). In beiden Gruppen erhöhte sich nach Zugabe von Allergen signifikant der Anteil CD23+ B-Lymphozyten (LC+A: Median_A 11,2%, Median_{NA} 9,3%). Der SEB-Stimulus als Positivkontrolle bewirkte eine signifikante Zunahme der CD23-Expression auf 48,7% (Median_A) bzw. 29,7% (Median_{NA}).

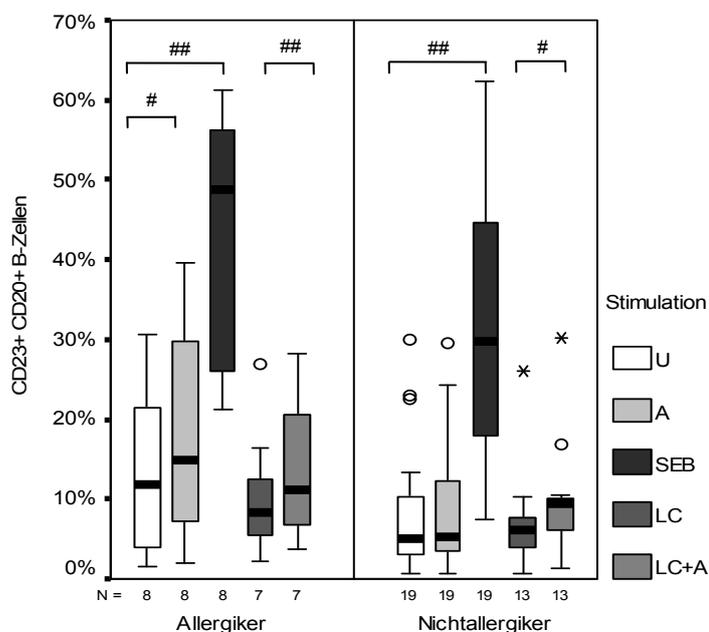


Abbildung 13. CD23-Expression auf peripheren B-Lymphozyten unter Stimulationsbedingungen. Angaben in Prozent der CD20+ Zellen. Legende: unstimuliert (U), Stimulation mit Allergen (A), Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB), Lactobazillen (LC), Lactobazillen plus Allergen (LC+A). Schwarzer Querbalken = Median, N = Anzahl der untersuchten Individuen, # p<0,05, ## p<0,01, o Ausreißer, * Extremwert.

4.2.2.2 Expression von CD80 und CD86 im peripheren Blut

In beiden Gruppen wurde im Vergleich zur Basalexpression (Abbildung 8) CD80 nach Inkubation geringer exprimiert (U: Median_A 10,6%, Median_{NA} 6,5%; Abbildung 14A); CD86 wurde stärker exprimiert (U: Median_A 4,3%, Median_{NA} 3%; Abbildung 14B). Allergen induzierte nur bei den Allergikern eine signifikante Zunahme der CD86-Expression (A: Median_A 5,6%, Median_{NA} 4,1%), und hatte keinen Einfluss auf die Expression von CD80 (A: Median_A 10,4%, Median_{NA} 8,6%). Nach Stimulation mit Lactobazillen zeigte sich in der Allergiker-Gruppe eine signifikante Abnahme der CD80-Expression (LC: Median_A 7,4%, Median_{NA} 7%), auch nach Zusatz von Allergen (LC+A: Median_A, Median_{NA} 8,8%). In der Kontrollgruppe fand einzig nach SEB-Stimulation eine signifikante Heraufregulation von CD80 statt (SEB: Median_A 11,6%, Median_{NA} 11,1%). Die CD86-Expression erhöhte sich in beiden Gruppen durch Lactobazillen-Stimulation signifikant auf 12,6% (LC Median_A) bzw. 9,9% (LC Median_{NA}). Bei den Nichtallergikern bewirkte die zusätzliche Allergen-Stimulation eine signifikante Abnahme der CD86+ B-Lymphozyten (LC+A: Median_A 15%, Median_{NA} 6,5%). Die stärkste signifikante Heraufregulation von CD86 erfolgte in beiden Gruppen unter dem Einfluss von SEB als Positivkontrolle (SEB: Median_A 42,8%, Median_{NA} 42,3%).

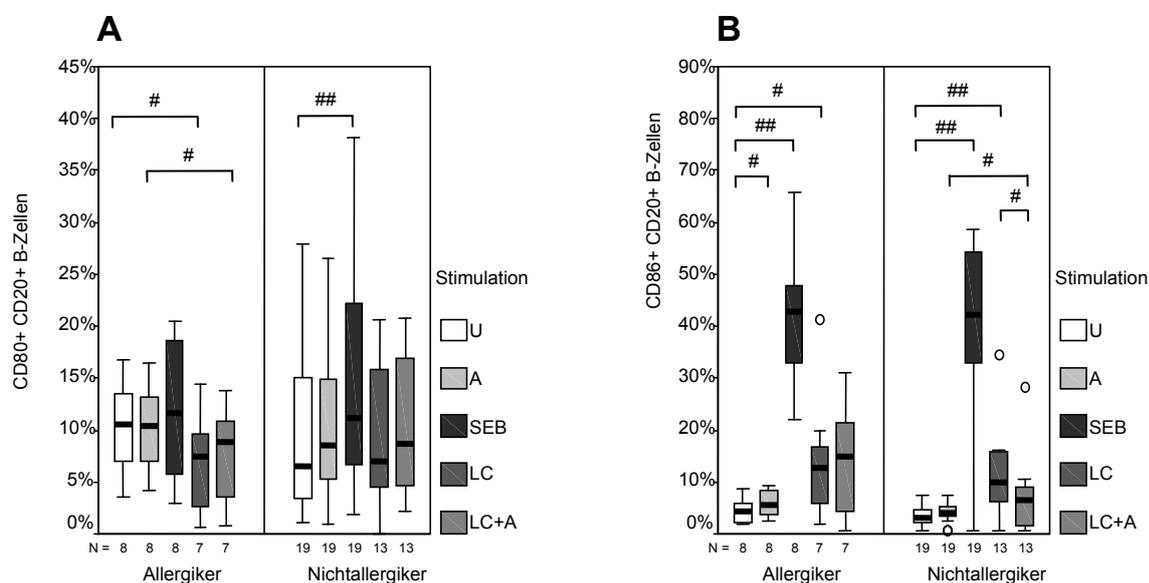


Abbildung 14. Expression von CD80 (A) und CD86 (B) auf peripheren B-Lymphozyten unter Stimulationsbedingungen.

Angaben in Prozent der CD20+ Zellen. Legende: unstimuliert (U), Stimulation mit Allergen (A), Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB), Lactobazillen (LC), Lactobazillen plus Allergen (LC+A). Schwarzer Querbalken = Median, N = Anzahl der untersuchten Individuen, # p<0,05, ## p<0,01, o Ausreißer.

4.2.2.3 Einfluss der Stimulationen auf die nasalen B-Zellen

Eine statistische Auswertung war für die Stimulationsversuche mit isolierten Nasenschleimhaut-Zellen nur bedingt möglich. Da es während Inkubation und Stimulation in den meisten Fällen zum B-Zell-Verlust kam, konnten nur Proben mit ausreichender B-Zell-Anzahl durchflusszytometrisch analysiert werden. Daraus resultierten vor allem bei den Stimulationen mit Lactobazillen niedrige Fallzahlen. Die ermittelten Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt.

	U	A	LC	LC+A	SEB
CD23 A	8,10 ± 5,04	10,46 ± 2,82	14,30 ± 10,54	15,80 ± 15,14	17,81 ± 9,17
NA	8,34 ± 7,14	8,71 ± 6,13	9,32 ± 6,56	11,65 (n=1)	12,13 ± 5,57
CD80 A	9,30 ± 4,33	7,46 ± 4,23	12,16 ± 10,70	11,09 ± 15,30	6,91 ± 5,58
NA	9,69 ± 5,56	7,66 ± 4,31	10,88 ± 10,38	4,01 (n=1)	10,04 ± 5,62
CD86 A	15,16 ± 19,00	3,89 ± 2,69	5,89 ± 3,51	3,34 ± 2,57	7,96 ± 4,46
NA	8,02 ± 8,13	7,10 ± 4,82	7,17 ± 5,58	1,69 (n=1)	7,60 ± 6,34

Tabelle 6. Expression von CD23, CD80 und CD86 auf den nasalen B-Zellen von Allergikern (A) und Nichtallergikern (NA). Angaben als Mittelwert ± Standardabweichung in Prozent der CD20+ B-Lymphozyten.

Vergleichbar mit den PBMCs (Abbildung 6, Abbildung 13) führte die Inkubation der Nasenschleimhaut-Zellen zum Abfall der CD23-Expression (Tabelle 6). Bei den Allergikern wurde CD23 durch SEB-Stimulation signifikant heraufreguliert. Bei den anderen Stimulationsansätzen zeigten sich keine signifikanten Änderungen der CD23-Expression.

Im Unterschied zu den inkubierten PBMCs (Abbildung 8A, Abbildung 14A) führte die Kultivierung der Nasenschleimhaut-Zellen zur Heraufregulation von CD80 bei Allergikern und Nichtallergikern (Abbildung 8A, Tabelle 6). In den Stimulationsansätzen mit Allergenen, Lactobazillen sowie SEB zeigten sich keine signifikanten Änderungen der CD80-Expression.

Auf den nasalen B-Lymphozyten kam es durch die Kultivierung - anders als für CD80 - nicht zur signifikanten Heraufregulation von CD86 (Abbildung 8B, Tabelle 6). Bei den Allergikern erfolgte durch allergene Stimuli eine signifikante Abnahme der CD86-Expression. Die anderen Stimulationsansätze bewirkten keine signifikante Änderung der CD86-Expression.

4.3 Einfluss von *Lactobacillus acidophilus* auf die Funktion differenzierter peripherer T-Helferzellen

Für diese Fragestellung wurde nach 16-stündiger Inkubation und Stimulation der PBMCs und intrazellulärer Markierung die Produktion der Zytokine IFN γ und IL-4 in CD4⁺ T-Lymphozyten durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Bestimmung der intrazellulären Zytokinproduktion ermöglicht die Unterscheidung von Th1- und Th2-differenzierten T-Helferzellen, da sich diese durch ein gegensätzliches Zytokinprofil auszeichnen. So werden die IFN γ ⁺ IL-4⁻ CD4⁺ T-Zellen als Th1-Zellen charakterisiert; die IFN γ ⁻ IL-4⁺ CD4⁺ T-Zellen repräsentieren die Th2-Zellen.

Zusätzlich wurde der Aktivierungszustand via CD69 ermittelt. Die CD69-Expression war nach 16-stündiger Stimulation vergleichbar mit den Werten nach 18-stündiger Stimulation (Abbildung 9) und wird deshalb nicht gesondert abgebildet.

In der Auswertung wurden insbesondere die aktivierten T-Helfer-Zellen hinsichtlich ihrer Zytokinproduktion betrachtet. Da für immunologische Vorgänge im Rahmen allergischer Erkrankungen das Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Antwort eine Rolle spielt, wurde das Verhältnis der medianen Produktion von IFN γ zur medianen Produktion von IL-4 dargestellt (Abbildung 15).

In der Allergiker-Gruppe waren in der unstimulierten Kultur hauptsächlich aktivierte IL-4⁺ T-Helferzellen nachweisbar (CD69⁺ IL4⁺ CD4⁺, U: Median_A 0,01%; CD69⁺ IFN γ ⁺ CD4⁺, U: Median_A 0%); bei den Nichtallergikern fanden sich kaum aktivierte IFN γ ⁺ oder IL-4⁺ T-Zellen (CD69⁺ IFN γ ⁺ CD4⁺, U: Median_{NA} 0%; CD69⁺ IL4⁺ CD4⁺ U: Median_{NA} 0%). Nach Allergen-Stimulation erfolgte bei den Allergikern eine signifikante Zunahme der Produktion von IL-4 (CD69⁺ IL4⁺ CD4⁺, A: Median_A 0,02%); bei den Nichtallergikern erfolgte eine signifikante Zunahme der Produktion von IFN γ (CD69⁺ IFN γ ⁺ CD4⁺, A: Median_{NA} 0,01%). Die stärkste Zunahme zeigte sich nach SEB-Stimulation als Positivkontrolle, wobei die Produktion von IL-4 bei den Allergikern (CD69⁺ IL4⁺ CD4⁺, SEB: Median_A 0,38%, Median_{NA} 0,25%), die Produktion von IFN γ bei den Nichtallergikern stärker ausgeprägt war (CD69⁺ IFN γ ⁺ CD4⁺, SEB: Median_A 1,57%, Median_{NA} 2,26%).

Bei den Allergikern erhöhte sich durch Lactobazillen-Stimulation signifikant die Anzahl aktivierter IFN γ ⁺ T-Zellen (CD69⁺ IFN γ ⁺ CD4⁺, LC: Median_A 0,02%), während die

5 Diskussion

5.1 Phänotyp nasaler und peripherer Lymphozyten bei der allergischen Rhinitis

Ziel dieser Arbeit war, T- und B-Zell-Subgruppen im peripheren Blut und in der Nasenschleimhaut von Allergikern und Nichtallergikern vergleichend zu untersuchen. Die hierfür verwendeten Nasenmuscheln stammten von Allergikern, die eine nachgewiesene Sensibilisierung gegenüber Typ-1-Allergenen aufwiesen (positiver Prick-Test und Nachweis von spezifischem IgE) und saisonal rhinokonjunktivale Beschwerden im Sinne einer allergischen Rhinitis äußerten. Bei einigen bestanden zusätzlich anatomische Veränderungen, die zur chronischen Beeinträchtigung der Nasenatmung führten. Die Vergleichsgruppe der Nichtallergiker (negativer Prick-Test, kein spezifisches IgE) gab chronische nasale Atembeschwerden an, die in den meisten Fällen auf anatomische Veränderungen zurückgeführt wurden.

Bisherige Studien zur zellulären Infiltration und Inflammation der Nasenschleimhaut nutzten Methoden wie Nasenausbürstung^[72] (*nasal brushing*), -ausschabung^[73] (*nasal scraping*), nasale Lavage^[74-76] und Schleimhautbiopsien^[16,17,77-82]. Diese Techniken haben den Nachteil, dass nur epitheliale und sehr oberflächlich lokalisierte Zellen untersucht werden können. Wie die Immunhistochemie der Nasenschleimhaut zeigt, sind B- und T-Lymphozyten nicht nur an der epithelialen Grenzschicht lokalisiert, sondern in allen Schichten der Submukosa zu finden. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode entwickelt, die die Untersuchung der Gesamtheit residenter Immunzellen der Nasenschleimhaut ermöglicht.

Als neuartige Methode wurden die nasalen Zellen mit einem ausschließlich mechanischen Prinzip aus der Nasenschleimhaut separiert. Andere Techniken wie eine enzymatische Herauslösung aus dem Zellgewebsverband wurden vermieden, um eine mögliche Beeinflussung des Lymphozyten-Phänotyps gering zu halten. Nachfolgend wurden in dem gewonnenen Nasenzellsuspensat die Lymphozyten hinsichtlich ihrer Oberflächenmolekülexpression durchflusszytometrisch phänotypisiert. Auf eine Zellseparation mithilfe eines Dichtegradienten wurde bewusst verzichtet, um einen zusätzlichen Zellverlust durch die zytotoxische Wirkung der Ficoll-Lösung zu verhindern. Mithilfe dieser neuartigen Zellseparationsmethode wurden mukosale Lymphozyten aus der Nasenschleimhaut isoliert und mit den Lymphozyten des

peripheren Bluts hinsichtlich ihres Aktivierungs- und Differenzierungszustandes verglichen.

5.1.1 Differenzierung und Aktivierung der T-Zellen

Pro Nasenmuschel wurden mehr T-Zellen als B-Lymphozyten isoliert. Dies ist mit der Beobachtung vereinbar, dass T-Lymphozyten im nasalen Schleimhautgewebe in größerer Anzahl vorkommen als B-Lymphozyten und Makrophagen^[16].

Wie sowohl für Allergiker als auch Nichtallergiker gezeigt wurde, zirkulieren im peripheren Blut naive und Gedächtnis-T-Zellen in einem definierten Verhältnis zueinander. Nach derzeitigem Verständnis differenzieren naive CD45RA⁺ CD45RO⁻ T-Lymphozyten nach Antigenpräsentation in den Lymphgeweben zu antigenspezifischen CD45RA⁻ CD45RO⁺ Gedächtnis-T-Zellen^[22]. Letztere müssen selektiv ins periphere Gewebe des Effektororgans migrieren, um beispielsweise im Rahmen allergischer Reaktionen immunologische Funktionen zu erfüllen^[83].

Entsprechend vorangegangener Studien, die bei der allergischen Rhinitis eine Gewebsinfiltration mit CD45RO⁺ (*memory*) und CD25⁺ (aktivierten) CD4⁺ T-Lymphozyten zeigten^[16,17,80,84,85], wurden in der vorliegenden Arbeit aus der Nasenschleimhaut hauptsächlich stark aktivierte CD69⁺ T-Lymphozyten vom Gedächtniszell-Phänotyp (CD45RO⁺) isoliert. Dies impliziert, dass in der Nasenschleimhaut residente Gedächtnis-T-Helferzellen bei der allergischen Rhinitis beteiligt sind. So wurde auch für CD45RO⁺ T-Zellen aus der Nasenschleimhaut von Allergikern gezeigt, dass sie hauptsächlich Th2-Zytokine wie IL-4 und IL-5 produzieren, und kaum sogenannte Th1-Zytokine wie IFN γ ^[85]. Diese Beobachtung passt zu der Vorstellung, dass im Rahmen allergischer Erkrankungen das Th1/Th2-Gleichgewicht zugunsten der Th2-Antwort verschoben ist^[18] und allergenspezifische Th2-Gedächtnis-Zellen durch ihr Zytokinprofil lokal einen positiven Feedback-Mechanismus auf die Erhaltung der allergischen Immunantwort ausüben^[13].

Verschiedene Adhäsionsmoleküle, die zusammen mit Botenstoffen an der Rekrutierung zirkulierender Immunzellen in die Effektororgane beteiligt sind, sind in der Nasenschleimhaut bei der allergischen Rhinitis heraufreguliert, so beispielsweise das E-Selektin^[6,8]. Der Hauptligand für E-Selektin ist das CLA-Molekül, das als *skin-homing*-Rezeptor selektiv auf zirkulierenden Gedächtnis-T-Zellen exprimiert wird^[86]. Die CLA-E-Selektin-Interaktionen vermitteln die endotheliale Adhäsion und das Abrollen der T-Lymphozyten entlang des Endothels und nachfolgend die Penetration ins periphere

inflammatorische Gewebe. Bei der Immunpathogenese der atopischen Dermatitis, die in den Formenkreis der IgE-vermittelten Hauterkrankungen einzuordnen ist, wird CLA eine wichtige Rolle zugeschrieben. So wurden die dermale Infiltration durch allergenspezifische CLA⁺ Th2-Zellen^[87] gezeigt sowie allergenspezifische Immunantworten für CLA⁺ zirkulierende Gedächtnis-T-Zellen^[88].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von CLA auf T-Zellen untersucht, um der Frage nachzugehen, ob CLA auch bei der allergischen Rhinitis als *homing*-Rezeptor für die Mukosa-selektive Migration von Gedächtnis-T-Zellen eine Rolle spielt. Bei den untersuchten Patienten waren anamnestisch keine Manifestationen einer atopischen Dermatitis bekannt.

Wie in vorangegangenen Studien beschrieben^[89,90], wurden zwischen Allergikern und Nichtallergikern keine Unterschiede in der CLA-Expression peripherer T-Lymphozyten gefunden. Im Gegensatz zur atopischen Dermatitis, bei der eine CLA-Expression für mehr als 85% der inflammatorischen dermalen T-Lymphozyten gezeigt wurde^[89], wurde in der vorliegenden Arbeit bei der allergischen Rhinitis keine Anreicherung CLA⁺ T-Zellen in der Nasenschleimhaut nachgewiesen. Dies führt zur Annahme, dass bei der IgE-vermittelten Inflammation der Nasenschleimhaut CLA nicht als *homing*-Rezeptor für gewebsspezifische Gedächtnis-T-Zellen fungiert. Auch eine rasche CLA-Herabregulation auf den residenten Gedächtnis-T-Zellen nach erfolgtem *mucosal-skin-homing* kann nicht ausgeschlossen werden. Möglicherweise spielen aber andere Adhäsionsmoleküle eine übergeordnete Rolle wie beispielsweise VCAM-1, welches ebenfalls auf Endothelzellen bei der allergischen Inflammation heraufreguliert wird^[6,8].

5.1.2 Die Rolle von IgE

IgE bindet an die Membran allergenspezifischer B-Lymphozyten via CD23 (FcεRII)^[13,14]. CD23 spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation der IgE-Produktion und damit bei der Entstehung und der Aufrechterhaltung der allergischen Inflammation^[27]. Bei Typ-I-Allergien beobachtet man eine verstärkte CD23-Expression auf peripheren B-Lymphozyten und Monozyten, welche durch Zytokine wie IL-4 und IFN γ moduliert wird^[27,91,92]. Assoziiert sind damit erhöhte Serum-IgE-Spiegel^[13,27,91]. Entsprechend wurde in der vorliegenden Arbeit bei den Allergikern eine verstärkte CD23-Expression auf peripheren B-Zellen ermittelt, die möglicherweise aus dem gestörten Gleichgewicht von IFN γ und IL-4 und erhöhten Serum-IgE-Spiegeln resultiert.

Der Nachweis mukosaler CD23+ B-Zellen lässt vermuten, dass residente aktivierte B-Lymphozyten an der lokalen IgE-abhängigen Antigenpräsentation beteiligt sind und regulatorische Funktionen bei der IgE-Synthese übernehmen^[13,27]. So ist bekannt, dass CD23 in der Membran von B-Lymphozyten an *human leukocyte antigen* (HLA)-DR gebunden ist^[93] und damit T-B-Zell-Interaktionen bei der Antigenpräsentation stabilisiert. Da die Antigenpräsentation via CD23 eher isotypen- als antigenspezifisch ist, werden die Antigene präsentiert, die an IgE gebunden sind^[94]. Damit stimuliert CD23 hauptsächlich Immunantworten auf Allergene und fördert die IgE-abhängige T-Zellaktivierung.

Der in der vorliegenden Arbeit erbrachte Nachweis nasaler IgE-beladener B-Zellen deckt sich mit vorangegangenen Studien, die eine Anreicherung IgE+ B-Zellen^[13,82,95] und IgE+ Plasmazellen^[13,82] in der Nasenschleimhaut symptomatischer Patienten mit allergischer Rhinitis zeigten. In jüngster Zeit häufen sich Hinweise, dass in der Nasenschleimhaut eine lokale allergenspezifische IgE-Synthese stattfindet. So gelang für Nasen- und Lungenschleimhaut von Heuschnupfen- und Asthmapatienten durch *in-situ*-Hybridisierung der Nachweis von B-Zellen, die mRNA für die ϵ -Kette von IgE bilden^[96,97]. Weiterhin wurde nach Ex-vivo-Allergenexposition für nasale B-Zellen ein lokal induzierbarer Klassenwechsel zu IgE gezeigt^[20,98], der durch lokale *de-novo*-Produktion von IL-4 und IL-13 gefördert wurde^[20]. T-Zellen und Mastzellen stellten dabei die wahrscheinlichste Quelle für die Zytokinproduktion dar^[98]. Kürzlich zeigten Takhar *et al.*, dass bei der allergischen Rhinitis der lokale B-Zell-Klassenwechsel zu IgE nach In-vivo-Allergenexposition stimulierbar ist^[99]. Aus diesem Kontext erschließt sich ein positiver Feedback-Mechanismus zwischen Mastzellen, B-Lymphozyten und Th2-Zellen hinsichtlich der lokalen IgE-Synthese, der zur Amplifizierung der vorbestehenden IgE-Antwort und damit zur Aufrechterhaltung der allergischen Inflammation beiträgt.

Bei Heuschnupfen-Patienten findet die IgE-Synthese in der Nasenschleimhaut auch außerhalb der Pollensaison statt^[78]. Das Überleben der IgE-beladenen B-Zellen in dieser allergenfreien Phase wird möglicherweise durch die Heraufregulation von CD23, welche durch IL-4 stimuliert wird, und die Abspaltung von sCD23 gefördert. sCD23 kann über Bildung eines Heterotrimers mit mIgE und CD21 die B-Zellproliferation fördern^[13] und so die lokale allergenspezifische IgE-Produktion aufrechterhalten. Dass das in der Nasenschleimhaut von Allergikern nachweisbare IgE zu einem größeren Anteil als Serum-IgE allergenspezifisch ist, wurde nachgewiesen^[78,82,100-102]. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die IgE-Beladung nasaler B-Lymphozyten deutlich größer ist

als bei den peripheren B-Zellen. Interessant ist auch, dass nahezu alle nasalen CD23+ B-Zellen mIgE tragen, wohingegen im peripheren Blut trotz erhöhter CD23-Expression nur ein kleiner Anteil der B-Zellen mIgE aufweist. Da die Gewebeproben außerhalb der Pollensaison gewonnen wurden, impliziert dies die Anreicherung aktivierter allergenspezifischer B-Zellen in der Nasenschleimhaut, die auch in Abwesenheit allergener Stimuli zur Aufrechterhaltung der lokalen IgE-Produktion und des chronisch-inflammatorischen Zustandes beitragen.

Interessanterweise zeigen die Ergebnisse, dass die CD23-Expression nasaler B-Zellen geringer war als bei den peripheren B-Lymphozyten. Dies erscheint widersprüchlich, wenn man davon ausgeht, dass in der Nasenschleimhaut eine lokale IgE-Synthese sowie eine Heraufregulation von CD23 unter dem Einfluss von IgE und IL-4 stattfinden. Eine Erklärung wäre der mangelnde Allergenstimulus, da die Rekrutierung asymptomatischer Patienten außerhalb der Pollensaison erfolgte. Aktivierte CD23+ B-Zellen würden demzufolge nach In-vivo-Allergenexposition aus dem peripheren Blut ins Nasenschleimhaut-Gewebe nachwandern oder weitere residente B-Zellen würden durch Allergenkontakt aktiviert werden. Kürzlich fanden Horiguchi *et al.* auch vermehrt CD23+ B-Zellen in der Nasenschleimhaut symptomatischer Patienten mit perennialer allergischer Rhinitis, bei denen eine permanente Allergenexposition angenommen werden kann^[103]. Ein anderer Denkansatz wäre, dass Allergen auch einen Verlust von CD23 auf B-Zellen und darüber die Differenzierung in einen anderen Phänotyp induzieren könnte, beispielsweise zu Plasmazellen, die folglich eine lokale Quelle für die IgE-Produktion darstellen könnten. Unterstützt wird dies durch die Beobachtung, dass in Gewebeschnitten allergischer Rhinitiker nach In-vivo-Allergenprovokation eine Abnahme nasaler CD23+ B-Zellen erfolgte^[79].

5.1.3 Die Bedeutung kostimulatorischer Moleküle

Die kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 und ihre Liganden CD28/CD152 spielen eine entscheidende Rolle für T-B-Zell-Interaktionen. Sie liefern das zweite Signal für eine suffiziente T-Zellaktivierung. CD80 und CD86 werden nach Aktivierung auf B-Zellen heraufreguliert und fördern im Zusammenspiel mit CD28 auf T-Zellen das T-Zellüberleben und die Zytokinsekretion. CD86 scheint die Entstehung von Th2-Zellen zu fördern, während CD80 die Produktion von Th1-Zytokinen verstärkt^[26]. CD152, welches auch als *cytotoxic T-lymphocyte antigen-4* (CTLA-4) bezeichnet wird, werden herunterregulierende Eigenschaften hinsichtlich der T-Zellaktivierung zugeschrieben;

entweder durch Konkurrenz mit CD28 um die Liganden oder durch Apoptoseinduktion^[104]. Damit spielt es eine Rolle bei der Induktion peripherer Toleranz^[105].

Die ermittelten Daten zeigen einerseits, dass die jeweilige Expression der kostimulatorischen Moleküle (CD80 auf B-Zellen, CD86 auf B-Zellen, CD152 auf T-Zellen) ähnlich stark ist, andererseits dass es zwischen Allergikern und Nichtallergikern keine signifikanten Unterschiede gibt. Letzteres ist möglicherweise der mangelnden Allergen-Exposition zuzuschreiben, da außerhalb der Pollensaison untersucht wurde. Denn Hattori *et al.* stellten eine erhöhte CD86-Expression auf nasalen B-Zellen bei stark symptomatischen Patienten mit perennialer allergischer Rhinitis fest und zusätzlich eine CD86-Heraufregulation nach In-vivo-Allergenprovokation^[77]. Entsprechend den hier ermittelten Daten zeigten diese Autoren auch, dass es bei der perennialen allergischen Rhinitis in Nasenschleimhaut-Gewebeschnitten keine Unterschiede zwischen der CD80- und CD86-Expression gibt, was suggeriert, dass beide kostimulatorischen Moleküle an der Pathogenese der allergischen Rhinitis beteiligt sind. Dass zusätzlich nach Allergenprovokation eine Heraufregulation von CD80/CD86 und den Liganden CD28/CD152 in der Nasenschleimhaut allergischer Rhinitiker beobachtet wurde^[77], impliziert die Bedeutung des CD28/CD152-CD80/CD86-Ligandensystems für die lokale Amplifikation allergenspezifischer Immunantworten.

5.1.4 Die idiopathische Rhinitis als „lokalierte“ Form der allergischen Rhinitis?

Die idiopathische Rhinitis wird definiert als intrinsische Rhinitis, für die sich keine immunologische, mikrobielle, pharmakologische, hormonelle oder andere Ursache finden lässt^[106,107]. Klinisch wird sie nach dem Ausschlussprinzip diagnostiziert und imponiert als nichtallergische perenniale Rhinitis ohne Hinweise für eine atopische Prädisposition^[108].

In jüngster Zeit häufen sich jedoch Hinweise auf die Existenz einer „lokalen Allergie“ bei der idiopathischen Rhinitis - auch „Entopie“ genannt. Bei den betroffenen Patienten treten nach Allergenkontakt die Symptome einer allergischen Soforttypreaktion auf, ohne dass sie die Kriterien für Atopie erfüllen, was durch negative Haut-Prick-Testungen und normale Serum-IgE-Spiegel angezeigt wird^[106,108]. Dabei wurden für die idiopathische Rhinitis Schlüsselemente der IgE-vermittelten Th2-Immunantwort in der Nasenschleimhaut nachgewiesen. So wurde bei nicht-atopischen Rhinitikern allergenspezifisches IgE im Nasensekret^[100] und in der Nasenschleimhaut^[109] gefunden.

Histologisch wurden Schleimhautveränderungen wie die Ansammlung von Mastzellen, Eosinophilen und IgE+ Zellen - vergleichbar den Veränderungen bei der allergischen Rhinitis - gezeigt^[107]. Dass die Nasenschleimhaut die denkbar nötigen Bedingungen für die Ausbildung einer „lokalen Allergie“ entwickeln kann, implizieren unter anderem die nachgewiesene Fähigkeit der Nasenschleimhaut zur lokalen IgE-Produktion^[95-97], der Nachweis eines lokal induzierbaren IgE-Klassenwechsels der nasalen B-Zellen^[20,98,99] sowie der Nachweis von allergenspezifischem IgE^[78,82,101,102]. In einer klinischen Studie von Carney *et al.* reagierte ein Teil nichtallergischer idiopathischer Rhinitiker nach Allergenprovokation mit nasalen Symptomen, die vergleichbar waren mit den Reaktionen bei den allergischen Rhinitikern^[108]. Auch hier fehlten bei den idiopathischen Rhinitikern die systemischen Zeichen für Atopie.

Ob alle Patienten mit idiopathischer Rhinitis letztendlich an einer „lokalen Allergie“ leiden, die sich systemisch nicht manifestiert, oder ob dieses Phänomen nur einen Teil der bisher als idiopathisch eingestuften Rhinitiker betrifft, bleibt nach derzeitigem Kenntnisstand spekulativ. Zumindest würden nasale Provokationstestungen zur Abgrenzung dieser Formen beitragen.

Dass in der vorliegenden Arbeit stark aktivierte T-Gedächtniszellen sowie aktivierte CD23+ und IgE+ B-Zellen in der Nasenschleimhaut von sowohl Allergikern als auch Nichtallergikern gefunden wurden, ist mit dem Konzept der lokalisierten Form der allergischen Rhinitis erklärbar^[100,107-109]. So ist das Fehlen signifikanter Unterschiede zwischen Allergikern und Nichtallergikern möglicherweise der Heterogenität der Kontrollgruppe (Nichtallergiker) zuzuschreiben. Die Kontrollgruppe setzt sich aus Individuen zusammen, die perenniale Nasenatembeschwerden angaben, die auf angeborene oder erworbene anatomische Veränderungen zurückgeführt wurden. Systemische Atopiezeichen fehlten (negativer Haut-Prick-Test und normale Spiegel von Gesamt- und spezifischem IgE). Nasale Provokationen wurden nicht durchgeführt, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass bei einigen Patienten eine „lokale Allergie“ vorlag. Möglicherweise dominieren diese Individuen sogar innerhalb der Kontrollgruppe, da nur von Patienten mit ausreichenden nasalen Infiltraten suffiziente Mengen residenter Immunzellen zur durchflusszytometrischen Analyse isoliert werden konnten.

Des Weiteren zeigte sich bei den nasalen Provokationen von Carney und Kollegen, dass mehr als die Hälfte der Patienten mit idiopathischer Rhinitis positiv auf Hausstaubmilben-Allergene reagierten, jedoch weniger als 10% auf andere Allergene

wie Gräserpollen oder Tierhaare^[108]. Möglicherweise ist dies mit der Cysteinprotease-Aktivität von Der p 1 – dem Hauptallergen von *D. pteronyssinus* – erklärbar. Durch die proteolytische Aktivität werden die *tight junctions* des Schleimhautepithels zerstört. Dadurch wird die Schleimhautpenetration des Allergens und nachfolgend die Antigenpräsentation für T-Zellen erleichtert^[11]. Die Abspaltung von sCD23 wird üblicherweise durch Metalloproteinasen katalysiert, kann jedoch auch durch andere Proteasen induziert werden. So geschieht dies auch durch die Der p 1-Protease, die ein 16-kDa-Fragment von CD23 abspaltet und darüber die IgE-Synthese fördert^[27]. Offenbar besitzt also das Hausstaubmilbenallergen Der p 1 über seine proteolytische Aktivität besondere Eigenschaften: einerseits die Erleichterung der eigenen Allergenpenetration und -präsentation, andererseits die Auslösung und Aufrechterhaltung einer auf mukosaler Ebene vermittelten, lokalen Gewebs-Entzündungskaskade^[108]. Auch in der vorliegenden Arbeit ist eine „Entopie“ mit lokaler Allergie insbesondere gegenüber Hausstaubmilbenallergenen denkbar. Denn bekanntermaßen verursachen Hausstaubmilbenallergene aufgrund ihrer Allergenpersistenz ganzjährig Symptome und so berichteten auch alle Individuen der Kontrollgruppe (Nichtallergiker) über perenniale Nasenatembeschwerden. Für zukünftige Untersuchungen sind also zur Differenzierung der „lokalen Allergie“ nasale Provokationstestungen unverzichtbar, da nur so eine Allergensensibilisierung bei ausbleibender systemischer Manifestation messbar ist. Auch sollten nasale Provokationen zukünftig zur Diagnosesicherung bei Rhinitis unklarer Genese durchgeführt werden.

5.2 Einfluss von *Lactobacillus acidophilus* auf die Lymphozyten des peripheren Bluts und der Nasenschleimhaut von Allergikern und Nichtallergikern

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit befasste sich mit der immunmodulatorischen Wirkung von kälteinaktiviertem probiotischem *Lactobacillus acidophilus* auf T- und B-Lymphozyten von Allergikern und Nichtallergikern. Dabei wurden die Individuen mit nachweisbarer systemischer Manifestierung einer Typ-1-Sensibilisierung den Allergikern zugeordnet; die Nichtallergiker bestehen aus Individuen, bei denen systemische Atopie-Zeichen fehlten. Untersucht wurden sowohl die direkten immunmodulatorischen Effekte auf Lymphozyten des peripheren Bluts als auch auf residente Nasenschleimhaut-Lymphozyten. Mithilfe des In-vitro-Versuchsaufbaus sollte im Falle der PBMC-Stimulation die mögliche systemische Wirkung der Probiotika untersucht werden, wie sie beispielsweise nach oraler Applikation und nachfolgender Beeinflussung der Darmmukosa-assoziierten Immunzellen denkbar wäre. Um eine direkte Beeinflussung der bei der allergischen Immunantwort am Ort der allergischen Reaktion beteiligten Lymphozyten untersuchen zu können, wurden die bakteriellen Stimulationen auch mit isolierten Nasenschleimhaut-Lymphozyten durchgeführt. Die In-vitro-Kultivierung und Stimulation isolierter Nasenschleimhaut-Zellsuspensionen ermöglicht somit nicht nur die phänotypische sondern auch die funktionelle Charakterisierung mukosaler Lymphozyten. Dieses Kultivierungssystem ist noch als störanfällig und verbesserungswürdig anzusehen und liefert in der vorliegenden Arbeit Ergebnisse, die kritisch zu bewerten sind und durch zukünftige Untersuchungen und Modifizierungen des Versuchsaufbaus an Reliabilität gewinnen würden. So führten die Untersuchungen an den nasalen B-Zellen nicht zu den erwarteten auswertbaren Ergebnissen aufgrund eines häufig beobachteten B-Zell-Verlusts, vor allem nach bakterieller Stimulation. Auch setzte die Nasenschleimhaut-Zellseparationsmethode aufgrund geringer Zelldichte den Zytokinuntersuchungen ihre Grenzen, so dass der Einfluss von Lactobazillen auf die Th1/Th2-Balance nur für die Zellen des peripheren Bluts ermittelt werden konnte. Dennoch weisen die ermittelten Daten aus den nasalen Stimulationen auf das immunmodulatorische Potenzial von probiotischem *Lactobacillus acidophilus* hin. Durch Optimierung der Methode könnte in weiteren Untersuchungen die Aussagekraft der Daten verbessert werden. In der nachfolgenden Diskussion über

die immunmodulatorische Wirkung von *Lactobacillus acidophilus* wird daher der Schwerpunkt auf die Beeinflussung peripherer B- und T-Lymphozyten gelegt.

Die Lactobazillen wurden durch Kälte inaktiviert und lagen somit für die Stimulationsversuche in nicht lebensfähiger Form vor^[70,71]. Auf diese Art und Weise konnte in den hier durchgeführten Untersuchungen eine Konkurrenz stoffwechselaktiver Bakterien mit den kultivierten humanen Immunzellen vermieden werden. Demnach sind die beobachteten Effekte primär auf die bakteriellen Zellwandbestandteile und nicht auf etwaige mikrobielle Stoffwechselprodukte zurückzuführen.

5.2.1 Aktivierungszustand der T-Lymphozyten

Dass Probiotika immunstimulatorische Eigenschaften besitzen ist bereits vielfach dokumentiert worden^[44,61,63,110-116]. An der Heraufregulation von CD69 auf peripheren T-Lymphozyten bestätigt sich das Aktivierungspotenzial von *Lactobacillus acidophilus*. Es zeigt, dass eine unspezifische Aktivierung der T-Lymphozyten durch Lactobazillen erfolgt, da CD69 mit rascher Kinetik nach Lymphozytenaktivierung exprimiert wird und im Rahmen von Genexpression und Zellproliferation an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt zu sein scheint^[117,118].

Dass bei den nasalen Lymphozyten keine weitere CD69-Heraufregulation nach bakterieller Stimulation erfolgt, steht nicht im Widerspruch zu den PBMC-Daten, da die nasalen T-Lymphozyten bereits voraktiviert waren. Möglicherweise geht die starke T-Zell-Voraktivierung mit dem fast ausschließlichen Vorherrschen des T-Gedächtniszell-Phänotyps einher, den die residenten spezifisch geprägten T-Helferzellen nach Migration ins Effektororgan unter dem Einfluss immer wiederkehrender Immunreize innehaben.

Interessant ist die Beobachtung, dass sowohl im peripheren Blut als auch in der Nasenschleimhaut die T-Lymphozyten der Allergiker durch alle Stimuli stärker aktivierbar sind als die T-Zellen der Nichtallergiker. Dahinter lässt sich für T-Zellen von Allergikern ein stärkeres Potenzial zur Stimulierbarkeit vermuten. Diese Beobachtung sollte in weiteren Untersuchungen systematisch geprüft werden.

5.2.2 TH1/TH2-Balance

Für allergische Erkrankungen wird im Allgemeinen ein Überwiegen der Th2-Immunantwort gegenüber der Th1-Immunantwort angenommen, welches mit einer erhöhten Produktion von Th2-Zytokinen einhergeht und die IgE-Produktion sowie

Rekrutierung und Aktivierung von weiteren inflammatorischen Zellen wie B-Zellen, Mastzellen, Basophilen und Eosinophilen fördert. Differenzierte allergenspezifische Th2-Helferzellen spielen hierbei eine entscheidende Rolle, indem sie essenzielle Signale für die IgE-Produktion liefern. Da davon ausgegangen werden kann, dass tatsächlich nur aktivierte T-Helferzellen als Effektorzellen wirken und immunologische Funktionen erfüllen, wurden ausschließlich die CD69+ T-Helferzellen hinsichtlich ihrer Th1/Th2-Differenzierung betrachtet. Da gezeigt wurde, dass das Zytokinprofil weder einem Th1- noch einem Th2-Muster entspricht, sondern dass eher der eine Pfad auf Kosten des anderen Pfades überwiegt^[18], ist insgesamt das Verhältnis aus Th1- und Th2-Zellen zu bewerten. Zwar definieren sich die T-Helferzellen hinsichtlich ihrer Differenzierung über ihr Zytokinmuster, jedoch ist auch das gesamte Zytokinmilieu für die Ausbildung einer allergischen Immunantwort entscheidend. Da auch andere Immunzellen wie beispielsweise Mastzellen Th2-Zytokine sezernieren, lässt die Bestimmung der T-Helferzellen-Zytokinproduktion keine definitiven Rückschlüsse auf das Zytokinmilieu zu. Zytokinbestimmungen im Kulturüberstand hätten für diese erweiterte Fragestellung zusätzliche Aussagen geliefert.

Erwartungsgemäß förderte bei den Allergikern die Allergenstimulation die Ausbildung einer Th2-Immunantwort mit Zunahme der basal messbaren Produktion von IL-4. Dies verdeutlicht das verlagerte Gleichgewicht zugunsten der Th2-Antwort im Rahmen von Typ-1-Sensibilisierungen. Bei den Nichtallergikern war in Reaktion auf die Allergenstimulation eine deutliche Th1-Antwort mit erhöhter Produktion von IFN γ detektierbar. Dass der Allergenstimulus bei Nicht-Sensibilisierten überhaupt zur Aktivierung des Immunsystems führt, mag an der Kostimulation via anti-CD28 liegen, welches hier zusammen mit dem allergenen Antigen zur Aktivierung von Th1-Helferzellen führt.

Superantigene wie SEB aktivieren auf MHC-Haplotyp-unabhängige Weise bis zu 30% der T-Zellen, wohingegen die übliche T-Zellaktivierung antigenspezifisch und MHC-gebunden abläuft und darüber wesentlich weniger T-Zellen aktiviert werden^[119]. So lassen sich durch Superantigene Immunantworten potenzieren. Hinsichtlich der durch Superantigene induzierten Zytokinproduktion unterscheiden sich Allergiker und gesunde Individuen insofern, als dass die Produktion von IFN γ bei Allergikern reduziert ist und damit der Th2-Shift gefördert wird^[119]. Die Th1-Polarisierung nach SEB-Stimulation war auch hier bei den Allergikern wesentlich schwächer ausgeprägt, was das

unterschiedliche Th1/Th2-Gleichgewicht bei Allergikern und Nichtallergikern verdeutlicht.

Interessant ist, dass nach Lactobazillen-Stimulation bei den Allergikern ein Th1-Shift erfolgt, auf den die in klinischen Studien beobachteten Effekte von oral applizierten Lactobazillen zurückgeführt werden könnten^[1,39,51,53,56,57,59]. Vorangegangene In-vitro-Untersuchungen haben diese Th1-verstärkenden Einflüsse der Lactobazillen ebenfalls ermittelt. So induzierten Lactobazillen Th1-Zytokine wie IL-12^[61-63,120], IFN γ ^[61,62,120] und IL-18^[61,120], während die Ausschüttung von Th2-Zytokinen wie IL-4^[61,64,120], IL-5^[64] und IL-13^[120] gehemmt wurde. Auch wurde in einigen klinischen Untersuchungen oder Mausmodellen der Einfluss der Lactobazillen auf immunologische Parameter nach oraler Applikation nachgewiesen. So wurde in mit Concanavalin A stimulierten Milz-Immunezellen von gesunden Mäusen nach Lactobazillen-Fütterung eine erhöhte Produktion von IFN γ ermittelt, während die Produktion von IL-4 sich nicht signifikant änderte^[112]. Der gleiche Effekt wurde nach einmonatiger, täglicher Einnahme von 450 g Joghurt, der *Lactobacillus acidophilus* beinhaltet, in der stimulierten Lymphozyten-Kultur von allergischen Asthmatikern beobachtet^[52]. Nach Einnahme von 450 g Joghurt pro Tag über 4 Monate war bei allergischen Rhinitikern in der stimulierten Lymphozyten-Kultur nicht nur eine erhöhte Produktion von IFN γ , sondern auch eine verringerte Synthese von IL-4 nachweisbar^[56]. Jedoch wurde in einigen klinischen Studien die Beeinflussung der Zytokinproduktion durch orale Lactobazillen-Gabe nicht gesehen^[57,59].

Dass jedoch in einigen klinischen Studien eine nur geringe Symptomverbesserung nach oraler Lactobazillen-Gabe zu sehen war^[52,55], könnte der ausbleibende Th1-Shift nach Stimulation mit Lactobazillen plus Allergen reflektieren. Auch wenn die anti-allergische Wirkung der Lactobazillen nicht in allen klinischen Studien reproduzierbar ist^[52,55], wofür von Kritikern das Studiendesign und die mangelhafte Vergleichbarkeit der Daten verantwortlich gemacht werden^[121], so wurde das anti-allergische Potenzial durch die Beeinflussung der Th1/Th2-Balance in allergenstimulierten Lymphozyten-Kulturen gezeigt^[64,68]. Beispielsweise führte die Präinkubation mit Lactobazillen zur verminderten Produktion von IL-4 und IL-5 in allergenstimulierten PBMCs von Allergikern^[64]. In Milzzellen von Ovalbumin-sensibilisierten BALB/c-Mäusen war nach Fütterung mit *Lactobacillus casei* eine verstärkte Produktion von IFN γ und IL-12 sowie reduzierte Synthese von IL-4 und IL-5 zu sehen, nachdem *in vitro* mit Ovalbumin restimuliert wurde^[68].

Dass die Lactobazillen-Stimulation wiederum bei den Allergikern zur stärkeren Th1-Antwort führt als bei den Nichtallergikern, lässt vermuten, dass bei Typ-1-Sensibilisierten die immunmodulatorischen Effekte, die durch Umkehr der Th-Polarisierung entstehen, stärker ausgeprägt sind. Das immunstimulatorische Potenzial der Lactobazillen zeigt sich auch daran, dass in der Kontrollgruppe ohne Bevorzugung des Differenzierungsstatus Th1-Zellen gleichermaßen wie Th2-Zellen aktiviert wurden.

5.2.3 CD23-Expression und mögliche Effekte auf die IgE-Regulation

In Anwesenheit der Lactobazillen wurde CD23 bei den Allergikern herabreguliert. Diese Beobachtung erklärt - zusammen mit dem ermittelten Zytokinmuster - die klinisch gefundenen anti-allergischen Effekte der probiotischen Bakterien^[1,39,51,53,56,57,59]. Denn so führen erhöhte Konzentrationen von IFN γ und erniedrigte Konzentrationen von IL-4 zur verminderten CD23-Expression und Hemmung der IgE-Synthese^[27,91,92]. Die klinische Relevanz der zugrunde liegenden Mechanismen wurde bereits in therapeutischen Ansätzen zur Behandlung der atopischen Dermatitis gezeigt^[122,123]. Auch hemmt IFN γ die Produktion von CD23-mRNA und die Abspaltung von sCD23 bei menschlichen B-Zellen^[92]. sCD23, welches in der vorliegenden Arbeit nicht gemessen wurde, ist in der Lage, durch Freisetzung von TNF α , IL-1 β und IL-6 inflammatorische Reaktionen zu verstärken^[27]. Die verminderte Abspaltung von sCD23, wie sie bei einem Th1-Shift zu erwarten ist, bewirkt eine Hemmung der IgE-Synthese^[27]. Hier kam es in Anwesenheit der Lactobazillen bei den Allergikern zu einem Th1-Shift mit verminderter CD23-Expression.

Bisher gibt es jedoch weder klinische noch experimentelle Vergleichsstudien, die den Einfluss von Lactobazillen auf die IgE-Regulation via CD23 untersucht haben. Ob also die *in vitro* gefundene CD23-Herabregulation nach Lactobazillen-Stimulation im Zusammenspiel mit dem beobachteten Th1-Shift tatsächlich *in vivo* zur IgE-Herabregulation führt, muss Gegenstand weiterer Untersuchungen bleiben. Zumindest ist auch bisher in keiner klinischen Studie die Abnahme des Gesamt- oder spezifischen IgEs durch die orale Zufuhr von Lactobazillen nachgewiesen worden^[52,56,59]. Dass Lactobazillen zur Abnahme der Serum-IgE-Konzentration führen können, wurde jedoch in Mausmodellen mit Ovalbumin-sensibilisierten, Th2-polarisierten Mäusen gezeigt^[67-69]. Sogar nach In-vitro-Restimulation mit Ovalbumin sezernierten die Milzzellen der mit *Lactobacillus-casei*-gefütterten Mäuse weniger IgE als in der Kontrollgruppe^[68]. In der vorliegenden Arbeit wurde nach gleichzeitiger Stimulation mit Lactobazillen und

Allergen zumindest keine CD23-Herabregulation gesehen, die dann folglich nach gegenwärtigem Konzept der IgE-Regulation eine IgE-Hemmung bewirkt hätte. Dass durch Lactobazillen plus Allergen eine CD23-Heraufregulation erfolgte, lässt sich auf den Th2-Shift mit erhöhter Produktion von IL-4 zurückführen und scheint die geringe Symptomverbesserung in einigen klinischen Studien nach oraler Lactobazillen-Gabe zu erklären^[52,55].

Dass SEB bei den Allergikern zur stärkeren CD23-Heraufregulation führte als bei den Nichtallergikern, betont das verlagerte Gleichgewicht zugunsten der Th2-Antwort, welches sich bei Erkrankungen des atopischen Formenkreises wiederfindet. So spielen Superantigene als Produkte von *Staphylococcus aureus* bei der chronischen Inflammation atopischer Läsionen insofern eine pathogenetische Rolle, als dass sie die Zytokin-Dysbalance und die IgE-Synthese fördern^[119]. Sie verstärken den Th2-Shift durch verringerte Produktion von IFN γ . Da die Produktion von IFN γ bei Atopikern *per se* reduziert ist, nimmt man eine unterentwickelte Fähigkeit zur *Staphylococcus-aureus*-Abwehr und somit die Persistenz der Superantigene an.

Einen ähnlichen pathogenetischen Hintergrund vermutet man bei der Polyposis nasi, die zwar nicht gehäuft bei Atopikern vorkommt, jedoch bei diesen auffallend häufiger rezidiert^[124]. Bei der Polyposis nasi findet man histologisch eine starke Infiltration durch inflammatorische Zellen wie eosinophile Granulozyten. Wie der Nachweis hoher Gewebekonzentrationen zeigt, scheint IgE ein wichtiger Mediator zu sein. Offenbar ist die lokale IgE-Produktion bei Atopikern verstärkt und führt über die Heraufregulation von Fc ϵ RI auf Mastzellen zur chronischen Mastzellaktivierung und so bei Atopikern leichter zum Krankheitsrezidiv. Zusätzlich vermutet man, dass Enterotoxin-bildende Staphylokokken, die bei Atopikern aufgrund der gestörten Abwehr leichter persistieren, über eine Superantigen-Wirkung lokal eine polyklonale IgE-Bildung mit nachfolgend schwerer eosinophiler Entzündung induzieren. So wurde in einem Großteil eosinophiler Nasenpolypen polyklonales *Staphylococcus-aureus*-Enterotoxin-spezifisches IgE gefunden sowie eine Kolonisierung mit *S. aureus* nachgewiesen^[125].

Dass SEB auf den nasalen B-Zellen der Allergiker eine stärkere CD23-Heraufregulation induzierte, gibt einen Hinweis darauf, dass auch hier - im Gegensatz zu den Nichtallergikern - Th2-Immunantworten dominieren und eine lokale IgE-Produktion erfolgt.

5.2.4 Expression von kostimulatorischen Molekülen und Beeinflussung der T-B-Zell-Interaktionen

In der vorliegenden Arbeit führte Allergen bei den PBMCs der Allergiker zur Heraufregulation von CD86. Dieser Effekt wurde für Atopiker bereits nach Allergenstimulation sowie Stimulation mit IL-4 beschrieben^[23,24,126] und betont damit die Rolle von CD86 bei allergischen Th2-dominierten Immunantworten. Auch zeigt es, dass die CD86-Expression durch Zytokine moduliert werden kann. So scheint zur CD86-Heraufregulation die erhöhte Produktion von IL-4 beizutragen, die sich einerseits in der Aktivierung von Th2-Helferzellen niederschlägt, andererseits in der CD23-Heraufregulation und darüber verstärkten IgE-Synthese^[24]. Darüber hinaus wird CD86 gegenwärtig als kostimulatorisches Molekül betrachtet, welches selbst Th2-Immunantworten verstärkt und damit die allergische Inflammation vermittelt^[127,128] und auch an der Induktion der IgE-Synthese beteiligt ist^[129]. Interessanterweise kam es zur CD86-Heraufregulation nach Lactobazillen-Stimulation, bei der es im gleichen Zuge zur verminderten Produktion von IL-4, zur erhöhten Produktion von IFN γ , zur Herabregulation von CD23 und damit zur Th1-Immunantwort kam. Diese CD86-Heraufregulation scheint im Widerspruch zum erwarteten anti-allergenem Potenzial der probiotischen Bakterien zu stehen. Jedoch wurde CD86 in vorangegangenen Studien nicht nur als Th2-förderndes Molekül gesehen, sondern auch im Rahmen von Th1-Antworten diskutiert^[26,104,130,131]. Auch wurde nicht nur für IL-4, sondern auch für IFN γ die CD86-Induktion gezeigt^[104]. Demnach scheint die verstärkte Expression von CD86 nach Lactobazillen-Stimulation weniger im direkten Zusammenhang zur Th1/Th2-Balance zu stehen, als die ubiquitäre immunstimulatorische Wirkung der probiotischen Bakterien zu reflektieren. Denn dies war sowohl bei Allergikern als auch bei Nichtallergikern zu sehen.

Interessant ist, dass CD152 ausschließlich bei den Allergikern durch Lactobazillen heraufreguliert wurde. CD152 wird erst nach Aktivierung auf regulatorischen T-Zellen exprimiert, liefert dann über Hemmung des TZR- und CD28-vermittelten Signalwegs negative Signale und unterdrückt damit die T-Zell-Aktivierung^[105,132,133]. Offenbar scheinen die Lactobazillen zu einer starken T-Zell-Aktivierung zu führen, die nachfolgend ein Gegengewicht via CD152 als Negativ-Regulator erfordert, damit die aktivierten T-Zellen nicht unkontrolliert proliferieren und die T-Zell-Homöostase aufrechterhalten wird^[134]. Weshalb bei den Nichtallergikern keine CD152-Heraufregulation zu sehen war und auch nicht bei den Allergikern nach Stimulation mit

Lactobazillen plus Allergen, obwohl die Lactobazillen in allen Gruppen zur T-Zellaktivierung (gemessen an der CD69-Expression) führten, kann der Kinetik zugrunde liegen, mit der CD152 exprimiert wird. Üblicherweise wird CD152 48 Stunden nach T-Zell-Aktivierung maximal exprimiert^[104]. Da in der vorliegenden Arbeit bereits nach 18 Stunden gemessen wurde, ist zwar eine Tendenz zur CD152-Heraufregulation in der Allergiker-Gruppe erkennbar, jedoch keine definitive Aussage über das Verhalten in den anderen Stimulationen zu treffen.

Möglicherweise ist die Herabregulation von CD80 nach Lactobazillen-Stimulation ebenfalls seiner Kinetik zuzuschreiben. Zumindest erscheint sie widersprüchlich, da die Blockade von CD80 zum Überwiegen von Th2-vermittelten Immunantworten führt^[26,127] und die Lactobazillen in Abhängigkeit vom zusätzlichen Allergen-Stimulus entweder einen Th1- oder Th2-Shift bewirkten. Während CD86 schnell auf B-Lymphozyten induziert wird (Beginn nach 6 Stunden) und sein Maximum nach 18-24 Stunden erreicht, erscheint CD80 erst 24-48 Stunden nach B-Zell-Aktivierung und erreicht frühestens nach 48-72 Stunden sein Maximum^[104,127]. Dieser Aspekt zeigt sich an der schwachen CD80-Expression nach SEB-Stimulation, die einen zu frühen Messpunkt (bereits nach 18 Stunden) hinsichtlich der CD80-Expression impliziert. Des Weiteren lassen einige Studien auch vermuten, dass CD80 – auch weil es erst später nach CD86 heraufreguliert wird – eher neutrale Differenzierungssignale liefert, statt Th1-gerichtete^[24,130,131,135,136]. Demnach wäre vor dem Hintergrund des immunstimulatorischen Potenzials für die Lactobazillen-Stimulationen auch eine Heraufregulation von CD80 zu erwarten. Zumal auf anderen humanen oder murinen APZs die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 durch Lactobazillen-Stimulation induziert wurden^[65-67,120].

In der vorliegenden Arbeit wurde auf den nasalen T-Zellen CD152 bei den Nichtallergikern durch SEB und Lactobazillen plus Allergen signifikant heraufreguliert. Jedoch führte die Inkubation der Nasenschleimhautzellen zur CD152-Herabregulation bei den Nichtallergikern und somit nur relativ dazu zur Heraufregulation in den erwähnten Stimulationen. Bei den Allergikern hingegen wurde CD152 nach Stimulation mit Lactobazillen plus Allergen verringert exprimiert und blieb in allen anderen Stimulationen auf vergleichbarem Level. Offenbar gibt es Unterschiede zwischen den Allergikern und Nichtallergikern bezüglich des Aufrechterhaltens von Immunantworten unter Kulturbedingungen. Denn verglichen mit der CD69-Expression, die bei den

Allergikern auch in allen Stimulationen maximal blieb, scheinen bei den Allergikern unter diesen Kulturbedingungen verstärkt Immunantworten abzulaufen, die demzufolge auch negative Signale via CD152 erfordern. Dass die Inkubation mit Lactobazillen plus Allergen bei den Allergikern in einer CD152-Herabregulation resultiert, könnte somit auch ausbleibende anti-allergische klinische Effekte durch Lactobazillen-Gabe *in vivo* erklären^[52,55]. Denn durch das Fehlen der negativen CD152-vermittelten Signale könnte es zu Th2-betonten Immunreaktionen kommen, die bei den Nichtallergikern durch CD152-Heraufregulation unterdrückt werden. Andererseits wurde mit Mausmodellen für die allergische Rhinitis und das allergische Asthma bronchiale gezeigt, dass die topische AK-Blockade von CD152 zur verminderten Produktion von IL-4^[128,137] und auch zum Ausbleiben allergischer Symptome und verminderten IgE-Spiegeln im Serum führt^[137]. Eine andere Studiengruppe konnte durch gleichzeitige Blockade von CD80 und CD86 während der Effektorphase zeigen, dass teilweise die IgE-Produktion und die nasale Eosinophilen-Inflammation unterdrückt werden^[138]. Damit scheinen die CD28/CD152-CD80/CD86-Interaktionen eine wichtige Rolle in der Effektorphase allergischer Immunantworten - zumindest im Tiermodell - inne zu haben.

Bisher gibt es nur wenige Studien, die die Rolle der kostimulatorischen Moleküle bei der allergischen Rhinitis untersucht haben. So beobachteten Hattori und Kollegen^[77] nach In-vivo-Allergenprovokation eine Zunahme der Expression kostimulatorischer Moleküle ausschließlich bei Allergikern und schlussfolgerten anhand der Kinetik, dass CD80 und CD86 wichtige Funktionen bei der allergischen Späte-Phase-Reaktion ausüben. Im Gegensatz dazu erfolgte in der vorliegenden Arbeit nach Allergenstimulation die Herabregulation von CD86 in der Allergiker-Gruppe und tendenziell die Heraufregulation in der Nichtallergiker-Gruppe. In der Annahme, dass CD86 Immunantworten nach Th2 ausrichtet und damit allergische Immunantworten verstärkt^[23,24,126-129], erscheint diese Beobachtung widersprüchlich und lässt hier die Frage der lokalen Allergie^[100,106,108,109] erneut aufkommen. Wiederum könnte die CD86-Herabregulation nach sowohl Allergen- als auch Lactobazillen-Stimulation Ausdruck dafür sein, dass CD86 nicht streng als Th2-verstärkendes Molekül funktioniert und auch bei Th1-vermittelten Immunantworten eine Rolle spielt^[26,104,130,131]. Die beobachtete Herabregulation von CD80 unter stimulierten Kulturbedingungen ist möglicherweise ein weiterer Hinweis dafür, dass CD80 schnell von der B-Zell-Membran entfernt wird, um erst zu einem späteren Zeitpunkt an der Immunantwort mitzuwirken.

Insgesamt gestaltet sich die Interpretation der kostimulatorischen Moleküle als komplexes Feld, da die unterschiedlichen Kinetiken, die duale Spezifität von CD80 und CD86 für CD28 und CD152 sowie die bisher nicht definitiv geklärte Dichotomie von CD80 *versus* CD86 hinsichtlich der Th-Zell-Differenzierung berücksichtigt werden müssen. Daneben wurden in den letzten Jahren weitere Moleküle identifiziert, die der B7-CD28-Superfamilie angehören, wie *inducible T-cell costimulator* (ICOS), ICOS-Ligand, *programmed death L1* (PD-L1), PD-L2, B7-H3, B7-H4, PD-1 und *T-lymphocyte attenuator-4* (BTLA)^[133]. Ihnen werden neben der Bedeutung für die T-Zell-Aktivierung und Entstehung peripherer Toleranz erweiterte Immunfunktionen zugeordnet. So ist es sicherlich zukünftig von Interesse, beispielsweise die Interaktionen von ICOS und ICOS-Ligand hinsichtlich der hier untersuchten Aspekte näher zu beleuchten. So wurde gezeigt, dass ICOS eine wichtige Rolle beim Ig-Klassenwechsel spielt^[139], insbesondere bei der IgE-Produktion^[140], und in Untersuchungen zu allergischen Atemwegserkrankungen Th2-Effektor-Antworten reguliert^[132,141]. Insbesondere scheint ICOS ein interessantes Zielmolekül zu sein, da es an der Vermittlung von Effektor-Immunantworten beteiligt ist und damit v.a. in der Peripherie für bereits geprägte Lymphozyten eine Rolle spielt, während CD28 und seine Liganden hauptsächlich zum Zeitpunkt der Antigenprägung wichtig sind^[132].

5.2.5 *Lactobacillus acidophilus* für die „Allergieprophylaxe“?

Die ermittelten In-vitro-Daten der vorliegenden Arbeit stützen im Wesentlichen die bisherige experimentelle Datenlage probiotischer Bakterien hinsichtlich ihrer Effekte auf das Immunsystem. Sie liefern Hinweise darauf, dass Lactobazillen neben ihrer immunstimulatorischen Wirkung auch Einflüsse auf das Th1/Th2-Gleichgewicht sowie die IgE-Regulation haben. Ob die experimentell gewonnenen Ergebnisse auch *in vivo* zu den erwarteten Effekten führen, wurde bereits in verschiedenen klinischen Studien und Mausmodellen untersucht.

Maus-Studien haben gezeigt, dass nach Fütterung verschiedenster probiotischer Bakterien entsprechende immunmodulatorische Effekte entstehen, wie die Erhöhung der Phagozyten- und Lymphozyten-Aktivität, die Induktion von Th1-Zytokinen, die Hemmung eines Th2-Zytokinprofils sowie eine IgE-Herabregulation^[67-69,110-112,142]. Diese Daten implizieren, dass es über diese Effekte auch zur langfristigen Hemmung von Hypersensitivitätsreaktionen kommen könnte, die aus einem antigenspezifischen Th1/Th2-Ungleichgewicht resultieren. Die anti-allergische Wirksamkeit der

probiotischen Bakterien auf das humane Immunsystem konnte auch nicht in allen klinischen Studien nachgewiesen werden, weshalb sie sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt auch noch nicht als etablierter Nahrungszusatz zur „Allergieprävention“ durchgesetzt haben. Der fehlende Nachweis der Lactobazillen-Wirkung mag im Einzelfall auch am Studiendesign gelegen haben, welches sich je nach Studiengruppe erheblich unterscheidet. So könnten eine zu kurze Applikationsdauer, eine nicht ausreichende Dosis und die unterschiedlich starke Wirksamkeit der jeweiligen Lactobazillen-Stämme auf das Immunsystem eine Rolle gespielt haben. Dass sich die Lactobazillen-Stämme hinsichtlich ihres immunmodulatorischen Potenzials unterscheiden, zeigen In-vitro-Studien^[61,63,143-145] und dies impliziert die differente klinische Effektivität der einzelnen Stämme.

In Bezug auf die Stimulationen mit Lactobazillen plus Allergen (LC+A) zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit auch, dass durch die simultane In-vitro-Exposition der Immunzellen mit divergierenden Stimulationsreizen (Lactobazillen contra Th2, Allergen pro Th2) Grenzen erreicht werden. Denn potenzielle Langzeiteffekte der Lactobazillen werden bei diesem Versuchsaufbau nicht berücksichtigt. Auch wird hiermit die postulierte prägende Wirkung der Lactobazillen auf das Immunsystem nicht erfasst. In-vitro-Analysen von Pochard und Kollegen^[64] konnten durch Präinkubation von PBMCs mit Lactobazillen auch nach Allergenstimulation die Inhibition von Th2-Zytokinen zeigen.

Dass Lactobazillen zumindest das unreife fetale/frühkindliche Immunsystem prägend beeinflussen können, implizieren die Ergebnisse prospektiver Studien an Schwangeren und ihren Neugeborenen mit hohem Atopierisiko. Hierbei erhielten die Schwangeren 2 bis 4 Wochen präpartal und ihre geborenen Kinder 6 Monate postnatal täglich Lactobazillen *per os*^[45]. Über einen Beobachtungszeitraum von 2^[45], 4^[46] bzw. 7 Jahren^[47] war die Atopiehäufigkeit in der Lactobazillen-Gruppe gegenüber der Placebo-Gruppe reduziert. In einer anderen doppelblinden placebokontrollierten Studie erhielten die Schwangeren und später stillenden Mütter einige Wochen peripartal täglich *Lactobacillus rhamnosus* GG^[48]. Auch hier hatte sich im Nachbeobachtungszeitraum von 2 Jahren die Atopiehäufigkeit bei den prädisponierten Kindern signifikant verringert. So vermutete man, dass der präventive Effekt der Lactobazillen über die Kindheit hinaus andauert.

Die beobachteten anti-allergischen Effekte der probiotischen Bakterien bei Erwachsenen^[53,56,59] könnten unter Einbeziehung des TLR-Modells erklärt werden. Als

grampositive Bakterien sind die Lactobazillen in der Lage, via TLR2 naive dendritische Zellen, die sich in der Peripherie befinden, zu aktivieren und ihre Reifung zu induzieren^[33,146-148]. Nach Migration in die Lymphgewebe können die dendritischen Zellen über IL-12-Freisetzung die Entwicklung von Th0- zu Th1-Zellen stimulieren und somit das adaptive Immunsystem von Th2 auf Th1 ablenken. Die Induzierbarkeit der für diese Prozesse nötigen Reifungsmarker (MHC-II und kostimulatorische Moleküle) auf den dendritischen Zellen wurde für Lactobazillen gezeigt^[65,66,120]; so auch die Lactobazillen-getriggerte Induktion von IL-12 in dendritischen Zellen^[120].

Vor dem Hintergrund der Hygiene-Hypothese spielt das TLR-Modell insbesondere deshalb eine entscheidende Rolle, da nach bisherigem Kenntnisstand die TLR-vermittelte Antigen-Erkennung ausschließlich die Entstehung von Th1-, jedoch nicht Th2-Effektorantworten verstärkt^[146]. Zudem besitzen Allergene keine PAMPs und können das erworbene Immunsystem nur auf TLR-unabhängige Art aktivieren^[146]. Interessant bleibt das TLR-Modell nicht zuletzt deshalb, weil es als Früherkennungssystem für pathogene Strukturen Bestandteil des angeborenen, schnell reagierenden Immunsystems ist und weil mit den dendritischen Zellen als Vermittlerzellen zwischen beiden Kompartimenten das erworbene Immunsystem prägend beeinflusst werden kann^[33,146,147].

Dass TLRs bei der allergischen Inflammation eine Rolle spielen könnten, implizieren Untersuchungen, die in der Nasenschleimhaut von symptomatischen allergischen Rhinitikern eine Heraufregulation von TLR2, TLR3 und TLR4 gefunden haben^[149]. In Anknüpfung an die Hygiene-Hypothese wurde gezeigt, dass Kinder, die auf Bauernhöfen aufwachsen und ein verringertes Allergierisiko haben, eine höhere TLR2-mRNA-Expression im Blut aufweisen als Stadt-Kinder^[150].

Insbesondere hinsichtlich der Th-Balance und möglicherweise auch der IgE-Regulation deuten die immunmodulatorischen Eigenschaften von *Lactobacillus acidophilus* darauf hin, dass die Anwendung als Probiotikum mit anti-allergischer Potenz sinnvoll sein könnte. Dass dieser Ansatz klinisch verfolgt werden sollte, implizieren aktuelle Daten, die für die Anwendung von *Lactobacillus acidophilus* eine Symptomverbesserung bei der perennialen allergischen Rhinitis zeigten^[59]. Allerdings wurde in anderen klinischen Studien kein Benefit für allergische Asthmatiker^[52] oder Neugeborene mit hohem Atopierisiko^[50] ermittelt. Jedoch sollte die langfristige Förderung Th1-dominierender Immunantworten durch Bakterien-Langzeitapplikation kritisch bewertet werden, auch

wenn die probiotischen Bakterien als apathogen gelten. Denn so werden beispielsweise Autoimmunkrankheiten durch Th1-dominierende Immunantworten mit vermehrter Produktion von IFN γ beschrieben^[18]. Eine Förderung dieser Immunantworten durch Lactobazillen-Langzeitapplikation könnte somit möglicherweise Autoimmunkrankheiten auslösen oder verstärken. Kürzlich wurde sogar im Rattenmodell für die experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis eine Symptomverstärkung nach Gabe von *Lactobacillus casei Shirota* gezeigt^[151]. Die meisten Studien zeigen jedoch, dass die Lactobazillen-Gabe keine Nachteile hinsichtlich Th1-dominierender Erkrankungen bringt. So verhinderten Lactobazillen im Mausmodell die Entstehung eines Autoimmun-Diabetes (IDDM = *insulin-dependent diabetes mellitus*)^[152]. Patienten mit rheumatoider Arthritis profitierten zwar nicht wesentlich von einer Lactobazillen-Langzeiteinnahme im Vergleich zur Placebo-Gabe, jedoch kam es eher zur Symptomverbesserung als –verschlechterung^[153]. Auch verbesserte die orale Gabe von *L. rhamnosus GG* vor und nach Transplantation im Mausmodell das Überleben und reduzierte die akute Abstoßungsreaktion (GVHD = *graft-versus-host disease*)^[154], welche Th1-vermittelt ist und mit erhöhten Spiegeln von IFN γ einhergeht. Lebertransplantierte Patienten zeigten sogar einen Benefit hinsichtlich schwerwiegender bakterieller Infektionen, der Dauer der Antibiotikatherapie und Hospitalisierungszeit, wenn sie in den ersten 14 Tagen nach Transplantation lebende Lactobazillen per os erhielten^[155,156].

Dennoch sollte die Anwendung von Lactobazillen bei immunsupprimierten Individuen und prinzipiell auch bei Kindern mit Bedacht erfolgen. Denn so gibt es auch einige Fallberichte zu opportunistischen Infektionen durch Lactobazillen^[39,157,158]. Nichtsdestotrotz haben Lactobazillen eine lange Vorgeschichte sicherer Anwendung in Nahrungsmitteln und Produkten, die in klinischen Studien verwendet wurden^[39,157-159].

Für die Anwendung von Lactobazillen als Probiotikum muss auch die Frage gestellt werden, ob lebende Bakterien zur effektiven Immunmodulation erforderlich sind, oder ob auch avitale Bakterien oder gar nur ihre Zellwandbestandteile ausreichende Effekte erzeugen. Die Definition probiotischer Bakterien fordert ihre Viabilität vor allem deshalb, da bei oraler Applikation nur durch lebende Bakterien die Kolonisierung und folglich langfristige Änderung der Zusammensetzung der Darmflora gewährleistet sein kann^[160]. Doch zeigen verschiedene Untersuchungen, dass Zellwandkomponenten grampositiver Bakterien oder auch avitale Bakterien potente Immunmodulatoren sind^[66,115,145,161-163]. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls gezeigt, dass avitale Bakterien immunmodulatorisch wirken. Bezieht man das TLR-Modell in die möglichen Signalwege

der probiotischen Lactobazillen ein, so scheint die Vitalität auch nicht erforderlich zu sein, zumindest wenn man neben der oralen Verabreichung andere Applikationswege in Betracht zieht. So würde die topische Applikation der Lactobazillen am Ort der allergischen Inflammation das Darmmukosa-assoziierte Immunsystem umgehen. Denkbare Vorteile lägen in der geringeren systemischen Wirkung und damit höheren Sicherheit. Auch müsste möglicherweise nicht die Vitalität der Bakterien gefordert werden, da keine Kolonisierung erzielt werden müsste.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt bleibt es spekulativ, ob Lactobazillen in abgetöteter Form in einer geeigneten galenischen Zubereitung (z.B. als Nasenspray) über die erörterten Mechanismen präventive Effekte im Rahmen der allergischen Rhinitis hätten. Zumindest würde die gezielte topische Anwendung der Lactobazillen für solche Individuen interessant sein, bei denen aufgrund fehlender systemischer Atopiezeichen eine „lokale Allergie“ postuliert wird. Möglicherweise könnte durch ein Applikationsschema, wie es bei der präseasonalen Kurzzeit-Hyposensibilisierungsbehandlung bereits praktiziert wird, die allergische Inflammation durch einen bereits präseasonal erzielten Th1-Shift und eine IgE-Herabregulation gebremst und sogar langfristig über prägende Effekte verhindert werden.

6 Zusammenfassung

Die allergische Rhinitis ist durch IgE-vermittelte Th2-dominierte Immunantworten gekennzeichnet. Im Rahmen der Hygiene-Hypothese wird die steigende Prävalenz dieser Typ-1-allergischen Erkrankung mit der Abnahme mikrobieller Stimuli und einer nachfolgenden Verlagerung des Th1/Th2-Gleichgewichts erklärt. In diesem Zusammenhang werden für probiotische Bakterien anti-allergische Effekte postuliert, welche u.a. über die Ausrichtung der Immunantwort nach Th1 vermittelt werden. Ziel dieser Arbeit war es zum einen, die allergische Immunantwort im Effektororgan (Nase) zu charakterisieren. Zum anderen sollte die Modulation der allergischen Immunantwort durch inaktivierten probiotischen *Lactobacillus acidophilus* bei Patienten mit allergischer Rhinitis untersucht werden.

Zur Beantwortung der ersten Fragestellung wurden außerhalb der Pollensaison Patienten mit allergischer Rhinitis und als Kontrollgruppe nichtallergische Individuen mit nasalen Atembeschwerden ohne systemische Atopiezeichen rekrutiert. Aus den unteren Nasenmuscheln und dem peripheren Blut wurden Lymphozyten isoliert. Durchflusszytometrisch wurde die Expression verschiedener Oberflächenmarker auf CD4⁺ T-Helferzellen sowie auf CD20⁺ B-Zellen der Nasenschleimhaut bestimmt und mit dem Phänotyp peripherer Lymphozyten verglichen. Aus der Nasenschleimhaut wurden hauptsächlich stark aktivierte (CD69⁺) Gedächtnis-(CD45RO⁺)-T-Zellen isoliert, die eine geringe CLA-Expression zeigten. Dagegen bestand im peripheren Blut ein ausgewogenes Verhältnis von naivem und Gedächtniszell-Phänotyp. Die nasalen B-Zellen exprimierten signifikant mehr mIgE und weniger CD23 als die peripheren B-Lymphozyten. Signifikante Unterschiede zwischen Allergikern und Nichtallergikern wurden nicht ermittelt. So wurden inflammatorische B- und T-Lymphozyten nicht nur in der Nasenschleimhaut von Allergikern, sondern auch von nichtallergischen Individuen gefunden. Dies impliziert die mögliche Existenz einer „lokalen Allergie“ ohne systemische Manifestation einer Atopie.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die Effekte von *Lactobacillus acidophilus* und Allergen auf die nasalen Immunzellen sowie auf PBMCs untersucht. Die Stimulation der PBMCs mit *Lactobacillus acidophilus* führte zu einer signifikanten CD69- und CD86-Heraufregulation bei Allergikern und Nichtallergikern. Bei den Allergikern nahm sowohl die CD23- als auch die CD80-Expression nach Lactobazillen-Stimulation signifikant ab; durch Allergen wurden CD23 und CD80 dagegen signifikant stärker exprimiert. CD152

wurde bei den Allergikern durch Lactobazillen signifikant heraufreguliert. Für die aktivierten T-Helferzellen (CD69+ CD4+) der Allergiker wurde eine Allergen-getriggerte Zunahme der Produktion von IL-4 gezeigt. Durch Lactobazillen wurde die Produktion von IFN γ induziert, während die Produktion von IL-4 kaum beeinflusst wurde. Die gleichzeitige Stimulation mit Lactobazillen und Allergen erhöhte die Expression von IL-4 und verringerte die Expression von IFN γ signifikant. Bei den Nichtallergikern wurde durch Lactobazillen die Produktion von IL-4 sowie von IFN γ induziert. Die Inkubation der nasalen Lymphozyten mit Lactobazillen oder Allergen resultierte zwar in phänotypischen Veränderungen; jedoch verlangt der beobachtete Zellverlust eine Optimierung des hier vorgestellten Kultivierungssystems, bevor weitere Aussagen getroffen werden können.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass durch inaktivierten probiotischen *Lactobacillus acidophilus* die allergische Immunantwort moduliert werden kann. Die Stimulation der Lymphozyten mit Lactobazillen bewirkte eine differente Immunantwort in Abhängigkeit vom atopischen Status, wobei der Th2-Phänotyp der allergischen Individuen nach Th1 ausgerichtet wurde. Die CD23-Herabregulation liefert Hinweise für eine Beeinflussung der IgE-Regulation. Zusammen mit den dargelegten klinischen Daten weisen die Ergebnisse auf eine potenzielle Rolle von *Lactobacillus acidophilus* bei der Prävention Th2-dominierter allergischer Erkrankungen hin. Der ausbleibende Th1-Shift bei gleichzeitiger Allergenstimulation lässt jedoch den therapeutischen Einsatz als „Antiallergikum“ fraglich erscheinen. Zukünftig vermag die systematische Kombination klinischer Studien mit experimentellen Untersuchungen an den beteiligten Immunzellen, welche beispielsweise mit der vorgestellten Zellseparationsmethode aus dem Effektororgan isoliert werden könnten, weitere Aufschlüsse über eine sinnvolle Anwendung von Lactobazillen als Probiotikum mit anti-allergischer Potenz liefern.

7 Materialverzeichnis

Tabelle 7. Reagenzien.

Reagenz	Hersteller
Albumin bovine fraction V pH 7,0 standard grade lyophil. (BSA = bovine serum albumin)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
ALK-lyophilisiert SQ 108 Birke	ALK Scherax, Wedel
ALK-lyophilisiert SQ 225 Wiesenlieschgras	ALK Scherax, Wedel
Aqua Spüllösung	Delta Pharma, Illinois, USA
Ampuwa für Spülzwecke	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Antibody Diluent	DakoCytomation GmbH, Hamburg
anti-CD28 1mg/ml	BD PharMingen, Heidelberg
Beriglobin	Aventis-Behring, Marburg
Biocoll seperating solution	Biochrom KG, Berlin
Brefeldin A	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco's phosphate buffered saline (1x) (PBS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
EDTA Titriplex III	Sigma Aldrich, Taufkirchen
FACS Lysing Solution	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Permeabilising	BD Biosciences, Heidelberg
Foetal Bovine/Calf Serum (mycoplasma/virus screened)	GIBCO BRL Life Technologies, Eggenstein
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom AG, Berlin
Natriumazid reinst (NaN ₃)	MERCK, Darmstadt
Natriumchlorid	MERCK, Darmstadt
Paidoflor® Kautabletten	Ardeypharm, Herdecke
Papanicolaous Lösung 1a Harris' Hämatoxylinlösung	MERCK, Darmstadt
Paraformaldehyd reinst	MERCK, Darmstadt
Penicillin 10000 U/ml, Streptomycin 10000 µg/ml	Biochrom KG, Berlin
RPMI 1640 Medium (1x) w 2,0 g/l NaHCO ₃ w/o L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Staphylokokken Enterotoxin B (SEB)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau 0,18% in PBS w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Biochrom KG, Berlin
Venimmun N	Aventis Behring, Frankfurt

Tabelle 8. Antikörper.

Antikörper	Spezifität und Markierung	Hersteller
mouse anti human	CD4 PerCP	BD, Heidelberg
mouse anti human	CD20	DAKO, Hamburg
mouse anti human	CD20 PerCP	BD, Heidelberg
mouse anti human	CD23 FITC	Biosource GmbH, Solingen

mouse anti human	CD45RA PE	Immunotech, Marseille, Frankreich
mouse anti human	CD45RO FITC	Immunotech, Marseille, Frankreich
mouse anti human	CD69 APC	BD, Heidelberg
mouse anti human	CD80 PE	BD PharMingen, San Diego, USA
mouse anti human	CD86 APC	BD PharMingen, San Diego, USA
mouse anti human	CD152 PE (CTLA-4)	BD PharMingen, San Diego, USA
mouse anti human	CLA FITC	BD PharMingen, San Diego, USA
mouse anti human	IFN γ FITC	BD, Heidelberg
mouse anti human	IgE FITC	Abcam, Cambridge, USA
mouse anti human	IL-4 PE	BD, Heidelberg
mouse isotypic control	IgG1 PE	BD, Heidelberg
mouse isotypic control	IgG2b FITC	BD, Heidelberg
mouse isotypic control	IgG1 PerCP	BD, Heidelberg
mouse isotypic control	IgG1 APC	BD PharMingen, San Diego, USA
polyclonal rabbit anti human	CD3	DAKO, Hamburg

Tabelle 9. Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller
Blue Max 50 ml Polypropylene Conical Tube	Falcon – BD Bioscience, San Jose, USA
Blue Max Jr. 15 ml Polypropylene Conical Tube	Falcon – BD Bioscience, San Jose, USA
CA und GF-Vorfilter 0,20 μ m steril	Sarstedt, Nürnberg
Combitips 2,5 ml, 5 ml, 12,5 ml, 50 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Cryomold Biopsy	Tissue Tek, Sakura, USA
Filcons 050-47S 50 μ m, syringe-fitting	DAKO, Glostrup, Dänemark
Lamelles couvre-objets Menzel Gläser	Menzel GmbH + Co KG, Braunschweig
Medicons 79400S 50 μ m, Syringe	DAKO, Glostrup, Dänemark
Multiwell 24 well Polystyrene Platten non-Tissue Culture Pl.	Falcon – BD Bioscience, San Jose, USA
Petrischalen 94/16 mm non-TC steril	Greiner Bio-One GmbH, Solingen
Pippettenspitzen 0,2 ml, 1 ml	Sarstedt, Nürnberg
Pippettenspitzen epT.I.P.S Standard 0,5-20 μ l	Eppendorf AG, Hamburg
Polystyrene Round Bottom Tube 5 ml 12x75mm	Falcon – BD Bioscience, San Jose, USA
Safe Lock 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Serological Pipet 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Falcon – BD Bioscience, San Jose, USA
Super Frost Plus Objektträger	R. Langenbrinck, Teningen
Transferpipette 3,5 ml	Sarstedt, Nürnberg
Zählkammer 0,1 mm tief, 0,0025 mm ²	Neubauer

Tabelle 10. Geräte.

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

Tabelle 11. Prick-Test.

Material	Hersteller
ALK Lancet Sterile Disposable	ALK Abello, Hørsholm, Dänemark
ALK-Prick Negativkontrolle	ALK Scherax, Wedel
ALK-Prick Positivkontrolle	ALK Scherax, Wedel
ALK-Prick N 402 Alternaria alternata	ALK Scherax, Wedel
ALK-Prick SQ 108 Birke	ALK Scherax, Wedel
ALK-Prick SQ 299 Gräsermischung	ALK Scherax, Wedel
ALK-Prick SQ 312 Beifuß	ALK Scherax, Wedel
ALK-Prick SQ 503 Hausstaubmilbe	ALK Scherax, Wedel
ALK-Prick SQ 504 Milbe	ALK Scherax, Wedel
ALK-Prick SQ 555 Katzenhaare	ALK Scherax, Wedel

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Allergen/Allergiker
AD	atopische Dermatitis
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APZs	Antigenpräsentierende Zellen
AR	allergische Rhinitis
BSA	bovine serum albumine
BTLA	T-lymphocyte attenuator-4
CD	cluster of differentiation
CD40L	CD40-Ligand
CLA	cutaneous lymphocyte-associated antigen
CpG	Cytidin-Phosphat-Guanosin-Dinukleotid
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte antigen-4
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GALT	gut-associated lymphoid tissues
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GVHD	graft-versus-host disease
H	Histamin
HLA	human leukocyte antigen
ICOS	inducible T-cell costimulator
IDDM	insulin-dependent diabetes mellitus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IK	Isotypenkontrolle
IL	Interleukin
LC	Lactobazillen
LC+A	Lactobazillen (<i>Lactobacillus acidophilus</i>) plus Allergen
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Leukotrien
MHC	major histocompatibility complex

mIgE	membrangebundenes IgE
NA	Nichtallergiker
NF	nuclear factor
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
NSH	Nasenschleimhaut
PAMPs	pathogen-specific molecular patterns
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PD	programmed death
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll- α -Protein
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prostaglandin
PRRs	pattern recognition receptors
RANTES	regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted
sCD23	soluble/lösliches CD23
SCIT	spezifische subkutane Immuntherapie
SEB	Staphylokokken-Enterotoxin B
SIT	spezifische Immuntherapie
SLIT	spezifische sublinguale Immuntherapie
TGF	transforming growth factor
TLRs	Toll-like-Rezeptoren
TNF	tumor necrosis factor
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	unstimuliert
VCAM	vascular cell adhesion molecule

9 Literaturverzeichnis

1. Wang MF, Lin HC, Wang YY and Hsu CH. Treatment of perennial allergic rhinitis with lactic acid bacteria. *Pediatr Allergy Immunol* 2004;15:152-8.
2. Van Cauwenberge P, De Belder T, Vermeiren J and Kaplan A. Global Resources in Allergy (GLORIA): allergic rhinitis and allergic conjunctivitis. *Clin Exp All Rev* 2003;3:46-50.
3. Naclerio R, Rosenwasser L and Ohkubo K. Allergic rhinitis: current and future treatments. *Clin Exp All Rev* 2002;2:137-47.
4. Katelaris CH. Allergic rhinitis and asthma: epidemiological evidence for the link. *Clin Exp All Rev* 2003;3:5-8.
5. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy* 2008;63:8-160.
6. Dykewicz MS. Rhinitis and sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:S520-29.
7. Bousquet J, Van Cauwenberge P and Khaltaev N. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:S147-334.
8. Baraniuk JN. Pathogenesis of allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:S763-72.
9. Kleine-Tebbe J, Fuchs T, Klimek L, et al. Spezifische Immuntherapie bei IgE-vermittelten allergischen Atemwegserkrankungen. *Deutsches Ärzteblatt* 2003;6:A334-9.
10. Durham SR, Ying S, Varney VA, et al. Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases the number of cells expressing messenger RNA for interferon- γ . *J Allergy Clin Immunol* 1996;97:1356-65.
11. Tlaskalova-Hogenova H, Tuckova L, Lodinova-Zadnikova R, et al. Mucosal immunity: its role in defense and allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;128:77-89.
12. Coker HA, Durham SR and Gould HJ. Local somatic hypermutation and class switch recombination in the nasal mucosa of allergic rhinitis patients. *J Immunol* 2003;171:5602-10.
13. Gould HJ, Sutton BJ, Beavil AJ, et al. The biology of IgE and the basis of allergic disease. *Annu Rev Immunol* 2003;21:579-628.
14. Worm M and Henz BM. Molekulare Mechanismen der IgE-Regulation. *Hautarzt* 1997;48:773-82.

15. Durham SR. Mechanisms of mucosal inflammation in the nose and lungs. *Clin Exp Allergy* 1998;28:11-6.
16. Igarashi Y, Goldrich MS, Kaliner MA, Irani AM, Schwartz LB and White MV. Quantitation of inflammatory cells in the nasal mucosa of patients with allergic rhinitis and normal subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:716-25.
17. Powe DG, Huskisson RS, Carney AS, et al. Mucosal T-cell phenotypes in persistent atopic and nonatopic rhinitis show an association with mast cells. *Allergy* 2004;59:204-12.
18. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 2003;8:223-46.
19. Constant SL and Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 1997;15:297-322.
20. Cameron L, Gounni AS, Frenkiel S, Lavigne F, Vercelli D and Hamid Q. $S\epsilon S\mu$ and $S\epsilon S\gamma$ switch circles in human nasal mucosa following ex vivo allergen challenge: evidence for direct as well as sequential class switch recombination. *J Immunol* 2003;171:3816-22.
21. Miescher SM and Vogel M. Molecular aspects of allergy. *Mol Aspects Med* 2002;23:413-62.
22. Young JL, Ramage JM, Hill Gaston JS and Beverly PCL. In vitro responses of human CD45RObrightRA- and CD45RA-RObright T cell subsets and their relationship to memory and naive T cells. *Eur J Immunol* 1997;27:2383-9.
23. Nakada M, Nishizaki K, Yoshino T, et al. CD86 (B7-2) antigen on B cells from atopic patients shows selective, antigen-specific upregulation. *Allergy* 1998;53:527-31.
24. Hofer MF, Jirapongsananuruk O, Trumble AE and Leung DY. Upregulation of B7.2, but not B7.1, on B cells from patients with allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:96-102.
25. Van Neerven RJ, Van de Pol MM, Van der Zee JS, Stiekema FE, De Boer M and Kapsenberg ML. Requirement of CD28-CD86 costimulation for allergen-specific T cell proliferation and cytokine expression. *Clin Exp Allergy* 1998;28:808-16.
26. Freeman GJ, Boussiotis VA, Anumanthan A, et al. B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity* 1995;2:523-32.
27. Tsicopoulos A and Joseph M. The role of CD23 in allergic disease. *Clin Exp Allergy* 2000;30:602-5.

28. Punnonen J, Aversa G, Cocks BG and de Vries JE. Role of interleukin-4 and interleukin-13 in synthesis of IgE and expression of CD23 by human B cells. *Allergy* 1994;49:576-86.
29. Prescott SL and Bjorksten B. Probiotics for the prevention or treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:255-62. Epub 2007 Jun 4.
30. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj* 1989;299:1259-60.
31. Bischoff SC and Manns MP. Probiotika, Präbiotika und Synbiotika. *Deutsches Ärzteblatt* 2005;11:C588-95.
32. Erickson KL and Hubbard NE. Probiotic immunomodulation in health and disease. *J Nutr* 2000;130:403S-9S.
33. Kaisho T and Akira S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta* 2002;1589:1-13.
34. Bjorksten B. Evidence of probiotics in prevention of allergy and asthma. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005;4:599-604.
35. Sepp E, Julge K, Vasar M, Naaber P, Bjorksten B and Mikelsaar M. Intestinal microflora of Estonian and Swedish infants. *Acta Paediatr* 1997;86:956-61.
36. Bjorksten B, Sepp E, Julge K, Voor T and Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:516-20.
37. Bjorksten B, Naaber P, Sepp E and Mikelsaar M. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin Exp Allergy* 1999;29:342-6.
38. Metchnikoff E. *Sur la flore du corps humain*. Manchester Lit Philos Soc 1901;45:1-38.
39. Matricardi PM, Bjorksten B, Bonini S, et al. Microbial products in allergy prevention and therapy. *Allergy* 2003;58:461-71.
40. Isolauri E, Juntunen M, Rautanen T, Sillanauke P and Koivula T. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics* 1991;88:90-7.
41. Lidbeck A and Nord CE. Lactobacilli and the normal human anaerobic microflora. *Clin Infect Dis* 1993;16:S181-7.
42. Vaughan EE, de Vries MC, Zoetendal EG, Ben-Amor K, Akkermans AD and de Vos WM. The intestinal LABs. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002;82:341-52.

43. Kailasapathy K and Chin J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunol Cell Biol* 2000;78:80-8.
44. Meydani SN and Ha WK. Immunologic effects of yogurt. *Am J Clin Nutr* 2000;71:861-72.
45. Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P and Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2001;357:1076-9.
46. Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H and Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2003;361:1869-71.
47. Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T and Isolauri E. Probiotics during the first 7 years of life: a cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:1019-21. Epub 2007 Feb 7.
48. Rautava S, Kalliomaki M and Isolauri E. Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:119-21.
49. Lodinova-Zadnikova R, Cukrowska B and Tlaskalova-Hogenova H. Oral administration of probiotic *Escherichia coli* after birth reduces frequency of allergies and repeated infections later in life (after 10 and 20 years). *Int Arch Allergy Immunol* 2003;131:209-11.
50. Taylor AL, Dunstan JA and Prescott SL. Probiotic supplementation for the first 6 months of life fails to reduce the risk of atopic dermatitis and increases the risk of allergen sensitization in high-risk children: a randomized controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:184-91. Epub 2006 Oct 13.
51. Majamaa H and Isolauri E. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:179-85.
52. Wheeler JG, Shema SJ, Bogle ML, et al. Immune and clinical impact of *Lactobacillus acidophilus* on asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997;79:229-33.
53. Van de Water J, Keen CL and Gershwin ME. The influence of chronic yogurt consumption on immunity. *J Nutr* 1999;129:1492S-5S.
54. Isolauri E, Arvola T, Sutas Y, Moilanen E and Salminen S. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1604-10.
55. Helin T, Haahtela S and Haahtela T. No effect of oral treatment with an intestinal bacterial strain, *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103), on birch-pollen allergy: a placebo-controlled double-blind study. *Allergy* 2002;57:243-6.

56. Aldinucci C, Bellussi L, Monciatti G, et al. Effects of dietary yoghurt on immunological and clinical parameters of rhinopathic patients. *Eur J Clin Nutr* 2002;56:1155-61.
57. Rosenfeldt V, Benfeldt E, Nielsen SD, et al. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:389-95.
58. Kirjavainen PV, Salminen SJ and Isolauri E. Probiotic bacteria in the management of atopic disease: underscoring the importance of viability. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;36:223-7.
59. Ishida Y, Nakamura F, Kanzato H, et al. Clinical Effects of *Lactobacillus acidophilus* Strain L-92 on Perennial Allergic Rhinitis: A Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *J Dairy Sci* 2005;88:527-33.
60. Pessi T, Sutas Y, Hurme M and Isolauri E. Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1804-8.
61. Miettinen M, Matikainen S, Vuopio-Varkila J, et al. *Lactobacilli* and streptococci induce interleukin-12 (IL-12), IL-18, and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* 1998;66:6058-62.
62. Haller D, Blum S, Bode C, Hammes WP and Schiffrin EJ. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nonpathogenic bacteria in vitro: evidence of NK cells as primary targets. *Infect Immun* 2000;68:752-9.
63. Hesse C, Hanson LA and Wold AE. *Lactobacilli* from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12 production. *Clin Exp Immunol* 1999;116:276-82.
64. Pochard P, Gosset P, Grangette C, et al. Lactic acid bacteria inhibit TH2 cytokine production by mononuclear cells from allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:617-23.
65. Veckman V, Miettinen M, Pirhonen J, Siren J, Matikainen S and Julkunen I. *Streptococcus pyogenes* and *Lactobacillus rhamnosus* differentially induce maturation and production of Th1-type cytokines and chemokines in human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2004;75:764-71. Epub 2004 Feb 13.
66. Christensen HR, Frokiaer H and Pestka JJ. *Lactobacilli* differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol* 2002;168:171-8.
67. Fujiwara D, Inoue S, Wakabayashi H and Fujii T. The anti-allergic effects of lactic acid bacteria are strain dependent and mediated by effects on both Th1/Th2 cytokine expression and balance. *Int Arch Allergy Immunol* 2004;135:205-15. Epub 2004 Oct 04.
68. Matsuzaki T, Yamazaki R, Hashimoto S and Yokokura T. The effect of oral feeding of *Lactobacillus casei* strain Shirota on immunoglobulin E production in mice. *J Dairy Sci* 1998;81:48-53.

69. Ishida Y, Bandou I, Kanzato H and Yamamoto N. Decrease in ovalbumin specific IgE of mice serum after oral uptake of lactic acid bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003;67:951-7.
70. Baati L, Fabre-Gea C, Auriol D and Blanc PJ. Study of the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus*: effect of culture and freezing conditions on the viability and cellular protein levels. *Int J Food Microbiol* 2000;59:241-7.
71. van de Guchte M, Serror P, Chervaux C, Smokvina T, Ehrlich SD and Maguin E. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002;82:187-216.
72. Bachert C, Prohaska P and Pipkorn U. IgE-positive mast cells on the human nasal mucosal surface in response to allergen exposure. *Rhinology* 1990;28:149-58.
73. Otsuka H, Inaba M, Fujikura T and Kunitomo M. Histochemical and functional characteristics of metachromatic cells in the nasal epithelium in allergic rhinitis: studies of nasal scrapings and their dispersed cells. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96:528-36.
74. Lim MC, Taylor RM and Naclerio RM. The histology of allergic rhinitis and its comparison to cellular changes in nasal lavage. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:136-44.
75. Bascom R, Pipkorn U, Lichtenstein LM and Naclerio RM. The influx of inflammatory cells into nasal washings during the late response to antigen challenge. Effect of systemic steroid pretreatment. *Am Rev Respir Dis* 1988;138:406-12.
76. Crobach M, Hermans J, Kaptein A, Ridderikhoff J and Mulder J. Nasal smear eosinophilia for the diagnosis of allergic rhinitis and eosinophilic non-allergic rhinitis. *Scand J Prim Health Care* 1996;14:116-21.
77. Hattori H, Okano M, Yoshino T, et al. Expression of costimulatory CD80/CD86-CD28/CD152 molecules in nasal mucosa of patients with perennial allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1242-9.
78. Smurthwaite L, Walker SN, Wilson DR, et al. Persistent IgE synthesis in the nasal mucosa of hay fever patients. *Eur J Immunol* 2001;31:3422-31.
79. Davidsson A, Karlsson MG and Hellquist HB. Allergen-induced changes of B-cell phenotypes in patients with allergic rhinitis. *Rhinology* 1994;32:184-90.
80. Calderon MA, Lozewicz S, Prior A, Jordan S, Trigg CJ and Davies RJ. Lymphocyte infiltration and thickness of the nasal mucous membrane in perennial and seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1994;93:635-43.
81. Del Prete GF, De Carli M, D'Elis MM, et al. Allergen exposure induces the activation of allergen-specific Th2 cells in the airway mucosa of patients with allergic respiratory disorders. *Eur J Immunol* 1993;23:1445-9.

82. KleinJan A, Vinke JG, Severijnen LW and Fokkens WJ. Local production and detection of (specific) IgE in nasal B-cells and plasma cells of allergic rhinitis patients. *Eur Respir J* 2000;15:491-7.
83. Picker LJ, Treer JR, Ferguson-Darnell B, Collins PA, Bergstresser PR and Terstappen LW. Control of lymphocyte recirculation in man. II. Differential regulation of the cutaneous lymphocyte-associated antigen, a tissue-selective homing receptor for skin-homing T cells. *J Immunol* 1993;150:1122-36.
84. Pawankar RU, Okuda M, Okubo K and Ra C. Lymphocyte subsets of the nasal mucosa in perennial allergic rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:2049-58.
85. Pawankar RU, Okuda M, Suzuki K, Okumura K and Ra C. Phenotypic and molecular characteristics of nasal mucosal $\gamma\delta$ T cells in allergic and infectious rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1655-65.
86. Fuhlbrigge RC, Kieffer JD, Armerding D and Kupper TS. Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin homing T cells. *Nature* 1997;389:978-81.
87. Rossiter H, Mudde GC, van Reijssen F, et al. Disease-related T cells from atopic skin express cutaneous lymphocyte antigen and sialyl Lewis X determinants, and bind to both E-selectin and P-selectin. *Eur J Immunol* 1994;24:205-10.
88. Santamaria Babi LF, Picker LJ, Perez Soler MT, et al. Circulating allergen-reactive T cells from patients with atopic dermatitis and allergic contact dermatitis express the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen. *J Exp Med* 1995;181:1935-40.
89. Beyer K, Castro R, Feidel C and Sampson HA. Milk-induced urticaria is associated with the expansion of T cells expressing cutaneous lymphocyte antigen. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:688-93.
90. Campbell DE and Kemp AS. Cutaneous lymphocyte-associated antigen expression in children with atopic dermatitis and non-atopic healthy children. *Pediatr Allergy Immunol* 1999;10:253-7.
91. Corominas M, Mestre M, Bas J, et al. CD23 expression on B-lymphocytes and its modulation by cytokines in allergic patients. *Clin Exp Allergy* 1993;23:612-7.
92. Corominas M, Mestre M, Bas J and Buendia E. Distinct modulation by interferon- γ (INF- γ) of CD23 expression on B and T lymphocytes of atopic subjects. *Clin Exp Immunol* 1998;112:276-80.
93. Karagiannis SN, Warrack JK, Jennings KH, et al. Endocytosis and recycling of the complex between CD23 and HLA-DR in human B cells. *Immunology* 2001;103:319-31.

94. Mudde GC, Bheekha R and Bruijnzeel-Koomen CA. Consequences of IgE/CD23-mediated antigen presentation in allergy. *Immunol Today* 1995;16:380-3.
95. Durham SR, Gould HJ and Hamid QA. Local IgE production in nasal allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;113:128-30.
96. Durham SR, Gould HJ, Thienes CP, et al. Expression of epsilon germ-line gene transcripts and mRNA for the ϵ heavy chain of IgE in nasal B cells and the effects of topical corticosteroid. *Eur J Immunol* 1997;27:2899-906.
97. Ying S, Humbert M, Meng Q, et al. Local expression of ϵ germline gene transcripts and RNA for the ϵ heavy chain of IgE in the bronchial mucosa in atopic and nonatopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:686-92.
98. Cameron L, Hamid Q, Wright E, et al. Local synthesis of ϵ germline gene transcripts, IL-4, and IL-13 in allergic nasal mucosa after ex vivo allergen exposure. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:46-52.
99. Takhar P, Smurthwaite L, Coker HA, et al. Allergen drives class switching to IgE in the nasal mucosa in allergic rhinitis. *J Immunol* 2005;174:5024-32.
100. Huggins KG and Brostoff J. Local production of specific IgE antibodies in allergic-rhinitis patients with negative skin tests. *Lancet* 1975;2:148-50.
101. Fokkens WJ, Vinke JG and KleinJan A. Local IgE production in the nasal mucosa: a review. *Am J Rhinol* 2000;14:299-303.
102. KleinJan A, Godthelp T, van Toornenenbergen AW and Fokkens WJ. Allergen binding to specific IgE in the nasal mucosa of allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:515-21.
103. Horiguchi S, Okamoto Y, Chazono H, Sakurai D and Kobayashi K. Expression of membrane-bound CD23 in nasal mucosal B cells from patients with perennial allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005;94:286-91.
104. Lenschow DJ, Walunas TL and Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996;14:233-58.
105. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1994;1:405-13.
106. Carney AS and Jones NS. Idiopathic rhinitis: idiopathic or not? *Clin Otolaryngol* 1996;21:198-202.
107. Powe DG, Huskisson RS, Carney AS, Jenkins D and Jones NS. Evidence for an inflammatory pathophysiology in idiopathic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2001;31:864-72.

108. Carney AS, Powe DG, Huskisson RS and Jones NS. Atypical nasal challenges in patients with idiopathic rhinitis: more evidence for the existence of allergy in the absence of atopy? *Clin Exp Allergy* 2002;32:1436-40.
109. Powe DG, Jagger C, Kleinjan A, Carney AS, Jenkins D and Jones NS. 'Entopy': localized mucosal allergic disease in the absence of systemic responses for atopy. *Clin Exp Allergy* 2003;33:1374-9.
110. Perdigon G, de Macias ME, Alvarez S, Oliver G and de Ruiz Holgado AP. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Immunology* 1988;63:17-23.
111. Perdigon G, Nader de Macias ME, Alvarez S, Oliver G and Pesce de Ruiz Holgado AA. Enhancement of immune response in mice fed with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Sci* 1987;70:919-26.
112. Gill HS, Rutherford KJ, Prasad J and Gopal PK. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Br J Nutr* 2000;83:167-76.
113. Ouwehand AC, Salminen S and Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002;82:279-89.
114. Gill HS and Guarner F. Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgrad Med J* 2004;80:516-26.
115. Vaarala O. Immunological effects of probiotics with special reference to lactobacilli. *Clin Exp Allergy* 2003;33:1634-40.
116. Pelto L, Isolauri E, Lilius EM, Nuutila J and Salminen S. Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects. *Clin Exp Allergy* 1998;28:1474-9.
117. Testi R, Phillips JH and Lanier LL. T cell activation via Leu-23 (CD69). *J Immunol* 1989;143:1123-8.
118. Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R and Santoni A. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today* 1994;15:479-83.
119. Jahreis A, Beckheinrich P and Hausteiner UF. Effects of two novel cationic staphylococcal proteins (NP-tase and p70) and enterotoxin B on IgE synthesis and interleukin-4 and interferon- γ production in patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2000;142:680-7.
120. Mohamadzadeh M, Olson S, Kalina WV, et al. Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:1414-14.

121. Matricardi PM. Probiotics against allergy: data, doubts, and perspectives. *Allergy* 2002;57:185-7.
122. Hanifin JM, Schneider LC, Leung DY, et al. Recombinant interferon γ therapy for atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 1993;28:189-97.
123. Reinhold U, Kukel S, Brzoska J and Kreysel HW. Systemic interferon γ treatment in severe atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 1993;29:58-63.
124. Pawankar R. Nasal polyposis: an update. [Miscellaneous Article]. *Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology* February 2003;3:1-6.
125. Gevaert P, Holtappels G, Johansson SG, Cuvelier C, Cauwenberge P and Bachert C. Organization of secondary lymphoid tissue and local IgE formation to *Staphylococcus aureus* enterotoxins in nasal polyp tissue. *Allergy* 2005;60:71-9.
126. Morikawa H and Nagashima S. The role of costimulatory molecules (B7-1 and B7-2) on allergen-stimulated B cells in cedar pollinosis subjects. *Clin Exp Allergy* 2000;30:383-92.
127. Coyle AJ and Gutierrez-Ramos JC. The role of ICOS and other costimulatory molecules in allergy and asthma. *Springer Semin Immunopathol* 2004;25:349-59. Epub 2004 Jan 14.
128. Tsuyuki S, Tsuyuki J, Einsle K, Kopf M and Coyle AJ. Costimulation through B7-2 (CD86) is required for the induction of a lung mucosal T helper cell 2 (TH2) immune response and altered airway responsiveness. *J Exp Med* 1997;185:1671-9.
129. Jirapongsananuruk O, Hofer MF, Trumble AE, Norris DA and Leung DY. Enhanced expression of B7.2 (CD86) in patients with atopic dermatitis: a potential role in the modulation of IgE synthesis. *J Immunol* 1998;160:4622-7.
130. Lanier LL, O'Fallon S, Somoza C, et al. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *J Immunol* 1995;154:97-105.
131. Natesan M, Razi-Wolf Z and Reiser H. Costimulation of IL-4 production by murine B7-1 and B7-2 molecules. *J Immunol* 1996;156:2783-91.
132. Sharpe AH and Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002;2:116-26.
133. Greenwald RJ, Freeman GJ and Sharpe AH. The B7 Family Revisited. *Annu Rev Immunol* 2004;27:27.
134. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA and Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995;3:541-7.

135. Levine BL, Ueda Y, Craighead N, Huang ML and June CH. CD28 ligands CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) induce long-term autocrine growth of CD4+ T cells and induce similar patterns of cytokine secretion in vitro. *Int Immunol* 1995;7:891-904.
136. Thompson CB. Distinct roles for the costimulatory ligands B7-1 and B7-2 in T helper cell differentiation? *Cell* 1995;81:979-82.
137. Sato J, Asakura K, Murakami M, Uede T and Kataura A. Topical CTLA4-Ig suppresses ongoing mucosal immune response in presensitized murine model of allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;119:197-204.
138. Okano M, Azuma M, Yoshino T, et al. Differential role of CD80 and CD86 molecules in the induction and the effector phases of allergic rhinitis in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1501-7.
139. McAdam AJ, Greenwald RJ, Levin MA, et al. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* 2001;409:102-5.
140. Tafuri A, Shahinian A, Bladt F, et al. ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature* 2001;409:105-9.
141. Gonzalo JA, Tian J, Delaney T, et al. ICOS is critical for T helper cell-mediated lung mucosal inflammatory responses. *Nat Immunol* 2001;2:597-604.
142. Perdigon G, Maldonado Galdeano C, Valdez JC and Medici M. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *Eur J Clin Nutr* 2002;56:S21-6.
143. Cross ML, Ganner A, Teilab D and Fray LM. Patterns of cytokine induction by gram-positive and gram-negative probiotic bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004;42:173-80.
144. Isolauri E. Probiotics for infectious diarrhoea. *Gut* 2003;52:436-7.
145. Matsuzaki T and Chin J. Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunol Cell Biol* 2000;78:67-73.
146. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001;1:135-45.
147. Sabroe I, Parker LC, Wilson AG, Whyte MK and Dower SK. Toll-like receptors: their role in allergy and non-allergic inflammatory disease. *Clin Exp Allergy* 2002;32:984-9.
148. Baldini M, Vercelli D and Martinez FD. CD14: an example of gene by environment interaction in allergic disease. *Allergy* 2002;57:188-92.
149. Fransson M, Adner M, Erjefalt J, Jansson L, Uddman R and Cardell LO. Up-regulation of Toll-like receptors 2, 3 and 4 in allergic rhinitis. *Respir Res* 2005;6:100.

150. Lauener RP, Birchler T, Adamski J, et al. Expression of CD14 and Toll-like receptor 2 in farmers' and non-farmers' children. *Lancet* 2002;360:465-6.
151. Ezendam J and van Loveren H. *Lactobacillus casei* Shirota administered during lactation increases the duration of autoimmunity in rats and enhances lung inflammation in mice. *Br J Nutr* 2007:1-8.
152. Calcinaro F, Dionisi S, Marinaro M, et al. Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia* 2005;48:1565-75. Epub 2005 Jun 29.
153. Hatakka K, Martio J, Korpela M, et al. Effects of probiotic therapy on the activity and activation of mild rheumatoid arthritis - a pilot study. *Scand J Rheumatol* 2003;32:211-5.
154. Gerbitz A, Schultz M, Wilke A, et al. Probiotic effects on experimental graft-versus-host disease: let them eat yogurt. *Blood* 2004;103:4365-7. Epub 2004 Feb 12.
155. Rayes N, Seehofer D, Hansen S, et al. Early enteral supply of *Lactobacillus* and fiber versus selective bowel decontamination: a controlled trial in liver transplant recipients. *Transplantation* 2002;74:123-7.
156. Rayes N, Seehofer D, Theruvath T, et al. Supply of pre- and probiotics reduces bacterial infection rates after liver transplantation - a randomized, double-blind trial. *Am J Transplant* 2005;5:125-30.
157. Reid G, Jass J, Sebuly MT and McCormick JK. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:658-72.
158. Adolfsson O, Meydani SN and Russell RM. Yogurt and gut function. *Am J Clin Nutr* 2004;80:245-56.
159. Isolauri E, Salminen S and Ouwehand AC. Microbial-gut interactions in health and disease. *Probiotics. Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:299-313.
160. Schrezenmeir J and de Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 2001;73:361S-4S.
161. Kitazawa H, Itoh T, Tomioka Y, Mizugaki M and Yamaguchi T. Induction of IFN- γ and IL-1 α production in macrophages stimulated with phosphopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *Int J Food Microbiol* 1996;31:99-106.
162. Cross ML and Gill HS. Can immunoregulatory lactic acid bacteria be used as dietary supplements to limit allergies? *Int Arch Allergy Immunol* 2001;125:112-9.
163. Cross ML, Stevenson LM and Gill HS. Anti-allergy properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria? *Int Immunopharmacol* 2001;1:891-901.

10 Erklärung an Eides Statt

„Ich, Christin Wolfram, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Immunmodulatorische Einflüsse von probiotischen *Lactobacillus acidophilus* auf die allergische Immunantwort von peripheren und nasalen B- und T-Zellen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

11 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. med. Margitta Worm, für die Überlassung des Dissertationsthemas danken. Sie hat mich mit ihrer steten Bereitschaft zur fachlichen Auseinandersetzung und Hilfestellung in schwierigen Situationen ganz besonders unterstützt.

Herrn Dr. med. Michael Wahls, seinen Mitarbeitern in der Abteilung für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Bundeswehrkrankenhauses Berlin sowie insbesondere OP-Schwester Monika danke ich für die kooperative und unkomplizierte Zusammenarbeit im Rahmen der Materialgewinnung. Selbstverständlich möchte ich mich bei den zahlreichen Patienten für ihre Teilnahme und die Bereitstellung der Proben bedanken.

Meiner Freundin und Mitstreiterin Frau Dr. med. Claudia Rasche möchte ich an dieser Stelle ganz besonderen Dank aussprechen. Der gemeinsame Weg – im Privaten sowie im Beruflichen – verbindet uns auf eine unvergleichliche Weise. Gern denke ich an unsere bewegte Zeit und die vielen kritischen Diskussionen zurück.

Susanne Lescau bin ich für die große Unterstützung bei allen labortechnischen Fragen dankbar. Ihr sowie allen Mitarbeitern des Labors der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin bin ich sehr für die offenherzige Integration, fachkundige Beratung und praktische Hilfestellung verbunden.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. rer. nat. Brigitte Wegener vom Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie für Ihren Beitrag bei der Durchführung der statistischen Auswertung.

Von ganzem Herzen bin ich meiner Familie und meinen lieben Freunden verbunden, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

12 Lebenslauf

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

13 Publikationen

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Wolfram C, Rasche C, Audring H, Wahls M, Worm M. Isolation and phenotypic characterization of mucosal nasal lymphocytes by direct ex vivo analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008; elektronische Online-Publikation am 3. September, DOI 10.1007/s00405-008-0795-5.

Rasche C, Wolfram C, Wahls M, Worm M. Differential immunomodulating effects of inactivated probiotic bacteria on the allergic immune response. *Acta Derm Venereol* 2007;87:305-311.