

## 4 Ergebnisse

Von 25 Probanden wurden die eosinophilen Granulozyten aus dem Blut isoliert. 13 der Probanden litten an allergischer Rhinitis oder allergischem Asthma, die anderen 12 Personen waren keine Atopiker. Die Diagnose wurde mittels Anamnese und Haut-Pricktest gestellt. Die symptomauslösenden Substanzen bei den Atopikern waren verschiedene Blütenpollen, Tierhaare oder Hausstaubmilbenkot. Die Probanden hatten vor der Blutentnahme über 4 Wochen keine antiallergische Medikation erhalten.

Die isolierten Eosinophilen, die eine Reinheit von ca 96% und eine Viabilität von 100% aufwiesen, wurden mit Dexamethason oder Theophyllin oder ohne Stimulans jeweils 18 Stunden in Kultur gehalten, woraufhin der jeweilige Gehalt an NGF und BDNF intrazellulär oder in den Überständen mittels ELISA gemessen und die Ergebnisse mit Hilfe der Durchflußzytometrie, Western blot und PCR bestätigt wurden.

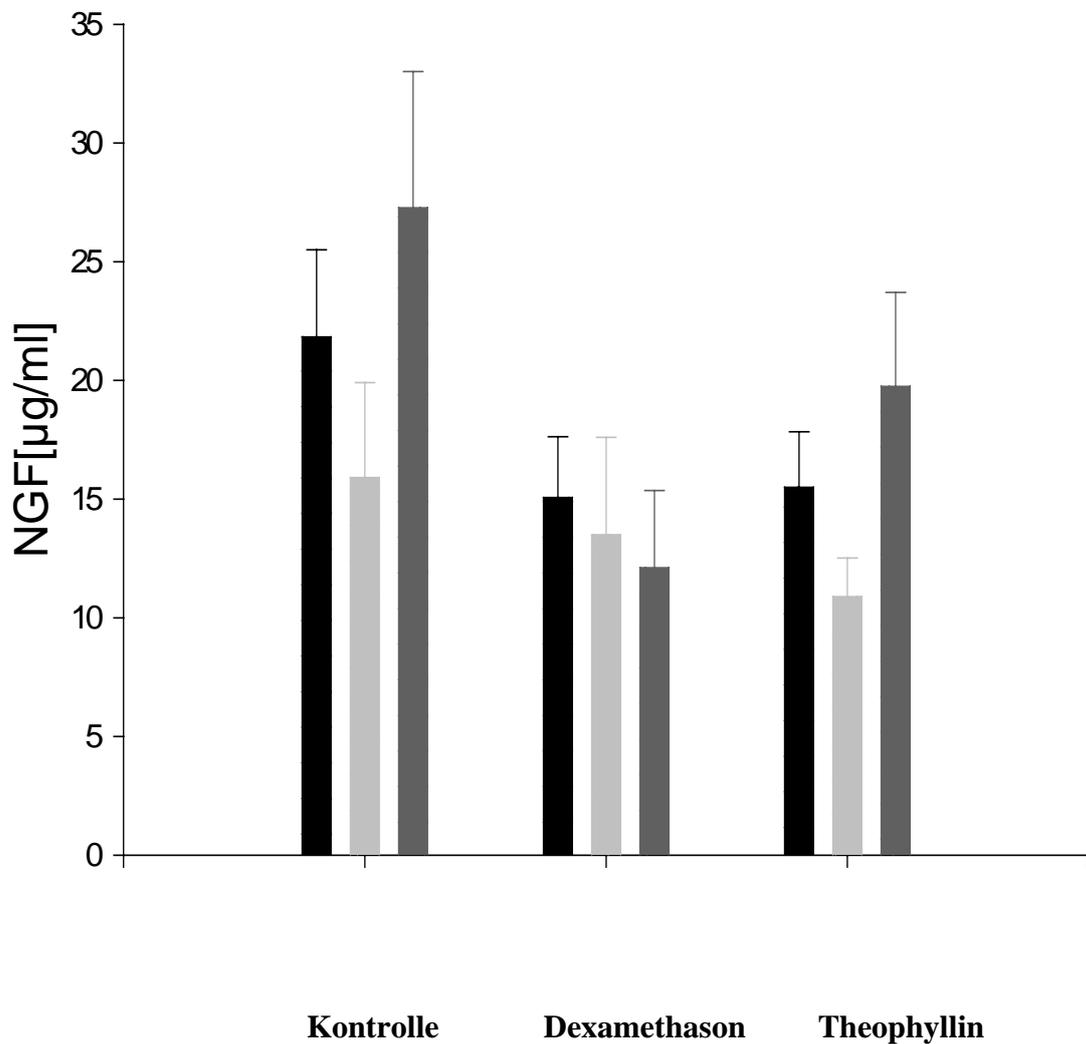
### 4.1 ELISA

Mit Hilfe des ELISA-Verfahrens läßt sich der Neurotrophingehalt im Eosinophilenlysat und im Überstand quantitativ erfassen. Der Neurotrophingehalt im Lysat wurde zur besseren Vergleichbarkeit auf die Gesamtproteinmenge bezogen.

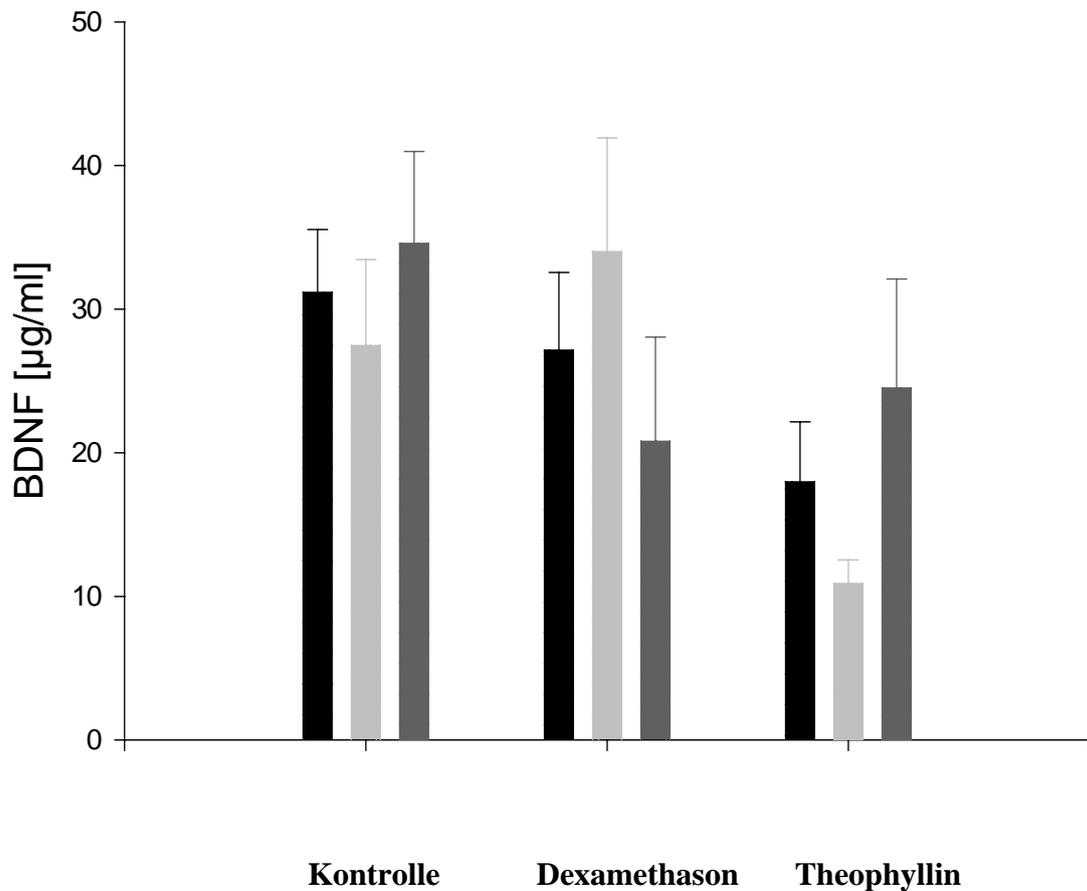
Die Neurotrophine NGF und BDNF sind in den Lysaten und Überständen in unterschiedlicher Menge vorhanden, bei den Allergikern ist der durchschnittliche NGF-Gehalt höher und der durchschnittliche BDNF-Gehalt niedriger als bei den Nichtallergikern. Die Inkubation mit Dexamethason führt bei den Allergikern zu einer signifikanten Erniedrigung von NGF in den Lysaten und den Überständen ( $p < 0.05$ ), bei den Nichtallergikern und insgesamt betrachtet ist der NGF-Gehalt geringer, jedoch nicht signifikant. BDNF wurde nicht signifikant beeinflusst. Theophyllin führte zu keiner signifikanten Änderung des Neurotrophingehalts, jedoch ist beim NGF eine Tendenz nach unten zu beobachten.

**Überstand:**

**NGF**



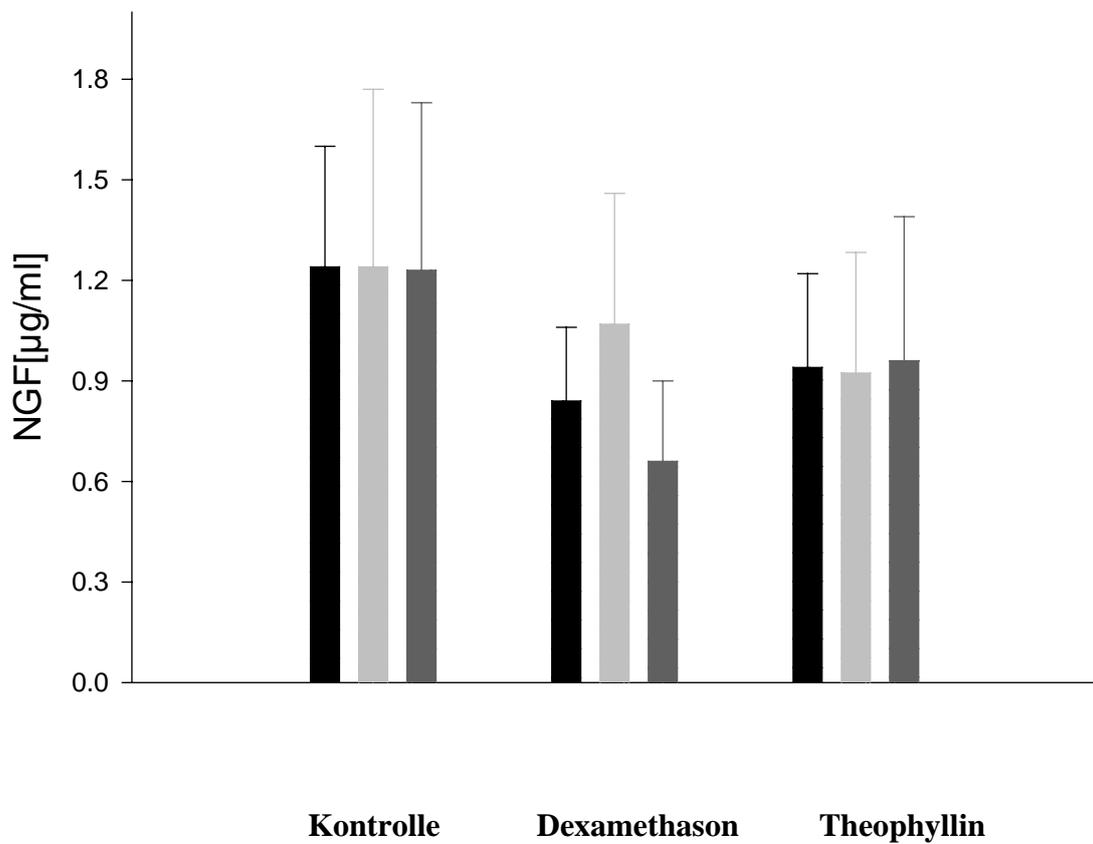
**Abbildung 1:** Vergleich der NGF-Konzentrationen im Überstand der unstimulierten Kontrollproben (1. Gruppe), der mit Dexamethason stimulierten Proben (2. Gruppe) und der mit Theophyllin stimulierten Proben (3. Gruppe). Der schwarze Balken stellt den durchschnittlichen NGF-Gehalt aller Proben dar, der hellgraue den NGF-Gehalt der Nichtallergiker und der dunkelgraue Balken den NGF-Gehalt der Allergiker.

**BDNF**

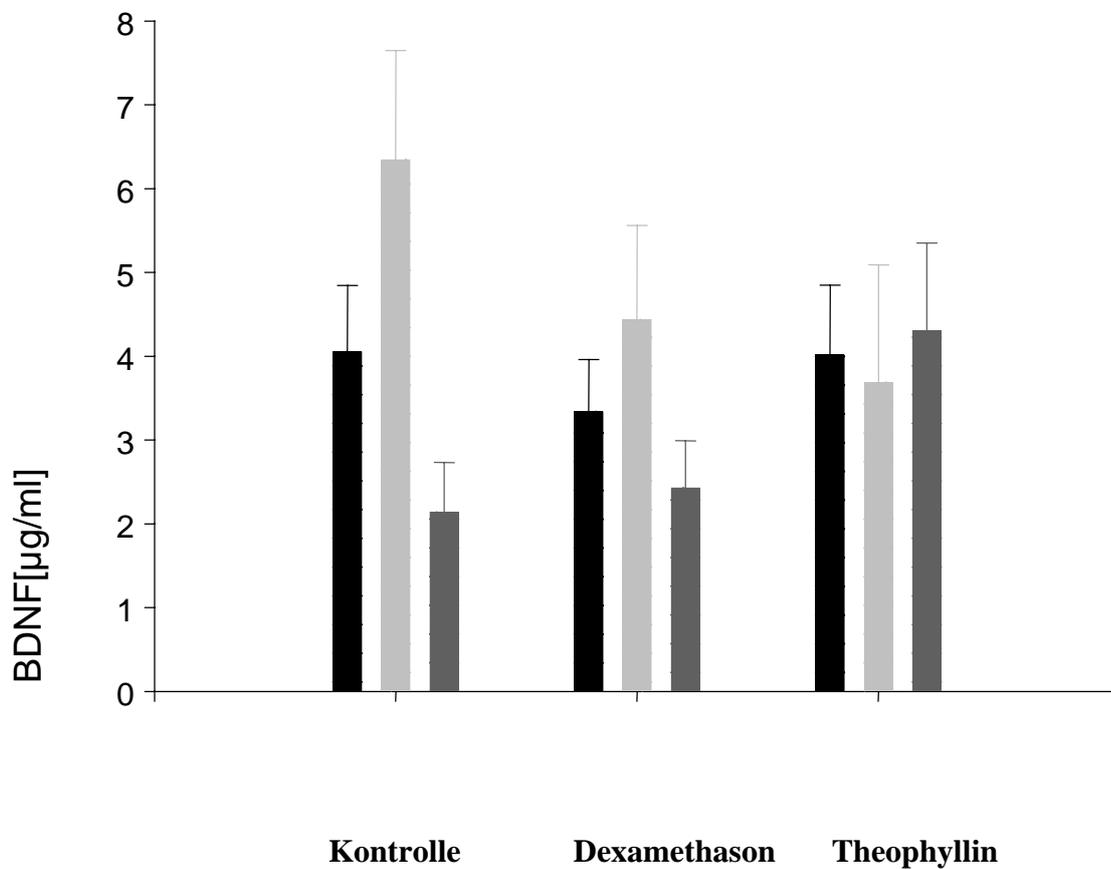
**Abbildung 2:** Vergleich der BDNF-Konzentration im Überstand der unstimulierten Kontrollproben (1. Gruppe), der mit Dexamethason stimulierten Proben (2. Gruppe) und der mit Theophyllin stimulierten Proben (3. Gruppe). Der schwarze Balken stellt die durchschnittliche BDNF-Konzentration aller Proben dar, der hellgraue Balken die BDNF-Konzentration der Nichtallergiker und der dunkelgraue Balken die BDNF-Konzentration der Allergiker.

**Lysat**

**NGF**



**Abbildung 3:** Vergleich der NGF-Konzentration in den Lysaten der unstimulierten Kontrollproben (1. Gruppe), den mit Dexamethason stimulierten Proben (2. Gruppe) und den mit Theophyllin stimulierten Proben (3. Gruppe). Der schwarze Balken zeigt die NGF-Konzentration aller Proben, der hellgraue Balken die NGF-Konzentration der Nichtallergiker, der dunkelgraue Balken die NGF-Konzentration der Allergiker.

**BDNF**

**Abbildung 4:** Vergleich der BDNF-Konzentrationen in den Lysaten der unstimulierten Kontrollproben (1. Gruppe), der mit Dexamethason stimulierten Proben (2. Gruppe) und der mit Theophyllin stimulierten Proben (3. Gruppe). Die schwarzen Balken stellen die durchschnittliche BDNF-Konzentration aller Proben dar, die hellgrauen Balken die BDNF-Konzentration der Nichtallergiker und die dunkelgrauen Balken die BDNF-Konzentration der Allergiker.

## 4.2 Durchflußzytometrie

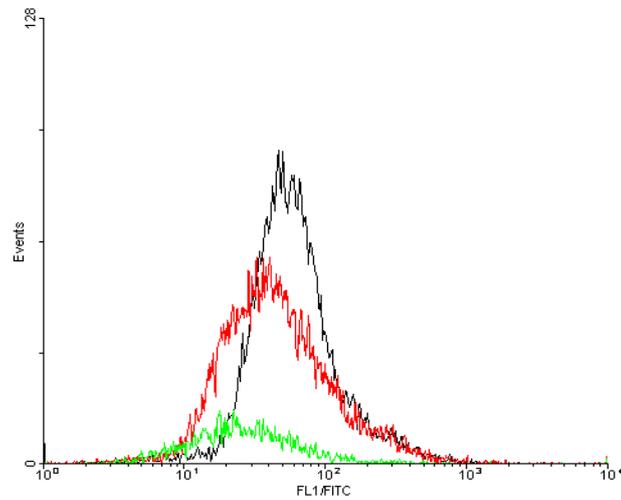
Der intrazelluläre Gehalt an Neurotrophinen wurde mit Hilfe der Durchflußzytometrie gemessen und graphisch dargestellt. Die Neurotrophine NGF und BDNF wurden jeweils mit spezifischen fluoreszierenden Antikörpern markiert, der Unterschied in der Fluoreszenzintensität zwischen den Proben spiegelt den Unterschied der jeweiligen Neurotrophinkonzentration wider. Die Fluoreszenzintensität wird in Form einer Kurve graphisch dargestellt. Eine Abnahme der Intensität drückt sich in einer Linksverschiebung der Kurven im Vergleich zur Kontrolle (die schwarze Kurve stellt in beiden Abbildungen die Kontrolle dar) aus.

Dexamethason senkt die Fluoreszenzintensität für NGF, jedoch nicht für BDNF. In der Abbildung stellt die rote Kurve die Floreszenzintensität der mit Dexamethason stimulierten Proben dar, für NGF zeigt sich eine Linksverschiebung der roten Kurve im Vergleich zur schwarzen Kurve der Kontrolle (Abb. 5, obere Graphik).

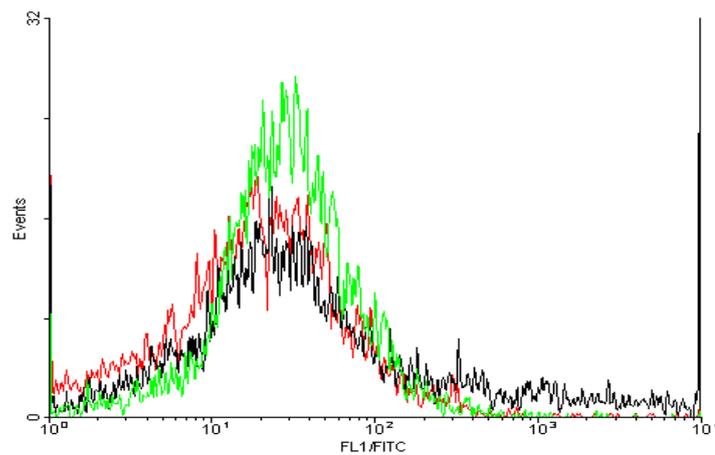
Theophyllin beeinflusst den intrazellulären Neurotrophingehalt nicht maßgeblich, jedoch zeigen sich auch hier für NGF Tendenzen nach unten. Die güne Kurve in jeder Abbildung stellt die Fluoreszenzintensität der mit Theophyllin stimulierten Probe dar, für NGF zeigt sich eine diskrete Linksverschiebung der grünen Kurve im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 5, obere Graphik).

Für BDNF lassen sich keine Unterschiede in der gemessenen Fluoreszenzintensität feststellen (Abb. 5, untere Graphik).

## NGF



## BDNF



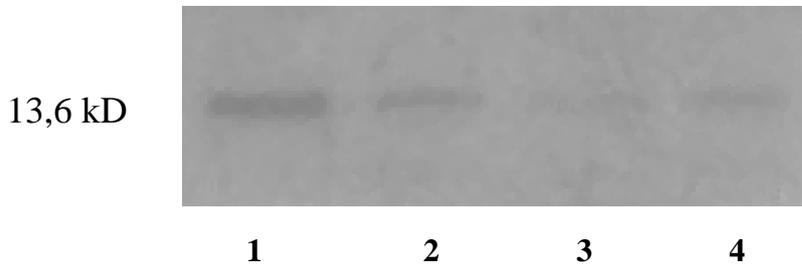
### Abbildung 5: FACS-Analyse des intrazellulären Gehalts an NGF und BDNF

Die schwarze Kurve stellt in beiden Graphiken die Kontrolle dar, die rote Kurve die Fluoreszenzintensität für NGF (obere Graphik) und BDNF (untere Graphik) der mit Dexamethason stimulierten Proben, die grüne Kurve die Fluoreszenzintensität für NGF (obere Graphik) und BDNF (untere Graphik) der mit Theophyllin stimulierten Proben.

### 4.3 Western blot

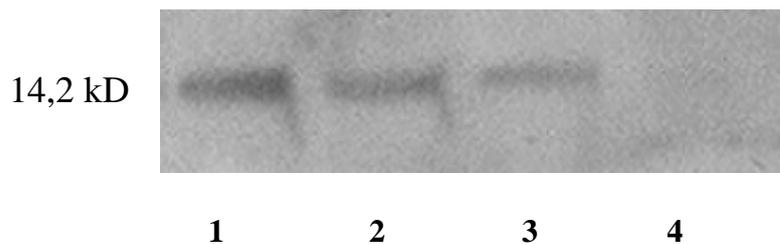
Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde als semiquantitatives Nachweisverfahren der Western blot eingesetzt. Mit dieser Methode kann die Neurotrophinproduktion auf Proteinebene nachgewiesen werden, indem die nachzuweisenden Proteine in den Lysaten nach der Sandwichmethode mit spezifischen Antikörpern markiert und letztlich mit Hilfe einer Chemiluminiszenzreaktion auf einem Autoradiographiefilm abgebildet werden können. Als Positivkontrolle diente das jeweilige rekombinante Protein. Der Vergleich der Intensität der einzelnen Banden lässt Rückschlüsse auf die Konzentration der dargestellten Proteine zu. Die Banden für NGF befinden sich bei 13,6 kD, für BDNF bei 14,2 kD.

Die Banden für NGF und BDNF sind bei den mit Dexamethason stimulierten Proben schwächer ausgeprägt als die der unstimulierten Proben. Theophyllin verringert die Bandenstärke von BDNF.

**NGF**

**Abbildung 6:** Darstellung von NGF mittels Western Blot.

Spur 1 zeigt rekombinantes NGF als Kontrolle bei 13,6 kD, Spur 2 NGF der unbehandelten Probe, Spur 3 NGF der mit Dexamethason stimulierten Probe, Spur 4 NGF der mit Theophyllin stimulierten Probe.

**BDNF**

**Abbildung 7:** Darstellung von BDNF mittels Western Blot.

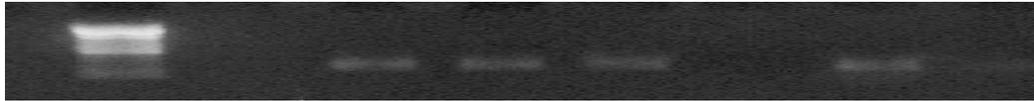
Spur 1 zeigt rekombinantes BDNF als Kontrolle bei 14,2 kD, Spur 2 BDNF der unbehandelten Probe, Spur 3 BDNF der mit Dexamethason stimulierten Probe, Spur 4 BDNF der mit Theophyllin stimulierten Probe.

## 4.4 PCR

Um die Neurotrophinexpression auf mRNA-Ebene zwischen stimulierten und unstimulierten Eosinophilen zu vergleichen, wurde die PCR als weitere semiquantitative Methode angewendet. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der aus den Eosinophilen gewonnen und in cDNA umgewandelten spezifischen mRNA läßt die Qualität der sich darstellenden Banden Rückschlüsse auf die Menge der Amplifikationsprodukte und damit auf die Menge an amplifizierbarem Ausgangsmaterial zu. Für alle Proben wurde eine GAPDH-Amplifikation zum Nachweis gleicher Mengen an cDNA mitgeführt, ferner eine Positivkontrolle aus mRNA von HMC-1-Zellen. Die Negativkontrolle enthält nicht amplifizierte isolierte RNA.

Die für NGF spezifischen Banden lassen sich bei 167 bp nachweisen, die für BDNF bei 296 bp.

Es zeigt sich, dass die Intensität der Banden für NGF der mit Dexamethason oder Theophyllin stimulierten Proben jeweils schwächer ausgeprägt sind als die entsprechenden Banden der unstimulierten Proben. BDNF wurde nicht beeinflusst.

**GAPDH**

1                    2                    3                    4                    5                    6                    7

**Abbildung 8:** RT-PCR als semiquantitativer Nachweis der verminderten Neurotrophin-Expression bei mit Dexamethason oder Theophyllin stimulierten Eosinophilen im Vgl. zu unstimulierten Eosinophilen.

Spur 1 100 bp-Leiter, Spur 2 leer, Spur 3 unstimulierte Probe, Spur 4 mit Dexamethason stimulierte Probe, Spur 5 mit Theophyllin stimulierte Probe, Spur 6 Negativkontrolle mit isolierter RNA., Spur 7 Positivkontrolle mit cDNA von HMC-1-Zellen. GAPDH bei 197 bp.

**NGF****BDNF**

1                    2                    3                    4                    5                    6

**Abbildung 9:** RT-PCR als semiquantitativer Nachweis der ver Neurotrophin-Expression Spur 1 100 bp-Leiter, Spur 2 unstimulierte Probe, Spur 3 mit Dexamethason stimulierte Probe, Spur 4 mit Theophyllin stimulierte Probe, Spur 5 Negativkontrolle mit isolierter RNA, Spur 6 Positivkontrolle mit cDNA von HMC-1-Zellen. NGF bei 167 und BDNF bei 296 bp.