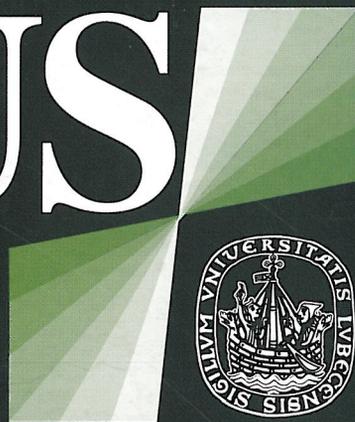


FOCUS MUL



ZEITSCHRIFT FÜR WISSENSCHAFT, FORSCHUNG UND LEHRE
AN DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

THEMA IMMUNOLOGIE

SCHERING



Diagnostika



**Beim Golfen kann ich mir ein
Handicap erlauben.
Bei meinen Diagnosen nicht.**

Radiologen tragen eine hohe Verantwortung. Da ist es gut, einen Partner wie Schering zu haben: mit speziellen Kontrastmitteln für spezielle Indikationen und alle bildgebenden Verfahren. Und einem individuell auf die einzelne Praxis zugeschnittenen Serviceprogramm – fragen Sie Ihren Pharmareferenten. Damit die Besten ihr Bestes geben können.

**Schering
Diagnostika**

Wissenschaft plus Partnerschaft.

FOCUS MUL

Zeitschrift für Wissenschaft, Forschung und Lehre an der Medizinischen Universität zu Lübeck
12. Jahrgang · Heft 4 · Oktober 1995

Inhalt

Editorial

„Themen-Hefte“ – eine neue Focus-Form 192

Einleitung

Stand immunologischer Forschung in Lübeck und Borstel
H. Kirchner, H.-D. Flad, M. Seyfarth 194

Übersicht

Endotoxine und Sepsis
E. Th. Rietschel 196

Originalarbeiten

- Molekulare HLA-Diagnostik bei allogener Knochenmarktransplantation. Charakterisierung des Mikropolymorphismus der HLA-DR4-Gruppe.
G. Bein, M. Johannsen, K. Böttcher, D. Haase, T. H. Eiermann, H. Kirchner 204
- Die Bedeutung der C-terminalen Region des Chemokins Neutrophile-aktivierendes Peptid 2 (NAP-2) für die Interaktion mit neutrophilen Granulozyten
E. Brandt, J. E. Ehlert, F. Petersen, M. H. G. Kubbutat, J. Gerdes, H.-D. Flad 212
- Posttranslationelle Modifizierungen und ihr Einfluß auf die Allergenität – untersucht am Majorallergen Phl p 1 des Lieschgrases
A. Petersen, W.-M. Becker, M. Schlaak 221
- Die Bedeutung des Epstein-Barr-Virus in lymphoblastoiden Zelllinien – Beziehungen zum Morbus Hodgkin und großzellig anaplastischen Lymphomen
H. Merz, A. Müller, C. Schorch, C. Fonatsch, A. C. Feller 230
- Wirkung des Schlafs auf die Verteilung mononukleärer Zellpopulationen im Blut und auf die Zytokinproduktion beim Menschen
K. Hansen, T. Lange, T. Wagner, J. Born, H. L. Fehm 236
- Antineutrophilenzytosplasma-Antikörper (ANCA) beim Systemischen Lupus Erythematodes und der Rheumatoiden Arthritis – Serologische Differenzierung zwischen Kollagenosen und primären systemischen Vaskulitiden
A. Schnabel, M. Braun, E. Reinhold-Keller, W. L. Gross 244
- Immunpathogenese bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen
M. Seyfarth, D. Ludwig, A. Woywodt, M. Stahl, B. Wenzel, A. Schnabel, G. Jantschek, H. Kirchner, E. F. Stange 251
- Intravesikale Immuntherapie des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms mit Bacillus Calmette-Guérin (BCG)
A. Böhle 257
- Interferon Gamma bei schizophrenen Psychosen
V. Arolt, I. Wilke, A. Nolte, H. Kirchner 268
-

Aktuelles

Aktuelle Therapie der Multiplen Sklerose
K. Wessel, D. Kömpf 273

Das Titelbild dieser Ausgabe ist dem Beitrag „Antineutrophilenzytosplasma-Antikörper (ANCA) beim Systemischen Lupus Erythematodes und der Rheumatoiden Arthritis“ (S. 244 ff) entnommen.

„Themen-Hefte“ – Eine neue Focus-Form

Zuerst ein neues Design der Titelseite, jetzt die Einführung von Themen-Heften; sind Veränderungen unserer Universitätszeitschrift notwendig und sinnvoll?

Vor kurzem erst konnte ein Rückblick auf ein erfolgreiches 10 jähriges Erscheinen unserer auch überregional anerkannten und beachteten Universitätszeitung erfolgen; never change a winning team. Warum also jetzt trotzdem Veränderungen?

Auch Bewährtes kann durch die Einführung neuer Ideen profitieren, neue Formen der Forschung verlangen neue Darstellungsformen.

Die repräsentativste Abbildung einer Ausgabe auf der Titelseite wird als ästhetisches Moment die Aufmerksamkeit auf den wissenschaftlichen Inhalt „Focus“-sieren. „Themen-Hefte“ werden jetzt in lockerer Folge – mindestens einmal pro Jahr – über die Wissenschafts-Arbeit an der MUL informieren, Themen-Hefte deshalb, weil Verbundforschung an Universitäten immer wichtiger wird.

Die im Heft dargestellten wissenschaftlichen Ergebnisse lassen sich heute nicht mehr durch geniale Einzelne erzielen, sondern nur in einem Team. Die Teams selbst müssen zudem heute in aller Regel in klinikübergreifenden Wissenschaftsverbänden arbeiten, wo sich Grundlagenforschung und angewandte klinische Forschung ergänzen. Nur so kann der Gap zwischen Erkenntnissen der Grundlagenwissenschaften und die resultierende klinische Anwendung – derzeit 10 - 20 Jahre – entscheidend reduziert werden.

Entsprechende Forschung ist aufwendig und teuer, sie ist nicht mehr aus regulären Universitäts-Haushaltsmitteln zu finanzieren, eine personelle und apparative Drittmittelförderung z. B. durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) oder das Bundesforschungsministerium ist unumgänglich, wobei Außenbegutachtungen der Forschungsprojekte eine wesentliche Grundlage für die Forschungsqualität darstellen. Die Anforderungen allerdings sind sehr hoch, nach der Wiedervereinigung sind sie noch höher geworden; derzeit ist bei DFG-Anträgen von einer Ablehnungsquote von

mindestens 50 % auszugehen. Um so höher ist die Bedeutung der Etablierung eines DFG-Sonderforschungsbereiches (SFB) an unserer Universität („Molekulare Mechanismen entzündlicher und degenerativer Prozesse“) einzuschätzen, wo durch eine Drittmittelfinanzierung in Millionenhöhe die finanziellen und personellen Voraussetzungen einer oben charakterisierten interdisziplinären Verbundforschung geschaffen werden konnten.

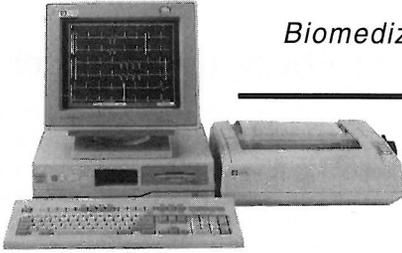
Die Immunologie stellt den Anfang der Themenheft-Reihe dar, weitere geplante Ausgaben sollen sich Themen wie z. B. „Schlaf“, „Herz und Hirn“, „100 Jahre Röntgen“ etc. widmen.

Wissenschaftler der MUL stehen hierbei als wechselnde Guest-editors der Focus-Schriftleitung zur Seite; sie werden in das Thema einführen und die spezifischen Originalarbeiten redaktionell mit bearbeiten.

Der Immunologie widmen wir das erste Themenheft, da sich zunehmend alle Bereiche der klinischen Medizin auf der Basis der Grundlagenforschung mit Immun-Pathomechanismen wissenschaftlich beschäftigen und auch der SFB in Teilbereichen vorgestellt werden kann. Aus der Fülle der eingereichten Beiträge kann dieses Heft nur eine Auswahl bieten, mehrere Institute und Kliniken können dann erst in den folgenden Focus-Normalausgaben mit ihren immunologischen Beiträgen zu Wort kommen.

Eine neue Rubrik „Aktuelles“ erscheint zudem ergänzend in allen Focus-Ausgaben. In dieser Rubrik sollen nur sehr aktuelle therapie- bzw. patientenrelevante Fakten mitgeteilt werden, die sich unmittelbar aus neuen Forschungsergebnissen ableiten lassen. Begonnen werden soll in diesem Heft mit der Darstellung aktueller MS-Therapien. Nur der neuroimmunologischen Grundlagenforschung ist es zu verdanken, daß hier jetzt eine gut 20jährige Periode von therapeutischem Nihilismus zu Ende geht.

Die Schriftleitung



Biomedizinische Technik Lübeck
Osterweide 2c · 23562 Lübeck

BMTL

If you can dream it...

BMTL can do it
z. B. die papierlose Arztpraxis

Tel. 0451/5050 13
Telefax 5050 15

Jeder braucht 'mal 'nen Tip!

WEILAND BÜCHER

23552 Lübeck, Königstr. 67a, Tel. 04 51/1 60 06-0
23562 Lübeck, Ratzeburger Allee 111-125, Tel. 04 51/50 24 60
23611 Bad Schwartau, Marktwiete 2, Tel. 04 51/2 19 87

FOCUS MUL

Zeitschrift für Wissenschaft, Forschung und Lehre an der Medizinischen Universität zu Lübeck

Herausgeber: Das Rektorat der Medizinischen Universität zu Lübeck

Schriftleitung: H.-P. Bruch, D. v. Engelhardt, H. L. Fehm, H. Kirchner (Themenheft Immunologie), D. Kömpf.

Wissenschaftlicher Beirat: H. Arnold, R. Birngruber, K.-W. Diederich, K. Diedrich, H. Dilling, H. v. Domarus, P. Dominiak, A. Ch. Feller, A. Fenner, H.-D. Flad, R. Gradinger, W. Gross, H. Halsband, W. Henkel, D. Jocham, R. Kessel, E. Konechy, U. Knölker, K. Kruse, W. Kühnel, H. Laqua, R. Lasser, V. Linnemann, G. M. Lösch, K. Lorentz, P. Müller, M. Oehmichen, Th. Peters, S. Pöpl, H.-H. Raspe, K. R. Reischuk, E. Richter, E.-Th. Rietschel, G. Schäfer, F. Schmielau, P. Schmucker, R.-M. Schütz, E. Schwinger, H.H.Sievers, O. Strubelt, W. Traut, A. X. Trautwein, H. Weerda, H. D. Weiss, H. H. Wolff (alle Medizinische Universität zu Lübeck)

Redaktion: Ch. Weiss, R. Labahn, M. Seyfarth (Themenheft Immunologie), Telefon (04 51) 5 00 30 04

Anschrift: Medizinische Universität zu Lübeck, Ratzeburger Allee 160, D-23562 Lübeck

Auflage: 5000 Exemplare

Verlag: Hansisches Verlagskontor Heinz Scheffler, Mengstraße 16, D-23552 Lübeck, Telefon (04 51) 70 31-207

Anzeigen: Hansisches Verlagskontor H. Scheffler, Christiane Kermel

Druck: Verlag Schmidt-Römhild KG, Mengstraße 16, 23552 Lübeck, Telefon (04 51) 70 31-0

Erscheinen: FOCUS MUL erscheint vierteljährlich

Redaktionsschluß: 6 Wochen vorher

Bezugspreis: Einzelheft DM 18,-, Jahresabonnement DM 70,- zuzügl. Versandkosten, Inland DM 6,-; Ausland DM 9,-. In den Mitgliedsbeiträgen der Gesellschaft der Freunde und Förderer der Medizinischen Universität zu Lübeck enthalten

ISSN 0940-9998

Stand immunologischer Forschungen in Lübeck und Borstel

H. Kirchner, H.-D. Flad, M. Seyfarth

Das Fachgebiet Immunologie hat seit den siebziger Jahren einen großen Aufschwung erfahren und von experimenteller Forschung langsam alle Bereiche der klinischen Medizin beeinflusst. Dabei konnten zunehmend mehr Ergebnisse der Grundlagenforschung sinnvoll für die Diagnostik und später auch für therapeutische Ansätze genutzt werden.

An der Medizinischen Universität zu Lübeck wurde 1973 das Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin geschaffen, welches vorrangig Aufgaben der Blutversorgung für die Patienten des Klinikums hat, immunologische Forschung spielte zu diesem Zeitpunkt keine Rolle. Ende der 80er Jahre entwickelte sich der immunologische Schwerpunkt Zytokine, die als lösliche Regulatoren der Immunantwort fungieren, und wurde in den Folgejahren ein Pfeiler immunologischer Forschung an der MUL.

Außerdem wurde begonnen, eine moderne Immundiagnostik für die Patientenversorgung aufzubauen. Dabei ging es zum einen um die Fragen der humoralen Immundiagnostik mit besonderem Augenmerk für die Autoimmunität. Heute verfügt das Institut über eine leistungsfähige Abteilung Immundiagnostik. Gleichzeitig wurde verstärktes Interesse auf die immunologischen Probleme bei der Organtransplantation gelegt. Hier ist anzumerken, daß schon recht bald erkannt wurde, daß nur eine molekulare Spender/Empfängerauswahl den modernen Anforderungen genügen würde. Es wurden sukzessive molekularbiologische Methoden zur Typisierung aufgebaut, die nach ihrer intensiven Validierung durch Eurotransplant richtungweisend für viele Transplantationszentren in Europa wurden.

Die wachsende Bedeutung der Immunologie wurde von den wissenschaftlichen Gremien erkannt und in der Folgezeit bei anstehenden Berufungsverhandlungen zu einer der wichtigsten Fragen. Dabei war es das postulierte Ziel, eine breite molekularbiologisch ausgerichtete immunologische Grundlagenforschung zu etablieren und gleichzei-

tig deren fruchtbringende Erfolge in den verschiedenen Kliniken der MUL zum Wohle der Patienten anzuwenden. Heute bestehen in fast allen Kliniken und Instituten immunologisch arbeitende Gruppen. Das breite Spektrum reicht von Fragen der Tumorimmunologie über Autoimmunität bis zur Reproduktionsimmunologie.

Begünstigt wurde dieser Aufschwung immunologischer Aktivitäten an der Medizinischen Universität zu Lübeck durch die unmittelbare Nachbarschaft zum Forschungszentrum Borstel. Im Jahre 1980 wurden an dem damaligen Forschungsinstitut Borstel drei Bereiche mit eigenen Lehrstühlen geschaffen: Immunologie und Zellbiologie, Immunchemie und Biochemische Mikrobiologie, Klinische Medizin. Während die Lehrstühle Immunologie und Zellbiologie bzw. Klinische Medizin zunächst der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zugeordnet wurden, war der Lehrstuhl Immunchemie und Biochemische Mikrobiologie in der Vorklinischen Fakultät der Medizinischen Universität zu Lübeck angesiedelt. Im Jahre 1987 wurde auf Empfehlung des Wissenschaftsrates der Lehrstuhl für Immunologie und Zellbiologie in die Medizinische Fakultät der Medizinischen Universität zu Lübeck transferiert. Seit 1992 sind die Lehrstühle der drei Direktoren des Forschungszentrums Borstel in Lübeck vereint.

Im Rahmen seines Forschungskonzeptes "Pneumologie: Immunologie - Infektiologie - Allergologie" widmet sich das Forschungszentrum Borstel schwerpunktmäßig der Erforschung der Ätiologie und Pathogenese entzündlicher, mit Granulombildung einhergehender Erkrankungen, wie Sarkoidose und Tuberkulose, chronisch fibrosierender Lungenerkrankungen, den molekularen Mechanismen von Allergien sowie der molekularen Pathogenese der Sepsis. In der Therapieforschung stehen im Vordergrund die Erforschung der Wirkungsmechanismen der Immuntherapie mit Bacillus Calmette-Guérin (BCG) beim oberflächlichen Blasenkarzinom, die antiinflammatorische Therapie der Sepsis. Grundlage für viele Pathomechanis-

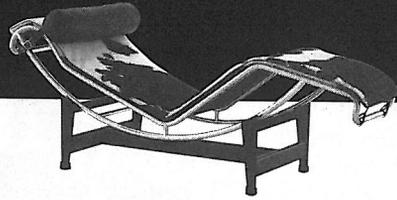
men ist die Rekrutierung von Effektorzellen vor Ort durch Chemokine, die oft mit einer Zellproliferation verbunden ist.

In den letzten Jahren hat sich eine überaus fruchtbare Zusammenarbeit zwischen in der Klinik und in der Grundlagenforschung tätigen Wissenschaftlern der Medizinischen Universität zu Lübeck und des Forschungszentrums Borstel entwickelt. Es sind zwei organisatorische Gegebenheiten, die die Kooperation zwischen beiden Institutionen fördern: 1. der Abschluß eines Verbundes klinischer Forschung; 2. der gemeinsame Sonderforschungsbereich (SFB). Der SFB enthält fünf Teilprojekte des Forschungszentrums Borstel und zehn Projekte der Medizinischen Universität zu Lübeck. Er widmet sich den molekularen Grundlagen und Erkrankungen des Bindegewebes sowie den Pathomechanismen entzündlicher Prozesse, wobei Pathogenitätsfaktoren von Seiten der Erreger und pathogenetisch bedeutsame Reaktionen des Wirtsorganismus, wie die Produktion von Zytokinen im Zentrum des Interesses stehen.

Dieser SFB hat sich zu einem fruchtbaren wissenschaftlichen Forum entwickelt, in dem Kliniker, theoretische Mediziner und Naturwissenschaftler eng zusammenarbeiten. Die Kooperation erstreckt sich auf die gemeinsame Bearbeitung von klinischen Patientenproben, auf Methodenentwicklung und Methodenaustausch, gemeinsame Nutzung von Großgeräten und auch auf gemeinsame Fortbildung von Doktoranden und Diplomanden. Alle Beteiligten sind davon überzeugt, daß von dem Förderungsinstrument Sonderforschungsbereich eine katalytische Funktion nach Innen und nach Außen ausgeht und sich dadurch wissenschaftliche Ergebnisse an beiden Einrichtungen nicht nur summieren, sondern sogar potentieren lassen.

Anlaß genug für Schriftleitung des Focus MUL immunologische Arbeitsgruppen in Lübeck und Borstel in einem Sonderheft vorzustellen. Die Anzahl der auf diesem Gebiet arbeitenden Gruppen ist zwischenzeitlich stark angestiegen, so daß die Herausgeber eine Auswahl durchführen mußten. Wir haben sie nach bestem Wissen und Gewissen vollzogen, in der Hoffnung, einen repräsentativen Querschnitt immunologischer Forschungen zu dokumentieren. Dabei wurden sowohl Gruppen innerhalb als auch außerhalb des SFB berücksichtigt.

Entspannen Sie sich!



Ein Klassiker,
über den man keine Worte
verlieren muß.

Die originale
Le-Corbusier-Liege
aus dem Jahr 1928.

In Leder oder Fell
für Sie bei **REESE!**

Parkplätze direkt vor der Tür.

MOBEL **REESE**
DAS LÜBECKER EINRICHTUNGSHAUS

Töpferweg 20-22 · 23558 Lübeck · Tel. (0451) 8 30 44

Aus dem Forschungsinstitut Borstel, Institut für Experimentelle Biologie und Medizin, Institutsbereich Immunchemie und Biochemische Mikrobiologie:

Endotoxine und Sepsis

E. Th. Rietschel

Alexander Skrjabin (1871-1915, Abb. 1), universales künstlerisches Genie, visionärer musikalischer Neuerer und bedeutender russischer Pianist und Komponist (Preludes, Mazurkas, *Le divin poème*, Prometheus), ist eines der prominentesten Opfer eines klinischen Syndroms, welches bis in unsere Tage kaum an Gefährlichkeit und Schrecken verloren hat, nämlich der Blutvergiftung oder (nach griechisch *saepos*, Fäulnis) der **Sepsis**. Skrjabin litt im März 1914 an einem Furunkel der Oberlippe, der jedoch nach Aufschneiden und Entfernung des Eiters geheilt erschien. Etwa ein Jahr später entwickelte sich erneut an der Oberlippe ein von hohem Fieber begleiteter Abzess, der bei einem Einschnitt am 3. April 1915 zum Erstaunen der behandelnden Ärzte keinen Eiter zu Tage förderte, so daß die Ursache des Fiebers unklar blieb. Nach kurzer vorübergehender Besserung trat erneut hohes Fieber auf und am Morgen des 14. April verstarb Alexander Skrjabin völlig unerwartet in Moskau.



Abb. 1: Alexander Skrjabin im Jahre 1910.
(Copyright: Harmonia Mundi, HMU 907.141.42)

Die Todesursache Skrjabins wurde 1915 nicht verstanden, obwohl ein Jahr vorher Hugo Schottmüller, Oberarzt der Inneren Klinik des Universitäts-Krankenhauses Eppendorf in Hamburg, anlässlich eines bei der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin in Wiesbaden gehaltenen Vortrags auch eine noch heute weitgehend gültige Definition der Sepsis gab: „Eine Sepsis liegt dann

vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem aus konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen, derart, daß durch diese Invasion subjektiv oder objektiv Krankheitserscheinungen ausgelöst werden“ (1). Daß die eigentlich krankmachenden Stoffe nicht die Bakterien selbst sondern von ihnen freigesetzte Produkte sind hatte schon E. Ziegler (2) erkannt, der die Sepsis als „eine Vergiftung des Organismus durch Toxine, Toxalbumin, Fermente und andere Produkte bakteritischer Zersetzung“ definierte.

Heute, achtzig Jahre nach dem Sepsis-bedingten Tod Skrjabins, stellt die Blutvergiftung immer noch ein weitgehend ungelöstes Problem der therapeutischen Medizin dar. Die Sepsis ist mit etwa 50% die Haupttodesursache von Patienten auf chirurgischen Intensivstationen und allein in den USA versterben jährlich etwa 100 000 Patienten an der schwersten Form dieses Syndroms, dem septischen Schock (3). Zudem ist die Inzidenz der Sepsis trotz modernster Intensivtherapie und der Anwendung stetig neuer und hochwirksamer Antibiotika im Ansteigen begriffen. Die Gründe hierfür sind vielfältig und liegen u.a. in einer sich ausbreitenden Antibiotikaresistenz, im oft hohen Durchschnittsalter der Patienten und in vermehrten medizinischen Eingriffen, die das Sepsisrisiko erhöhen (invasive Maßnahmen, aggressive Chemotherapie, Immunsuppression nach Transplantation u.a.). Somit läßt sich sagen, daß in früheren Jahrhunderten die dramatische Sepsis-Mortalität, wie etwa bei der Pest (Erreger: *Yersinia pestis*), vor allem durch die Mikroben-Aggressivität beherrscht wurde, während heute die oft schweren Grunderkrankungen oder eine unterdrückte Immunabwehr erst bestimmte Krankheitserreger, wie *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*, ihr pathogenes Potential entfalten lassen. Ein der Sepsis ähnliches Syndrom wird auch nach Traumata, operativen Eingriffen und schweren Verbrennungen beobachtet. Die Auslösung des septischen Geschehens wird hier Bakterien oder Bakterien-

produkten, die unter pathologischen Bedingungen durch Translokation aus dem Intestinaltrakt in die Zirkulation gelangen, zugeschrieben.

Das klinische Erscheinungsbild der Sepsis äußert sich zunächst in einer hyperdynamen Phase mit gesteigerter Gewebespersion, die später übergeht in die bedrohliche hypodynamen Phase, welche durch eine geringe Gewebespersion, Gewebshypoxie, sinkende Stoffwechselaktivität und ein konsekutives Multiorganversagen gekennzeichnet ist. Als Symptome treten hohes Fieber bzw. Hypothermie, Tachykardie, Tachypnoe und Leukopenie bzw. Leukozytose, oft verbunden mit Hypoxaemie, Oliguria und Azidose auf. Beim septischen Schock tritt zu diesen Symptomen ein trotz adäquaten Volumenersatzes anhaltender Blutdruckabfall auf. Diese Symptomatik einer generalisierten Entzündungsreaktion (englisch: systemic inflammatory response syndrome, SIRS) des Körpers auf eine Infektion kann durch Viren, Parasiten und Pilze, nach Häufigkeit und klinischer Bedeutung jedoch vor allem durch Bakterien ausgelöst werden.

Drei Sepsis-Studien der Jahre 1987/1988 zeigen, daß die Inzidenz isolierter Gram-negativer Bakterien bei 30 % und 80 % und die von Gram-positiven Bakterien bei 6 bis 24 % liegt (4). Somit kommt als Auslöser der Sepsis den Gram-negativen Bakterien ein besonderer Stellenwert zu. Während bei den Gram-positiven Bakteriämien die Koagulase-negative Staphylokokken (gefolgt von Koagulase-positiven Staphylokokken und Streptokokken) überwiegen, macht *Escherichia coli* mit fast 50 %, gefolgt von *Klebsiella pneumoniae* (25 %) und *Pseudomonas aeruginosa*, den bedeutendsten Anteil Gram-negativer Isolate aus dem Blut aus.

Gram-negative Bakterien produzieren zwei Typen von Faktoren, die ein septisches Geschehen auslösen können, nämlich Exotoxine und **Endotoxine**. Exotoxine sind im Zytoplasma gebildete Proteine, die aktiv von Bakterien (vor allem auch von pathogenen Gram-positiven Bakterien) freigesetzt werden. Endotoxine dagegen sind auf der bakteriellen Oberfläche lokalisiert und gelangen erst bei der Zellteilung und, in sepsisrelevanten Mengen, beim Antibiotika-bedingten Zelltod in die Umgebung (5). Nur in freigesetzter, nicht in Bakterien-assoziiierter Form, entfalten Endotoxine biologische Wirksamkeit. Endotoxine sind biologisch höchst aktive Makromoleküle. Schon in Pikogramm Mengen (10^{-12} g) induzieren sie beim Menschen Fieber und Veränderungen im weißen Blutbild.

Die Bedeutung der Endotoxine bei der Sepsis wurde besonders bei der Meningokokkensepsis her-

ausgearbeitet, wo eine klare Korrelation zwischen Schweregrad der Erkrankung und dem Plasmaspiegel von Endotoxin gezeigt werden konnte. So bedeuten über 10.000 pg/ml Endotoxin in der Zirkulation den sicheren Tod des Patienten, während Spiegel unter 100 pg/ml, trotz schwerer pathophysiologischer Symptomatik, mit einer guten Prognose einhergehen (6). Allerdings können auch sehr geringe Endotoxin-Konzentrationen einen irreversiblen Schock induzieren, wenn sich der Wirtorganismus in einem hyperreaktiven Zustand gegenüber Endotoxin befindet, ein Zustand, wie er durch exogene (bakterielle) Produkte (Exotoxine, Peptidoglykan) oder endogene Wirtsfaktoren (γ -Interferon, GM-Colony Stimulation Factor) hervorgerufen werden kann.

Endotoxine entfalten ihre pathophysiologischen Wirkungen bei Säugetieren auf indirekte Weise (7) und unterscheiden sich somit grundlegend von den klassischen Toxinen, wie dem Tetanus- oder Diphtherie-Toxin, welche beispielsweise Zellen direkt schädigen oder die Nervenreizleitung unterbinden.

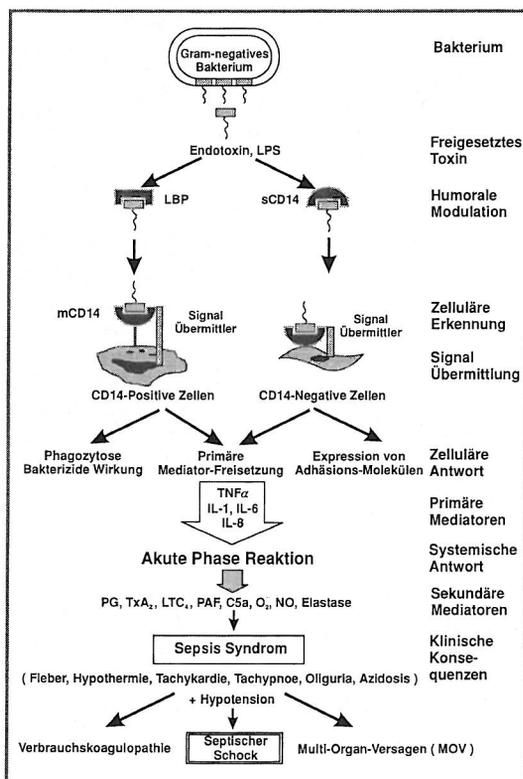


Abb. 2: Schematische Darstellung der kaskadenartig ablaufenden Ereignisse, die von Gram-negative Bakterien ausgehend über die Freisetzung von Endotoxin zum septischen Schock führen (9).

Endotoxine wirken über den Kontakt mit Immunzellen, insbesondere Makrophagen und Endothelzellen, die mit der Bildung und Ausschüttung endogener und toxischer Mediatoren reagieren (Abb. 2). Zu diesen biologisch aktiven Faktoren gehören der Tumor-Nekrose-Faktor α , (TNF α), Interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-8, Prostaglandine, Thromboxan A₂, Leukotriene, Plättchen-aggregierender Faktor, Superoxidanion (O₂⁻), das HO-Radikal und Stickoxid (NO). Unter diesen Faktoren kommt dem TNF α für die Pathogenese des septischen Schocks eine besondere Bedeutung zu. So läßt sich mit isoliertem oder rekombinantem TNF α die Schock-Symptomatik induzieren, wohingegen Anti-TNF α -Antikörper Endotoxin- und TNF α -bedingte Letalität unterdrücken. Schließlich sind Mäuse, bei denen das für den TNF α -Rezeptor (p55) verantwortliche Gen mit Hilfe molekularbiologischer Methoden funktionsuntüchtig gemacht wurde, unempfindlich gegen Endotoxin und TNF α . Nach ihrer Freisetzung können TNF α und die anderen Mediatoren lokal aktiv sein oder auch über den Blutkreislauf zu suszeptiblen Zellen und Organen gelangen, wo sie ihre Wirkung entfalten. Beispielsweise sind für Endotoxin-induziertes Fieber die Mediatoren TNF α , IL-1 und IL-6 verantwortlich, während der Blutdruckabfall durch NO vermittelt wird. So sind es letztlich diese endogenen Mediatoren, die die eigentlichen Vermittler der Endotoxinwirkungen repräsentieren und durch die sich der Organismus selbst schädigen kann. Zu einer Schädigung und letztlich zum septischen Schock kommt es jedoch nur, wenn diese Faktoren im Übermaß produziert werden. Gewisse physiologische Spiegel sind für eine effiziente Erreger-Abwehr und eine geregelte Funktion des Immunsystems sogar unerlässlich. Diese Erkenntnis ist wichtig für Überlegungen zur Sepsistherapie. Ziel solcher Strategien kann nicht eine totale Blockierung der Bildung und Wirkung der Mediatoren, sondern eine gewisse Reduktion der Menge auf nichttoxische Konzentration oder eine Abschwächung der Wirkung sein.

Die Wechselwirkung von Endotoxin mit Makrophagen ist heute in vielen molekularen Details verstanden. Hierzu haben die biochemischen Untersuchungen des Forschungsinstitutes Borstel zur Struktur der Endotoxine allgemein, zur Konformation der toxischen Komponente einerseits und die Charakterisierung von humoralen und zellulären Endotoxinrezeptoren andererseits in besonderer Weise beigetragen.

Endotoxine bestehen aus einer Polysaccharid- und einer Lipoid-Komponente (Lipoid A) und sind aus chemischer Sicht daher **Lipopolysaccharide** (LPS,

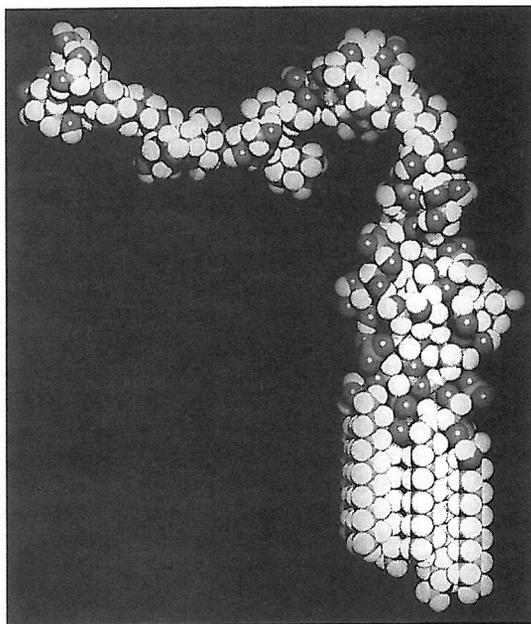
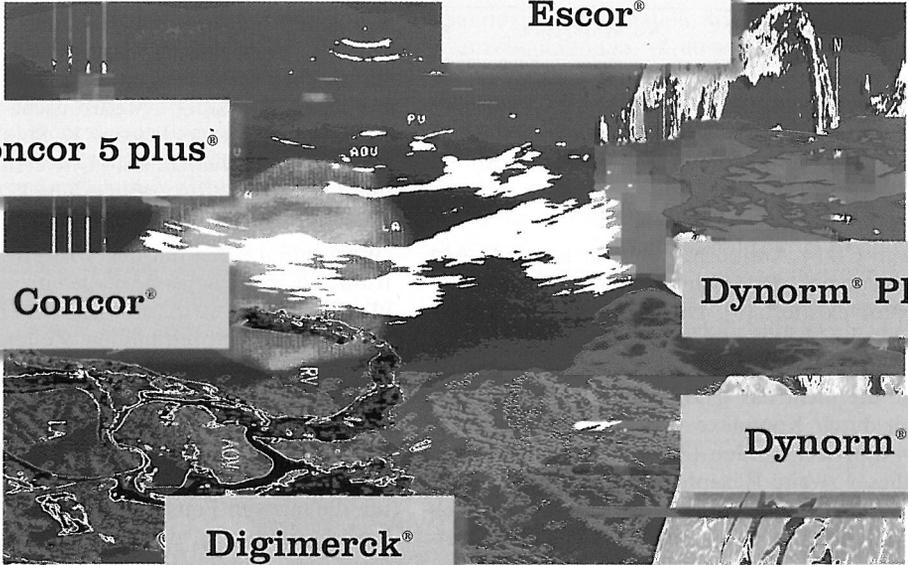


Abb. 3: Molekülmodell eines enterobakteriellen Endotoxins (Lipopolysaccharid)-Moleküls (19).

Abb. 3). Diese prinzipielle Architektur gilt für Endotoxine aller Gram-negativen Bakterien. Als biologisches Wirksprinzip wurde die Lipoid A-Komponente identifiziert, deren Primärstruktur einem in der Natur einmaligen Bauprinzip folgt (8). Lipoid A von *Escherichia coli* besteht aus einem bisphosphorylierten β 1-6 verknüpften D-Glukosamin-Disaccharid, an welches vier (R)-3-Hydroxyfettsäuren, die ihrerseits noch zwei Azylreste tragen, geknüpft sind (Abb. 4). Dieses Strukturprinzip ist sehr konservativ und mit gewissen Variationen bei allen Sepsis-relevanten Gram-negativen Bakterien verwirklicht. Dieser besonderen Primärstruktur des Lipoid A entspricht eine einzigartige Molekülgestalt, der toxischen Konformation, die, wie K.Brandenburg und U.Seydel am Forschungsinstitut Borstel herausfanden, etwa die Form eines abgeschnittenen Kegels besitzt. In dieser toxischen Konformation tritt Lipoid A mit spezifischen Rezeptoren von Immunzellen in Kontakt. Nach heutiger Kenntnis (Abb. 2) wird Endotoxin bzw. die Lipoid A-Komponente zunächst von einem Serumprotein, dem lipopolysaccharide-binding protein (LBP), erkannt; der LPS-LBP-Komplex bindet dann an den auf der Makrophagenoberfläche exprimierten Rezeptor mCD14, einem GPI-verankerten Glykoprotein (MW 53 kD). Da Makrophagen auch dann noch durch größere Mengen Endotoxin stimuliert werden, wenn alle CD14 Moleküle

Therapiekunst, mit der Sie rechnen können



HERZ-
KREISLAUF
MERCK



Ökonomie in
der Therapie

MERCK

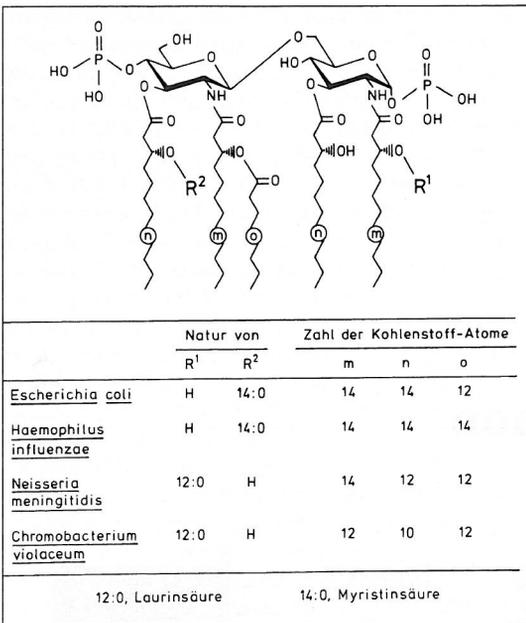


Abb. 4: Chemische Struktur der Lipoid A-Komponente des Endotoxins von *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* und *Chromobacterium violaceum* (8).

mit anti-CD14 Antikörper abgesättigt sind, geht man davon aus, daß noch ein weiterer Endotoxin-Rezeptor existiert (9). Dieser ist möglicherweise auch verantwortlich für die spezifische Bindung von Endotoxin und Aktivierung von Endothelzellen, die nicht das CD14-Molekül exprimieren, jedoch durch Komplexe von LPS und löslichem CD14 aktiviert werden (Abb. 2). Es ist denkbar, daß dieser zweite Rezeptor auch identisch ist mit einem zu fordernden Transmembran-Protein, welches im Zusammenspiel mit mCD14 die Signalvermittlung von der Membran in das Zellinnere vermittelt. Über die Signalumwandlung vom Moment des spezifischen Kontaktes von Endotoxin mit der Zelle, d.h. der Zellaktivierung, bis zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, d.h. der Zytokinbildung, ist erst wenig bekannt. Klassische Signalwege scheinen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, wohingegen die Phosphorylierung und Aktivierung von MAP-Kinasen und zwei weiteren intrazellulären Proteinen (36 und 38 kD) sowie die Azylierung bestimmter Proteine mit einem Derivat der Linolsäure (13-(S)-Hydroxylinolsäure) von Bedeutung sind (10, 11).

Die Identifizierung der kaskadenartig ablaufenden Schlüsselereignisse vom Infektionserreger über die Endotoxinfreisetzung, die Wechselwirkung von

Endotoxin mit Makrophagen/Monozyten und Endothelzellen, die spezifische Aktivierung dieser Zellen, die Bildung von toxischen Mediatoren, insbesondere TNF α , die Wirkung dieser Mediatoren auf Zielzellen bis hin zum Organversagen und irreversiblen Schock, hat zu der Entwicklung und Erprobung zahlreicher unterschiedlicher therapeutischer Prinzipien geführt. Am Forschungsinstitut Borstel, teilweise in Zusammenarbeit mit der Medizinischen Universität zu Lübeck, werden vor allem drei verschiedenartige Strategien zur Sepsistherapie wissenschaftlich verfolgt.

In einem ersten Projekt wird eine Verminderung der Mediatorenbildung, insbesondere von TNF α , angestrebt. Als vielversprechender Wirkstoff hat sich Pentoxifyllin (Rentylin[®]), einem Xanthin-Derivat, erwiesen (12). Pentoxifyllin reduziert einerseits die Bildung von TNF α in Makrophagen und unterdrückt andererseits toxische TNF α -Aktivitäten. Die Wirksamkeit von Pentoxifyllin bei der Sepsis wird derzeit im Rahmen einer doppelblinden, prospektiven, kontrollierten und multizentrischen klinischen Studie unter Leitung von PD Dr. P. Zabel, Medizinische Klinik des Forschungsinstitutes Borstel, K. Staubach, Chirurgische Klinik, Medizinische Universität zu Lübeck und J. Schröder, Chirurgische Klinik, Christian-Albrecht-Universität Kiel, untersucht.

Weiterhin werden mit der Vorstellung, möglichst frühzeitig in die Sepsiskaskade einzugreifen, Lipoid A-verwandte Strukturen entwickelt, die zwar an Endotoxinrezeptoren binden, Zellen jedoch nicht aktivieren. Diese Substanzen könnten als Endotoxin-Antagonisten eingesetzt werden. Wie von H.Loppnow bzw. A.J.Ulmer am Forschungsinstitut Borstel entdeckt bzw. ausführlich untersucht wurde, hemmt eine synthetische Lipoid A-Teilstruktur, die nur vier Fettsäuren enthält und selbst biologisch inaktiv ist, die Endotoxin-induzierte Bildung von Zytokinen, wie IL-1 und TNF α in Makrophagen (13, 14). Andere Lipoid A-Teilstrukturen werden derzeit von U.Zähringer, Forschungsinstitut Borstel, isoliert und hinsichtlich antagonistischer Wirksamkeit analysiert. Ein von W.Christ und Kollegen in Boston (USA) entwickeltes Lipoid A-Derivat vergleichbarer Struktur, die Verbindung E 5531, wird derzeit klinisch auf ihre Wirksamkeit als Medikament zur Sepsistherapie erprobt (15).

Als Hauptstrategie jedoch wird in Borstel durch die Arbeitsgruppe von L. und H.Brade die Entwicklung monoklonaler Antikörper (mAk), die Endotoxine verschiedener Sepsis-relevanter Spezies und Gattungen erkennen, verfolgt (16). Endotoxine stellen für eine Sepsistherapie aus verschie-

denen Gründen ideale Zielstrukturen dar. So repräsentieren Endotoxine einen **exogenen** Faktor im Sepsisgeschehen und die primäre Ursache der Gram-negativen Sepsis. Antikörper gegen Endotoxine erkennen Endotoxine auf der Oberfläche von Bakterien und können als Opsonine wirken. Gleichzeitig erkennen solche Antikörper jedoch auch zirkulierendes Endotoxin und können dessen Neutralisierung und Eliminierung bewirken. Frühere Ansätze zur Entwicklung solcher Antikörper waren zunächst entweder an der mangelnden Kreuzreaktivität oder an der geringen Spezifität und Affinität der mAk gescheitert. So zeigen beispielsweise der humane mAk HA-1A und sein murines Pendant E5 in vitro eine niedrige Avidität für LPS, so daß eine Inaktivierung von Endotoxin in vivo nicht erwartet werden kann. Darüberhinaus erwies sich dieser Antikörper als kreuzreaktiv mit anderen auch in menschlichem Gewebe vorkommenden Molekülen, d.h. als nicht Endotoxin-spezifisch. Diese Umstände erklären teilweise die dramatischen Mißerfolge der klinischen Evaluation dieser Antikörper (17). Bedauerlicherweise haben die so wenig erfolgreichen aber stark propagierten Untersuchungen mit diesen ungeeigneten mAk zu einer weltweiten Skepsis gegenüber einer Immunglobulin-Therapie der Sepsis geführt. Hierbei wird vergessen, daß andere Anti-Endotoxin-Antikörper in Endotoxin- und Infektions-Testsystemen höchst aktiv sind und somit die mangelnde Wirksamkeit von HA-1A und E5 und nicht die Antikörper-Strategie an sich, sondern die Wirkungslosigkeit

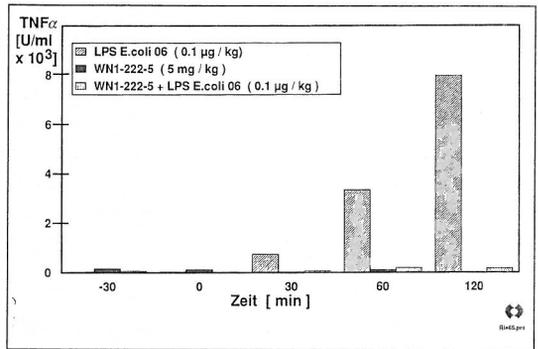


Abb. 5: Unterdrückung der Endotoxin-induzierten Bildung von TNF α in vivo durch den mAk WN1-222-5 in einem Meerschweinchen-Modell (18).

keit der mAk der Grund für den Fehlschlag der klinischen Studien sind.

Gemeinsam mit F. Di Padova und M. Schreier (Sandoz, Basel) haben wir einen hochaffinen, kreuzreagierenden, kreuzschützenden, murinen monoklonalen Antikörper dargestellt, der seine biologische Eigenschaft auch nach einer mit molekularbiologischen Methoden herbeigeführten „Humanisierung“ beibehält (18). Dieser Antikörper neutralisiert Endotoxin aller Serotypen von *Escherichia coli*, *Salmonella* und *Shigella*. So unterdrückt er die Endotoxin-induzierte Bildung von TNF α und, wie erwartet, Letalität in experimentellen in vivo Modellen (Abb.5). Gegenwärtig sind wir damit beschäftigt, mAk zu entwickeln, die auch



**BERNDT
+ KOOP**

SANITÄTSHAUS
Inh. Ralf Schulz
Tel: 0451 / 77941



Orthopädie - Technik

Kompressionsstrümpfe

Bandagen nach Maß

Orthesen

Prothesen

Rollstühle

Königstraße 10 • Lübeck

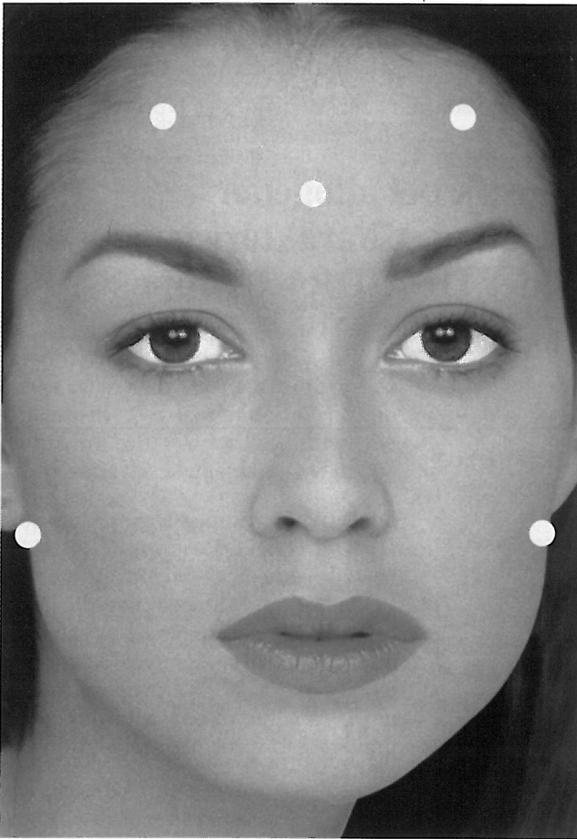
LPS anderer Sepsis-relevanter Bakterien wie *Klebsiella* und *Pseudomonas* erkennen und neutralisieren. Nach Überzeugung der Borsteler Wissenschaftler stellen Antikörper gegen Endotoxin derzeit das vielversprechendste Therapeutikum im Kampf gegen das Sepsis-Syndrom dar. Diese Antikörper unterdrücken spezifisch die destruktiven Eigenschaften eines exogenen pathogenen Faktors (Endotoxin) und interferieren nicht mit der Funktion endogener, möglicherweise physiologisch wichtiger, Komponenten des Wirtes.

Die Entwicklung solcher Antikörper stellt eine enorme wissenschaftliche Herausforderung dar und bedarf weiterer Forschung im Rahmen eines multidisziplinären Ansatzes, der Strukturchemie, Biophysik, Molekularbiologie, Mikrobiologie, Immunologie und nicht zuletzt die Klinische Medizin mit einbezieht. Das Forschungszentrum Borstel erscheint, insbesondere im Verbund mit der Medizinischen Universität zu Lübeck, für dieses Vorhaben besonders geeignet und ist willens, sich einer solchen Herausforderung der klinischen Forschung zu stellen.

Literatur

- Schottmüller H (1914) Wesen und Behandlung der Sepsis. Verhandl dt Kongress Inn Med 31:257-280
- Ziegler E. (1905) Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie. Fischer, Jena
- Young LS and Glauser MP (eds) (1991) Infectious Disease Clinics of North America, Vol. 5, Gram-Negative Septicemia and Septic Shock, Saunders WB, Philadelphia, USA
- Glauser MP, Zanetti G, Baumgartner J-D, and Cohen J (1991) Septic shock: Pathogenesis. Lancet 338:732-736
- Rietschel ETH, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zähringer U, Seydel U, Di Padova F, Schreier M, and Brade H (1994) Bacterial endotoxins: Molecular relationship of structure to activity and function. FASEB J 218:217-225
- Brandtzaeg P, Kierulf P, and Gaustad P (1989) Plasma endotoxin as a predictor of multiple organ failure and death in systemic meningococcal disease. J Infect Dis 159:195
- Rietschel ETH and Brade H (1992) Bacterial endotoxins. Scientific American 267:26-33
- Zähringer U, Lindner B, and Rietschel ETH (1994) Molecular structure of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides. Adv Carbohydr Chem Biochem 50:211-276
- Schumann RR, Rietschel ETH, and Loppnow H (1994) The role of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the activation of different cell types by endotoxin. Med Microbiol Immunol 183:279-297
- Schade FU, Engel R, and Jakobs D (1991) Differential protective activities of site specific lipoxygenase inhibitors in endotoxic shock and production of tumor necrosis factor. Int J Immunopharmacol 13:565-571
- Heine H, Ulmer AJ, Flad H-D, and Hauschildt S (1995) LPS-induced change of phosphorylation of two cytosolic proteins in human monocytes is prevented by inhibitors of ADP-ribosylation. J Immunol, in press
- Zabel P, Wolter DT, Schönharting MM, Schade FU (1989) Oxpentifylline in endotoxaemia. Lancet 334:1474
- Loppnow H, Brade H, Dürbaum I, Dinarello CA, Kusumoto S, Rietschel ETH, and Flad H-D (1989) Interleukin 1 induction-capacity of defined lipopolysaccharide partial structures. J Immunol 142:3229-3238
- Ulmer AJ, Feist W, Heine H, Kirikae T, Kirikae F, Kusumoto S, Kusama T, Brade H, Schade FU, Rietschel ETH, and Flad H-D (1992) Modulation of endotoxin-induced monokine release in human monocytes by lipid A partial structures inhibiting the binding of ¹²⁵I-LPS. Infect Immun 60:5145-5152
- Christ WJ, Asano O, Robidoux ALC, Perez M, Wang Y, Dubuc GR, Gavin WE, Hawkins LD, McGuinness PD, Mullarkey MA, Lewis MD, Kishi Y, Kawata T, Bristol JR, Rose JR, Rossignol DP, Kobayashi S, Hishinuma I, Kimura A, Asakawa A, Asakawa N, Katayama K, and Yamatsu I (1995) E5531, a pure endotoxin antagonist of high potency. Science 268:80-83
- Brade L, Holst O, and Brade H (1993) An artificial glycoconjugate containing the bisphosphorylated glucosamine disaccharide backbone of lipid A binds lipid A monoclonal antibodies. Infect Immun 61:4514-4517
- Baumgartner J-D and Glauser M-P (1993) Immunotherapy of endotoxemia and septicemia. Immunobiol 187:464-477
- Di Padova FE, Brade H, Barclay R, Poxton IR, Liehl E, Schuetze E, Kocker HP, Ramsay G, Schreier MH, McClelland DBL, and Rietschel ETH (1993) A broadly cross-protective monoclonal antibody binding to *Escherichia coli* and *Salmonella* lipopolysaccharides. Infect Immun 61:3863-3872
- Kastowsky M, Gutberlet T, and Bradaczek H (1992) Molecular modelling of the three-dimensional structure and conformational flexibility of bacterial lipopolysaccharide. J Bacteriol 174:4798-4806

Dräger



Mit dem neuen pEEG-Monitor von Dräger. Er liefert ergänzende Daten über die »Narkosetiefe«,

Anästhesie-Kontrolle mit Köpfchen.

wo bisher unspezifische Steuerungsparameter nicht ausreichten. Durch Monitoring am



Zielorgan erhält der Anästhesist ein klares Bild von der richtigen

Dosierung. Das geht ganz einfach mit fünf Meßsensoren. Und ist viel

preisgünstiger als man denken sollte. Mehr Informationen kosten nur einen Anruf. Bei

Drägerwerk AG, Medizintechnik, Telefon (0451) 882-0.

Dräger. Technik für das Leben.

Aus dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, Medizinische Universität zu Lübeck (Direktor Prof. Dr. med. H. Kirchner)¹ und der DRK Blutspendezentrale Ulm²:

Molekulare HLA-Diagnostik bei allogener Knochenmarktransplantation. Charakterisierung des Mikropolymorphismus der HLA-DR4-Gruppe.

G. Bein¹, M. Johannsen¹, K. Böttcher¹, D. Haase¹, T.H. Eiermann²,
H. Kirchner¹

Zusammenfassung

Die Auswahl eines nicht verwandten Spenders für eine allogene Knochenmarktransplantation basiert auf der möglichst vollständigen Übereinstimmung im HLA-System zwischen Spender und Empfänger. Viele HLA-Allele sind durch reziproken Austausch von kurzen Sequenzmotiven mit Allelen des gleichen Genortes oder anderer HLA-Genorte entstanden. Sie lassen sich bei heterozygoten Personen nur durch den Nachweis von bis zu vier Sequenzmotiven in *cis* voneinander unterscheiden. Bisher publizierte Typisierungstechniken führen bei heterozygoten Personen häufig zu mehrdeutigen Ergebnissen. Wir entwickelten am Beispiel der DR4-Familie ein Verfahren zur Analyse der Allele DRB1*0401-0412 durch *nested* PCR mit sequenzspezifischen Primern (*nested* PCR-SSP) und zeigten, daß alle Allele in jeder heterozygoten Kombination identifiziert werden können. Eine Blindstudie (n=51) ergab eine Sensitivität und Spezifität von 100 %. Wir schlagen die PCR-SSP-Technik in Kombination mit der direkten Sequenzierung als universelles Verfahren zur hochauflösenden HLA-Typisierung vor.

Summary

The selection of unrelated allogeneic bone marrow donors is based on the highest possible compatibility of the HLA system between donor and recipient. Many alleles have been generated by reciprocal exchange of sequence motives between alleles of the same locus or other HLA loci. The identification of a given allele in heterozygous individuals is only possible by the detection of up to four sequence motives in *cis* position. Previously published techniques frequently reveal ambiguous results in the investigation of heterozygous indi-

viduals. We developed a procedure for the typing of alleles of the DR4 group (DRB1*0401-0412) by nested sequence-specific primed PCR (*nested* PCR-SSP) and showed that all alleles can be identified in all heterozygous combinations. A blind quality control study revealed a sensitivity and specificity of 100 %. We propose the PCR-SSP technique in combination with direct sequencing as a universal tool for high resolution typing of HLA-alleles.

Einleitung

HLA-Moleküle sind die wichtigsten Transplantationsantigene. Der langfristige Transplantationserfolg hängt von der Übereinstimmung der HLA-Antigene zwischen Organspender- und Empfänger ab. Die mittlere Überlebenszeit eines Nierentransplantates ist bei vollständiger Kompatibilität der HLA-A, B (HLA-Klasse I-Antigene) und DR-Antigene (HLA-Klasse II-Antigene) annähernd doppelt so lang wie bei kompletter Nichtübereinstimmung (10, 11). Wir führten ein neues molekulargenetisches Verfahren in die HLA-DR-Typisierung (DR1-18) ein, das erstmals den Einsatz der DNA-Analyse in der prospektiven Gewebetypisierung von Organspendern erlaubte (1, 5). Damit konnte die außerordentlich fehlerbehaftete serologische Typisierung ersetzt werden. Retrospektive Analysen zeigen, daß der Langzeiterfolg der Nierentransplantation durch Einführung der DNA-Typisierung deutlich verbessert werden kann.

Dem Verfahren liegt die sequenzspezifische PCR-Amplifikation (PCR-SSP) zugrunde: *Taq*-Polymerase besitzt keine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität. Ein Basen-*mismatch* am 3'-Terminus eines Primers wird unter geeigneten Versuchsbedingungen durch

Taq-Polymerase nicht extendiert. Dieses Prinzip erlaubt die direkte Feststellung einer Punktmutation durch ein einfaches PCR-Experiment. Findet sich am 3'-Terminus eines der beiden PCR-Primer ein Basen-*mismatch* gegenüber der Matrize, unterbleibt die PCR-Amplifikation; findet sich ein Basen-*match*, läßt sich anschließend ein PCR-Produkt nachweisen.

Der Polymorphismus im HLA-System ist u.a. durch Austausch kurzer Gensegmente zwischen verschiedenen Allelen und Genorten entstanden. Die exakte Bestimmung der Allele an heterozygoten Personen erfordert daher die physikalische Zuordnung von zwei oder mehr Sequenzmotiven zu einem DNA-Segment (*cis*-Konfiguration). Ein PCR-SSP-Experiment gibt Aufschluß über die physikalische Kopplung der Sequenzmotive an den 3'-Termini beider Primer. Nur wenn diese an der Matrize in *cis* vorhanden sind, findet eine exponentielle PCR-Amplifikation statt. Wird das sequenzspezifische *Priming* mit einem zweiten Paar geschachtelter (*nested*) Primer durchgeführt, können bis zu vier Sequenzmotive in *cis* nachgewiesen werden.

Im Laufe der Phylogenese bildeten sich im HLA-System durch Mutation und Rekombination Allelfamilien mit zahlreichen homologen Mitgliedern. Innerhalb dieser Familien findet sich ein supertypisches Sequenzmotiv sowie eine begrenzte Zahl variabler Residuen (Mikropolymorphismus). Eine typische HLA-Allelfamilie ist die HLA-DR4-Gruppe, zu der jetzt 22 Allele (bei Kaukasiern werden im wesentlichen nur acht davon nachgewiesen) gehören. Die Kenntnis des DNA-Mikropolymorphismus in den Klasse II-Allelfamilien ist für die Spenderauswahl vor einer allogenen Knochenmarktransplantation entscheidend. Die konventionellen Typisierungstechniken ergeben bei heterozygoten Personen häufig mehrdeutige Resultate. Wir entwickelten ein Verfahren zur Analyse der DR4-Familie durch *nested* PCR-SSP und zeigten, daß alle genannten Allele in jeder heterozygoten Kombination identifiziert werden können. Damit kann die Klonierung der entsprechenden Gensegmente auf einfache Weise umgangen werden.

Material und Methoden

Referenz-Zelllinien und DNA für eine Blindstudie

B-lymphoblastoide Zelllinien des 10. Internationalen Histokompatibilitäts-Workshop (IHW) wurden als Referenz eingesetzt. Die folgenden Zelllinien besitzen Allele der DR4-Gruppe: SAVC, DRB1*0401; YAR, DRB1*0402; KT17, 0403,0406;

SSTO, DRB1*0404; BM92, DRB1*0404; PE117, DRB1*0404; LKT3, DRB1*0405.

DNA für eine Blindstudie wurde in Ulm (T.H. Eiermann) durch PCR-Amplifikation mit Exon 2-flankierenden Primern und anschließender Hybridisierung mit Sequenz-spezifischen Oligonukleotiden untersucht, kodiert und durch PCR-SSP typisiert.

DNA-Extraktion

DNA aus Zelllinien oder Blutleukozyten wurde durch die Salzfällungsmethode nach *Miller* extrahiert.

Optimierung des Probensatzes

Die Optimierung des Probensatzes erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms „Minprobe“ (8).

Oligonukleotidsequenzen und PCR-Primerkombinationen

Die Sequenz, die Schmelztemperatur (T_m , *nearest neighbour*-Methode bei einer Nukleinsäurekonzentration von 250 pmol/l und einer Salzkonzentration von 50 mmol/l) und der molare Absorptionskoeffizient (nmol/OD 260 nm) der verwendeten PCR-Primer ist in Tabelle 1 angegeben (beide Parameter wurden mit dem Programm von *Rychlik* und *Rhoads* (13) berechnet). Die eingesetzten Primerkombinationen sind in Tabelle 2 angeführt.

PCR-Amplifikation

PCR-Experimente wurden in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Jeder Ansatz enthielt jeweils 0,5 Einheiten rekombinante Taq-Polymerase (Perkin Elmer, Vaterstetten), jeweils 0,2 mmol/l der dNTP's, jeweils 0,5 µmol/l der beiden HLA-DRB1-spezifischen Primer, 1 x PCR-Puffer (50 mmol/l KCl, 10 mmol/l Tris-HCl, 1,5 mmol/l MgCl₂, 0,001% (w/v) Gelatine) und jeweils 0,2 µmol/l der beiden Primer für die interne Positivkontrolle. Der Einsatz der Kontrollprimer erzeugt ein 439 bp großes PCR-Fragment aus dem Gen für das humane Wachstumshormon (1). Im ersten Amplifikationsschritt wurden jeweils 50 ng DNA einer Zelllinie oder Person in zwei getrennten Ansätzen untersucht. Ansatz 1 ist spezifisch für alle DR4-Allele mit GTG an Codon 86. Ansatz 2 ist spezifisch für alle DR4-Allele mit GGT an Codon 86. Die PCR-Reaktion wurde auf dem PCR-System 9600 (Perkin Elmer, Vaterstetten) bei 94 °C Schmelztemperatur für 10 s und einem kombinierten *Annealing*- und Syntheseschritt bei 62 °C für 30 s mit 20 Zyklen durchgeführt. Anschließend wurde ein Aliquot von 5 µl PCR-Produkt entnommen

Primer	Sequenz (5'-3')	Tm	nmol/ OD 260
0401/13/II	ACGTTTCTTGGAGCAGGTAAACA	56,0	4,21
0401/86/II	TGCACTGTGAAGCTCTCAC	46,0	5,79
0402/86	GCTGCACTGTGAAGCTCTCCA	55,4	5,25

Tabelle 1a. Konsensusprimer für die Amplifikation von HLA-DRB1*04-Subtypen¹

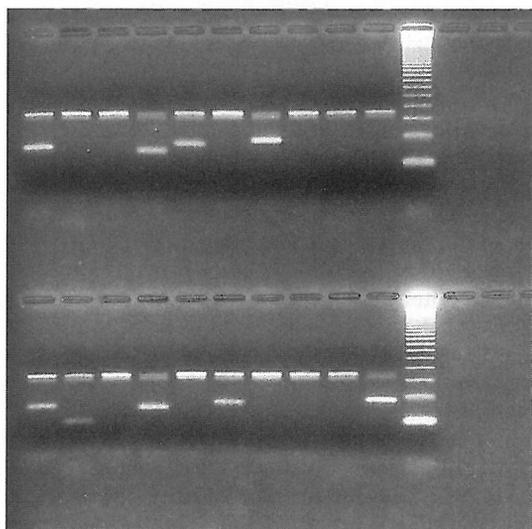
¹ Der *upstream*-Primer (0401/13/II) hybridisiert an die Konsensussequenz aller DRB1*04-Allele in der ersten hypervariablen Region. Die beiden *downstream*-Primer hybridisieren jeweils an eines der beiden Sequenzmotive an Codon 86 (GTG oder GGT). Sie wurden in zwei getrennten Ansätzen in der ersten Amplifikationsrunde der *nested* PCR zur HLA-DRB1*04-Subtypisierung eingesetzt.

Primer	Sequenz (5'-3')	Tm	OD 260
0401/57	TGGCTGTTCCAGTACTCGGCAT	58,2	5,00
1303/57	GGCTGTTCCAGTACTCGGCGCT	61,4	5,10
0401/71	TGTCCACCGCGCCCGCT	66,3	6,63
1402/71	CCACCGCGGCCCGCC	63,8	8,17
1402/74	TGTGTCTGCAGTAGGTGTCCACCG	60,8	4,47
0403/74	TCTGCAGTAGGTGTCCACCT	49,0	5,46
0409/57	CGGAGCTGGGGCGGCCTAG	63,5	5,63
0401/37	GACAGATACTTCTATCACCAAGAGGAGTA	54,2	3,35
0406/37	GTCGCTGTGCAAGCGCACGG	60,9	5,40
0402/71	CCACCGCGGCCCGCTC	62,4	7,59
0801/74	GTTGTGTCTGCAGTAGGTGTCCACCAG	61,8	3,91

Tabelle 1b. Primer für die Amplifikation von HLA-DRB1*04-Subtypen

und 1:100 in Wasser verdünnt. Jeweils 5 µl des verdünnten PCR-Produktes wurden in einer 2. PCR mit den in Tabelle 2 angegebenen Primerpaaren

untersucht. Die 2. PCR wurde für 25 Zyklen mit einer auf 69 °C angehobenen *Annealing*-Temperatur durchgeführt.



Analyse der PCR-Produkte

Jeweils 10 µl PCR-Produkt wurden durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, durch anschließende Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

Abbildung 1. Darstellung der PCR-Produkte nach Agarosegelelektrophorese. Als DNA-Längenstandard diente eine 123 bp Leiter (jeweils äußerste rechte Spur). In allen anderen Spuren ist die interne Positivkontrolle, ein 439 bp Fragment aus dem Gen für das Wachstumshormon sichtbar. Obere Bildhälfte: Die HLA-spezifischen PCR-Produkte des Alleles HLA-DRB1*0402 sind in Spur 1, 4, 5 und 7 sichtbar (von links, Primersets H/4, A/4, J/4, E/4). Untere Bildhälfte: Die HLA-spezifischen PCR-Produkte einer heterozygoten Zelle mit den Allelen HLA-DRB1*0403,0406 sind in Spur 1, 2, 4, 6 und 10 sichtbar (von links, Primersets H/4, A/4, D/4, F/4).

Primer-Set	Upstream Primer	Downstream Primer	Amplifizierte Allele	Produkt (bp)
DR4 I ²	0401/13/II	0401/86/II	DRB1*0401/5/7/8/9/>(*1410) ⁴	261
DR4 II ²	0401/13/II	0402/86	DRB1*0402/3/4/6/10/11/12	263
A/4	0401/13/II	0401/57	DRB1*0401/7/8	177
B/4	0401/13/II	1303/57	DRB1*0405/9	176
C/4	0401/13/II	0401/71	DRB1*0401/9	215
D/4	0401/13/II	1402/71	DRB1*0405/7/8 (*1410)	212
E/4	0401/13/II	1402/74	DRB1*0401/5/8/9	230
F/4	0401/13/II	0403/74	DRB1*0407 (*1410)	226
G/4	0409/57	0401/71	DRB1*0409	78
H/4	0401/37	DRB/87	DRB1*0402/3/4/10/11/12	199
I/4	0401/13/II	0406/37	DRB1*0406	115
B/4	0401/13/II	1303/57	DRB1*0410/11/12	176
A/4	0401/13/II	0401/57	DRB1*0402/3/4/6	177
J/4	0401/13/II	0402/71	DRB1*0402	212
D/4	0401/13/II	1402/71	DRB1*0403/4/6/10/11/12	212
E/4	0401/13/II	1402/74	DRB1*0402/4/10	230
K/4	0401/13/II	0801/74	DRB1*0412	232
L/4	0409/57	0403/74	DRB1*0411	89
F/4	0401/13/II	0403/74	DRB1*0403/6/11	226

Tabelle 2. Primerkombinationen¹ für die Identifikation der HLA-DRB1*04-Subtypen durch die PCR-SSP Technik

¹ Die Allele DRB1*0413-0422 wurden hier nicht berücksichtigt (siehe Diskussion)

² Konsensus-Primerkombinationen für die 1. PCR-Amplifikation. Grau hinterlegt sind diejenigen Primerkombinationen, mit denen das verdünnte Amplifikat aus dem 1. Ansatz (DR4 I) erneut amplifiziert wird. In den übrigen, nicht hinterlegten Ansätzen wird Amplifikat aus dem 2. Konsensus-Ansatz (DR4 II) als Matrize eingesetzt.

³ Wird mehr als ein Allel amplifiziert, sind die Allele durch einen Schrägstrich getrennt. Bei Übereinstimmung der ersten Ziffern der Allel-Nummer wurden diese weggelassen (z.B. DRB1*0401 und DRB1*0405 = DRB1*0401/5).

⁴ Das Allel DRB1*1410 gehört nicht in die DR4-Subgruppe.

Ergebnisse

Die Gruppe der DR4-Allele zeichnet sich durch mehrere Allele aus, die formal durch reziproken Sequenzaustausch auseinander hervorgegangen sein könnten. Folglich muß ein molekulargenetisches Analyseverfahren die *cis*- und/oder *trans*-Position eines Sequenzmotives bei heterozygoten Personen nachweisen können. Wir analysierten zunächst unter Einsatz des Computer-Programms "Minprobe" (8) die theoretisch möglichen Probenätze. Unter "Probe" verstehen wir hier entweder eine Oligonukleotid-Sonde für das PCR-SSO-Verfahren oder ein Primer-Paar für das PCR-SSP-Verfahren. Eine Probe kann jeweils ein oder mehrere Allele nachweisen. Die folgende Matrix zeigt einen optimierten Probensatz für die Hybridisierung der DR4-Allele nach gruppenspezifischer Amplifikation mit Oligonukleotiden (PCR-SSO). Analy-

siert wurden die Allele DRB1*0401-0412. Alle theoretisch möglichen und informativen Sonden wurden in die Matrix aufgenommen (Tabelle 3). Von allen möglichen Reaktionsmustern, welche die hetero- und homozygoten Kombinationen der 12 DR4-Subtypen erzeugen können, bleiben 15 Reaktionsmuster mehrdeutig. Die gleiche Analyse wurde für einen publizierten Probensatz (15) durchgeführt, der für direktes, sequenzspezifisches Priming entworfen wurde (DRB1*0401-0411). Auch hier bleiben 39 Reaktionsmuster mehrdeutig (Daten nicht gezeigt). Wir entwarfen daher eine Strategie, um durch *nested* Priming eine eindeutige Identifikation der DR4-Subtypen in allen heterozygoten Kombinationen zu erzielen. Zunächst teilten wir die DR4-Subtypen in zwei Gruppen. Hierzu nutzten wir den Dimorphismus an Codon 86. Ein Teil der Allele besitzt an Codon 86 das Triplet

Probensatz!:

Probe:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Codon:	37	37	57	57	71	71	71	74	74	74	86	86
AS:	S	Y	D	S	R	K	E	A	E	L	G	V

Allel:

DRB1*0401	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
DRB1*0402	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
DRB1*0403	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
DRB1*0404	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
DRB1*0405	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-
DRB1*0406	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
DRB1*0407	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
DRB1*0408	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
DRB1*0409	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
DRB1*0410	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
DRB1*0411	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+
DRB1*0412	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+

¹ Die theoretisch möglichen 12 Proben sind zusammen mit dem jeweils informativen Codon und der hier kodierten Aminosäure (AS, single letter code) angeführt.

+ = Probe hybridisiert.

- = Probe hybridisiert nicht.

Probe 1-12

Allele:

+++++--+++	0404 0409
+++++--+++	0401 0410
+++++--++-	0408 0409
+++++--++-	0401 0405
+++++--+++	0403 0409
+++++--+++	0401 0411
+++--+++	0403 0405
+++--+++	0408 0411
+++--+++	0407 0410

Probe 1-12:

+++++--+++
+++++--+++
+++++--+++
+++++--+++
+++--+++
+++--+++

Allele:

0403 0410
0404 0411
0404 0405
0408 0410
0403 0408
0404 0407

Ergebnis der Minprobe-Analyse nach Optimierung des Probensatzes: 15 Reaktionsmuster in 7 Gruppen lassen sich nicht unterscheiden.

Tabelle 3. DR4-Subtypisierung durch PCR-SSO. Von allen möglichen Reaktionsmustern, welche die hetero- und homozygoten Kombinationen der 12 DR4-Subtypen erzeugen können, bleiben 15 Reaktionsmuster mehrdeutig.

GGT (Glycin), ein anderer Teil der Allele (Gruppe 2) besitzt hier das Triplet GTG (Valin). Wir synthetisierten zwei gruppenspezifische Primersets. Der *upstream*-Primer hybridisiert an die Konsensussequenz aller DR4-Allele an Codon 13, der *downstream*-Primer jeweils an eines der genannten Sequenzmotive an Codon 86. Für beide Gruppen wurden *nested* Primersets entworfen und auf Mehrdeutigkeit und Redundanz mit dem Computerprogramm "Minprobe" (8) überprüft. Das Er-

gebnis dieser Analyse ist in Tabelle 4 angeführt. Kein Reaktionsmuster ist mehrdeutig. Theoretisch konnte mithin ein Satz von Primerpaaren definiert werden, der die Identifikation der Allele DRB1*0401-0412 in jeder beliebigen Kombination untereinander erlauben sollte. Nach dieser Vorgabe synthetisierten wir die entsprechenden Primer und optimierten durch Testreihen an homozygoten Referenz-Zelllinien, wo dies notwendig war, die Primerlänge. Nach Festlegung des Protokolls (sie-

Gruppe 1 (GGT (Glycin) an Codon 86)

Probensatz¹:

Primersets: A B C D E F G

Allel:

DRB1*0401	+	-	+	-	+	-	-
DRB1*0405	-	+	-	+	+	-	-
DRB1*0407	+	-	-	+	-	+	-
DRB1*0408	+	-	-	+	+	-	-
DRB1*0409	-	+	+	-	+	-	+

Gruppe 2 (GTG (Valin) an Codon 86)

Primersets: H I B A J D E K L F

Allel:

DRB1*0402	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-
DRB1*0403	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+
DRB1*0404	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-
DRB1*0406	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
DRB1*0410	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
DRB1*0411	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
DRB1*0412	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-

¹ Design der Primersets siehe Material und Methoden.

+ = Amplifikation.

- = Keine Amplifikation.

Ergebnis der Minprobe-Analyse: Kein mehrdeutiges Reaktionsmuster

Tabelle 4. DR4-Subtypisierung durch nested PCR-SSP

he Material und Methoden) wurde eine Blindstudie an 51 DNA-Proben durchgeführt, die mindestens ein Allel der DR4-Subgruppe aufwiesen. Die Blindstudie zeigte keine Abweichungen vom Ergebnis der Referenzmethode. Von den untersuchten 55 DR4-Allelen, die vorwiegend kaukasischer Herkunft waren, gehörten alle einem der Subtypen DRB1*0401-0408 an.

Diskussion

Der Polymorphismus im HLA-System ist weniger durch neue Punktmutationen, als durch reziproken Sequenzaustausch zwischen verschiedenen Genorten und unter den Allelen eines Genortes entstanden (3). Hieraus ergibt sich das wichtigste Problem der molekulargenetischen HLA-Analytik. Die Zuordnung eines polymorphen Sequenzmotivs zu einem bestimmten Genort und hier zu einem bestimmten Allel setzt bei heterozygoten Personen die Information voraus, ob das Sequenzmotiv in *cis*

oder *trans* zu anderen Sequenzmotiven steht. Der in der vorliegenden Arbeit am Beispiel des Mikropolymorphismus der DR4-Gruppe entwickelte Lösungsweg für dieses Problem sei an dem folgenden Beispiel diskutiert, das prototypisch für den HLA-Polymorphismus steht (Tabelle 5):

Die in Tabelle 5 gezeigten Allele können formalgenetisch durch reziproken Austausch von Gensegmenten auseinander hervorgegangen sein. Eine Konversion des Sequenz-Motivs DRB1:71:K¹ vom Allel DRB1*0401 auf das Allel DRB1*0405 und umgekehrt generiert zwei neue Allele: DRB1*0408 und DRB1*0409. Da die Sequenzmotive 57:S und 71:K an vielen anderen Allelen des Genortes DRB1 vorkommen, muß zunächst für jede Analyse des Mikropolymorphismus in der

¹ Nach einem Vorschlag der WHO-Nomenklatur-Kommission werden Sequenzmotive nach folgendem Prinzip benannt: Genort: Codon: Aminosäuren in *single letter code* (2)

	10	50	60	70	80
DRB1*0101	LWQLKFEC	AVTELGRPDAEYWN	SQKDLL	EQRRRA	AVDTYCRHNYGVG
DRB1*0401	-E-V-H—	-----	-----	-----	-----K-----
DRB1*0405	-E-V-H—	-----	-----S-----	-----	-----
DRB1*0408 ²	-E-V-H—	-----	-----	-----	-----
DRB1*0409 ²	-E-V-H—	-----	-----S-----	-----	-----K-----

² Die Sequenz dieser Allele ist erst *downstream* von Codon 13 bekannt. Es kann für didaktische Zwecke angenommen werden, daß von Codon 9-13 die Konsensussequenz der DR4-Gruppe vorliegt.

Tabelle 5: Allele der DR4-Subgruppe¹

¹ Ausschnitte der Aminosäuresequenzen von vier Allelen der DR4-Subgruppe. Identität mit der Sequenz des Alleles DRB1*0101 ist durch einen Strich symbolisiert.

DR4-Subgruppe eine gruppenspezifische Amplifikation vorausgehen. Hierzu kann ein *upstream*-Primer an Codon 13 und ein *downstream*-Primer an Codon 87 (Konsensus) gewählt werden (4). Das Sequenzmotiv DRB1:9-13:EQVKH kommt mit einer Ausnahme nur an Allelen der DR4-Subgruppe vor, und man erhält folglich ein gruppenspezifisches Amplifikat. Eine Hybridisierung mit den 4 möglichen informativen Sonden für die jeweiligen Sequenzmotive an Codon 57 und 71 (57:D, 57:S, 71:R, 71:K) ergibt in beiden heterozygoten Kombinationen (DRB1*0401/DRB1*0405 und DRB1*0408/DRB1*0409) mit allen vier Sonden ein positives Signal. Das Ergebnis der Analyse bleibt mehrdeutig.

Das PCR-SSP-Verfahren erlaubt hingegen durch *nested* sequenzspezifisches Priming an Codon 57 und 71 den Nachweis, ob die jeweiligen Sequenzmotive in *cis* vorkommen. Ein Primerpaar mit Spezifität für die Sequenzmotive 57:D (*upstream*) und 71:K (*downstream*) generiert in einem entsprechenden PCR-Experiment ein Amplifikat nur dann, wenn das Allel DRB1*0401 vorhanden ist, unabhängig von allen anderen Sequenzmotiven in *trans*. Folglich kann in diesem Beispiel jedes einzelne Allel in jeder heterozygoten Kombination positiv identifiziert werden.

Eine PCR mit geschachtelten Primern wurde bereits von Mullis und Faloona beschrieben (7). Die Autoren setzten dieses Prinzip ein, um die Sensitivität eines PCR-Experimentes zu erhöhen. Wenn das sequenzspezifische Priming mit geschachtelten Primern kombiniert wird, kann ein hohes Maß an Auflösung in der Analyse komplexer, polymorpher Erbsysteme erzielt werden. Dies gilt besonders, wenn der Polymorphismus während der Phylognese vorwiegend durch Genduplikation und Genkonversion generiert wurde. Hier ist die PCR-SSP-Technik mit *nested* Primern den anderen vor-

geschlagenen Verfahren überlegen. Die klassische Untersuchung von PCR-Produkten durch Hybridisierung mit Oligonukleotid-Sonden ist für eine eindeutige Charakterisierung des Mikropolymorphismus am Genort HLA-DRB1 (und anderen HLA-Genorten) mit jedem neu charakterisierten Allel zunehmend weniger geeignet.

Mit jedem „neuen“ Allel nimmt die Zahl der heterozygoten und homozygoten Kombinationen (Genotypen) mit der Funktion

$$g = \frac{n^2}{2} + \frac{n}{2}$$

(g, Zahl der Genotypen; n, Zahl der Allele) zu. Folglich gibt es heute 7260 Genotypen am Genort HLA-DRB1 (120 Allele), von denen zahlreiche prinzipiell durch Hybridisierung mit Sonden nicht voneinander unterschieden werden können. Ein weiteres Verfahren, die Untersuchung der PCR-Produkte durch Restriktionsenzyme (PCR-RFLP) wurde ebenfalls zur Charakterisierung des Mikropolymorphismus im HLA-System vorgeschlagen (6,12). Die Technik hat sich nicht durchgesetzt, da viele Enzyme simultan in vielen Kombinationen eingesetzt werden müssen, um zu einer eindeutigen Charakterisierung heterozygoter Personen zu kommen. Eine andere Arbeitsgruppe hat die direkte Sequenzierung Heterozygoter vorgeschlagen (14). Abgesehen von technischen Problemen bei der eindeutigen Erkennung der jeweiligen Basen gibt es hier ebenfalls das oben diskutierte und nicht lösbare Problem der *cis/trans*-Zuordnung.

Die Zahl der in einer gegebenen Population tatsächlich vorkommenden Allele ist deutlich geringer, als die Zahl der publizierten und offiziell anerkannten Spezifitäten. Viele HLA-Allele finden sich nur in Volksstämmen mit regional begrenzter Verbreitung. So kamen in dieser Studie nur 8 von

22 Allelen der DR4-Gruppe vor. Aus ökonomischen Gründen ist daher bei der Typisierung des Mikropolymorphismus im HLA-System ein individuelles und abgestuftes Vorgehen sinnvoll: Nach einer Typisierung der häufigsten Spezifitäten durch *nested* PCR-SSP mit wenigen individuellen ausgewählten Primerkombinationen werden die PCR Produkte anschließend je nach vorliegendem Genotyp zum Ausschluß seltener Allele direkt sequenziert. Hierdurch werden die Probleme der direkten Sequenzierung Heterozygoter umgangen. Die PCR-SSP-Technik (1,9) hat sich in der HLA-Typisierung von Organ Spendern und -Empfängern außerordentlich bewährt, da das Ergebnis der Untersuchung bereits wenige Stunden nach der Blutentnahme vorliegt. Wir zeigen in der vorliegenden Arbeit, daß die gleiche Technik in Verbindung mit der Sequenzierung die Methode der Wahl in der Charakterisierung komplexer polymorpher Erbsysteme ist.

Literatur

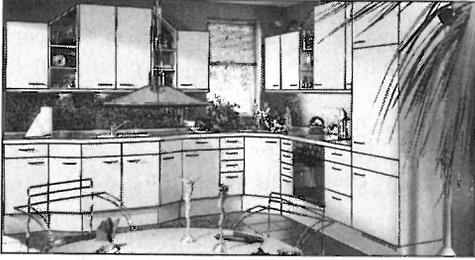
1. Bein G, Gläser R, Kirchner H: Rapid HLA-DRB1 genotyping by nested PCR amplification. *Tissue Antigens* 39, 68-73 (1992)
2. Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Dupont B, Erlich HA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Sasazuki T, Schreuder GMT, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI: Nomenclature for factors of the HLA system, 1991. *Tissue Antigens* 39, 161-173 (1992)
3. Erlich HA, Gyllensten UB: Shared epitopes among HLA class II alleles: gene conversion, common ancestry and balancing selection. *Immunol Today* 12, 411-414 (1991)
4. Gao XJ, Fernandez-Vina MA, Shumway W, Stastny P: DNA typing for class II HLA antigens with allele-specific or group-specific amplification. I. Typing for subsets of HLA-DR4. *Hum Immunol* 27, 40-50 (1990)
5. Gläser R, Eiermann TH, Fricke L, Kirchner H, Bein G: HLA DNA preargen retrieval donor typing in renal transplantation. *Vox Sang* 65, 300-302 (1993)
6. Jawaheer D, Ollier WER, Thomson W: Multiplex ARMS-RFLP - a simple and rapid method for HLA-DR4 subtyping. *Eur J Immunogenet* 20, 175-187 (1993)
7. Mullis KB, Faloona FA: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350 (1987)
8. Müller CR, Eiermann TH: How many probes are needed for HLA-DPB1 typing with sequence-specific oligonucleotide probes? A theoretical approach using computer simulation. *Hum Immunol* 30, 22-26 (1991)
9. Olerup O, Zetterquist H: HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours - an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 39, 225-235 (1992)
10. Opelz G, Schwarz V, Engelmann A, Back D, Wilk M, Keppel E: Long-term impact of HLA matching on kidney graft survival in

cyclosporine-treated recipients. *Transplant Proc* 23, 373-375 (1991)

11. Opelz G, Wujciak T, Mytilineos J, Scherer S: Revisiting HLA matching for kidney transplantation. *Transplant Proc* 25, 173-175 (1993)
12. Ota M, Seki T, Fukushima H, Tsuji K, Inoko H: HLA-DRB1 genotyping by modified PCR-RFLP method combined with group-specific primers. *Tissue Antigens* 39, 187-202 (1992)
13. Rychlik W, Rhoads RE: A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 17, 8543-8551 (1989)
14. Versluis LF, Rozemuller E, Tonks S, Marsh SGE, Bouwens AGM, Bodmer JG, Tilanus MG: High-resolution HLA-DPB typing based upon computerized analysis of data obtained by fluorescent sequencing of the amplified polymorphic exon 2. *Hum Immunol* 38, 277-283 (1993)
15. Zetterquist H, Olerup O: Identification of the HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*07, and HLA-DRB1*09 alleles by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Hum Immunol* 34, 64-74 (1992)



*ergonomisch
und trotzdem
exklusiv*



Schöppich hat 'Ihre' Küche

Gerne beraten wir Sie
Mo.-Fr. ab 9.30 und Sa. ab 9.00 Uhr
und nach Vereinbarung

Bad Schwartau

Langenfelde 2-4 • ☎ 04 51-28 08 80

..... auch in Schwerin-Süd
und Brandshagen/Stralsund



Die Bedeutung der C-terminalen Region des Chemokins Neutrophile aktivierendes Peptid 2 (NAP-2) für die Interaktion mit neutrophilen Granulozyten*

E. Brandt, J. E. Ehlert, F. Petersen, M.H.G. Kubbutat, J. Gerdes und H.-D. Flad

Summary

We have recently reported on the discovery of a C-terminally truncated variant of the chemokine NAP-2, which exhibited up to fourfold enhanced capacity to induce degranulation in neutrophils as compared to full-size NAP-2. We herein report on the successful purification of this isoform which enabled us to directly determine its C-terminal sequence and molecular weight. Both analyses concomitantly revealed that the NAP-2 variant was identical with an isoform truncated by exactly four amino acids at the C-terminus (NAP-2[1-66]). In addition we have directly analyzed the influence of truncation on the activity of NAP-2 by the use of recombinant NAP-2 variants which we expressed in *Escherichia coli* and which were stepwise deleted by up to six amino acids at the C-terminus. Analyses of the functional characteristics of these variants revealed that recombinant rNAP-2[1-66] was the most active one. Comparison of recombinant and native NAP-2[1-66] revealed that both polypeptides were functionally and structurally equivalent. Our data indicate, that precise truncation at the C-terminus participates in the fine-regulation of the chemokine's function.

Zusammenfassung

Wir haben kürzlich über die Entdeckung einer C-terminal verkürzten Variante des Chemokins NAP-2 berichtet, die eine bis zu vierfach erhöhte Kapazität besitzt, die Degranulationreaktion neutrophiler Granulozyten auszulösen. In der vorliegenden Studie berichten wir über die erfolgreiche Isolierung dieser NAP-2 Variante, wodurch wir in die Lage versetzt wurden, direkte Untersuchungen zu deren C-terminaler Sequenz und Molekulargewicht durchzuführen. Beide Untersuchungen ergaben übereinstimmend, daß es sich bei der nativen NAP-2 Variante um eine Isoform handelt, die am

C-Terminus exakt um vier Aminosäuren verkürzt ist (NAP-2[1-66]). Weiterhin haben wir mit Hilfe rekombinanter, in *Escherichia coli* exprimierter NAP-2 Mutanten den Einfluß sukzessiver Deletionen am C-Terminus auf die biologische Aktivität des Chemokins untersucht. Von den um bis zu sechs Aminosäuren verkürzten Mutanten erwies sich rNAP-2[1-66] als am potentesten. Der Vergleich von nativem und rekombinantem NAP-2[1-66] zeigte, daß sich beide Polypeptide funktionell und strukturell äquivalent zueinander verhalten. Unsere Ergebnisse zeigen, daß C-terminale Verkürzung von NAP-2 an der Feinregulation der biologischen Funktion des Chemokins beteiligt ist.

Einleitung

Das zu den Chemokinen gehörende Neutrophile aktivierende Peptid 2 (NAP-2) ist ein 70 Aminosäuren großes Polypeptid. Es entsteht durch proteolytische Spaltung aus thrombozytären Vorstufen. Diese Vorläuferproteine stellen homologe Moleküle dar, die sich in der Länge des N-Terminus unterscheiden und kollektiv als β -Thromboglobulin Antigen (β -TG Ag) bezeichnet werden. Zumindest für zwei dieser Polypeptide, nämlich das basische Plättchenprotein (platelet basic protein, PBP) und das Bindegewebe aktivierende Peptid III (connective tissue-activating peptide III, CTAP-III), konnte gezeigt werden, daß eine direkte Konvertierung zu NAP-2 durch N-terminale Prozessierung unter Beteiligung monozytärer und granulozytärer Proteasen stattfindet [1,2]. Das entstehende NAP-2 löst bei polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) verschiedene Effektorfunktionen aus, wie z.B. chemotaktische Wanderung [3,4], die Freisetzung lysosomaler Enzyme [4] und von Bestandteilen sekundärer Granula [5]. Gemeinsam mit den strukturell und funk-

* Diese Arbeit wurde unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 367, Projekt C 4)

tionell eng verwandten Chemokinen Interleukin 8 (IL-8) und Melanozytenwachstum stimulierende Aktivität (MGSA), wird NAP-2 der α -Chemokin-Subfamilie zugeordnet. Alle diese Mediatoren sind selektive Aktivoren von Granulozytenfunktionen und reagieren mit PMN über spezifische gemeinsame Rezeptoren, die IL-8 Rezeptoren des Typs A und B. Während für IL-8 nur hochaffine Bindungsstellen vorliegen, existieren für NAP-2 und MGSA sowohl hoch- als auch niedrigaffine Bindungsstellen [3,6-8].

Die Primärstruktur der α -Chemokine enthält vier Cysteine an konservierten Positionen, welche die Kernregion der Moleküle begrenzen. Die ersten beiden Cysteine sind durch eine einzige Aminosäure getrennt. Das sich daraus ergebende Sequenzmotiv (CXC) wird zur Unterscheidung der α -Chemokine von den β -Chemokinen herangezogen, da bei den Letzteren diese Cysteine direkt benachbart vorliegen (CC-Motiv)[9-11]. Es ist gezeigt worden, daß Disulfidbrückenbildung essentiell für die Aufrechterhaltung der molekularen Konformation [12,13], als auch für die biologische Aktivität der Chemokine ist [14,15]. Zusätzlich wurden noch weitere Strukturen beschrieben, die für die Rezeptorbindung und die biologische Aktivität von Bedeutung sind. Bezüglich der α -Chemokine wurde ein aus drei aufeinanderfolgenden Aminosäuren bestehendes Sequenzmotiv entdeckt (ELR), das der CXC-Gruppierung direkt vorausgeht, und für die biologische Wirkung auf PMN unverzichtbar ist [16]. Die funktionelle Bedeutung des ELR-Motivs ist darüberhinaus durch Mutagenesestudien an IL-8, MGSA und dem Chemokinomolog Plättchenfaktor 4 (PF-4) bestätigt worden [17-19]. Obwohl diese Befunde deutlich machen, daß bestimmte strukturelle Eigenschaften im N-terminalen Bereich von α -Chemokinen notwendig für deren Aktivität sind, weisen neuere Ergebnisse darauf hin, daß weitere, bisher noch nicht definierte Regionen ebenfalls wichtig sind. Studien an IL-8 lassen vermuten, daß die Bindung an den IL-8 Typ A-Rezeptor von Sequenzen innerhalb der Kernregion abhängig ist, wohingegen die Bindung an den IL-8 Typ B-Rezeptor auf C-terminal lokalisierte Strukturen angewiesen ist [18]. Allerdings ist unklar, ob diese Prinzipien auch auf andere Chemokine übertragbar sind. In diesem Zusammenhang weist die kürzliche Entdeckung einer C-terminal verkürzten NAP-2 Variante, die dreibis vierfach erhöhte biologische Aktivität zeigt, darauf hin, daß C-terminale Strukturen auch bei der Regulation von NAP-2-Funktionen beteiligt sein könnten [20]. Bisher war es uns allerdings nicht möglich, diese Variante homogen auf-

zureinigen und das genaue Ausmaß der C-terminalen Verkürzung zu bestimmen. Weiterhin blieb unklar, ob möglicherweise auch andersartige posttranslationale Modifikationen für die veränderte biologische Aktivität verantwortlich sind.

In der vorliegenden Arbeit ist es uns gelungen, einerseits die native NAP-2 Variante bis zur Homogenität aufzureinigen und daraufhin das genaue Ausmaß der C-terminalen Verkürzung zu bestimmen. Wir haben weiterhin ein rekombinantes Expressionssystem für NAP-2 entwickelt und mit Hilfe desselben den Einfluß C-terminaler Deletionen auf die Aktivität von NAP-2 genau untersuchen können.

Material und Methoden

Bakterienstämme und rekombinante DNA-Methoden

Kompetente *Escherichia coli*-Bakterien (MAX Efficiency DH5 α F'IQ) wurden bei GIBCO BRL (Eggenstein) gekauft. Soweit nicht anders beschrieben, wurden die rekombinanten DNA-Methoden gemäß Sambrook et al. [21] durchgeführt. Beide Stränge der insertenthaltenden Plasmid-DNA wurden auf einem ALF (automated laser fluorescent)-DNA-Sequenziergerät mit Hilfe vektorspezifischer, fluoreszenzmarkierter Sequenzierprimer nach der Kettenabbruch-Methode [22] auf die korrekte Sequenz hin überprüft.

Konstruktion der Expressionsvektoren pAXNAP

Nach Anreicherung von Poly(A)⁺-RNA aus Thrombozytenpräparationen (erhalten von Dr. B. Katzmann, Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, Med. Universität Lübeck, Lübeck) wurde die cDNA durch reverse Transkription gewonnen. Zur Herstellung der Inserts mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dienten spezifische Primer, die eine korrespondierende Sequenz in der als Matrize dienenden NAP-2 cDNA (übereinstimmend mit der CTAP-III mRNA, Position 241-450, EMBL Nr. M54995 [23]) erkannten. Als 5'-Primer wurde das Oligonukleotid „FOR“ verwendet: 5'-ATATAGATCTTGATCGAGGGTAGGGCTGAACTCCGCTGCATGTG-ATAAAG-3'. Dieser enthielt die den ersten 27 Basen der NAP-2 cDNA entsprechende Sequenz (fett), eine für die Erkennungsstelle der Endoproteinase FXa codierende Sequenz (kursiv) und eine Restriktionsschnittstelle (unterstrichen) für das spätere Einschleusen in den Vektor pAX5+ (Medac, Hamburg). Die 3'-Primer, die zur Erzeugung der unterschiedlichen C-Termini in den NAP-2 Varianten dienen sollten, enthielten neben

der zur NAP-2 cDNA-homologen Sequenz außerdem ein Stopcodon und eine Restriktionsschnittstelle zur Einfügung in den Vektor. Die mit 17 Basen immer gleich lange, homologe Sequenz der 3'-Primer war abhängig von der Anzahl der C-terminal fehlenden Aminosäuren. Während diese Sequenz bei dem Primer für vollständiges rNAP-2[1-70] zu den Positionen 434-450 in der CTAP-III mRNA komplementär war, war diejenige für rNAP-2[1-69] den Positionen 431-447 homolog, d.h., um ein Triplett stromaufwärts verschoben. Dieses Schema wurde analog für bis zu einer um sechs Aminosäuren verkürzten NAP-2 Variante durchgeführt. Nach Einschleusung der so entstandenen Inserts in den Vektor pAX5+ wurden die Expressionsvektoren pAXNAP70-64 erhalten. Sie kodierten für ein dreiteiliges Fusionsprotein, bestehend aus β -Galaktosidase, einem Kollagenfragment und der respektiven NAP-2 Variante mit einer FXa-Schnittstelle am N-Terminus. Diese Vektoren wurden in die kompetenten Bakterien eingeschleust.

Expression und Aufreinigung der rekombinanten NAP-2 Varianten

Die mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induzierten Transformanten wurden nach fünfständiger 37°C-Inkubation durch Ultraschallbehandlung lysiert. Das in Inklusiongranula gespeicherte Fusionsprotein wurde nach einer Methode von Schoner et al. [24] angereichert und gemäß einem Protokoll für β -Galaktosidase [25] renaturiert. Nach dem Verdau mit Faktor Xa [26] wurde die Lösung mit Trifluoressigsäure (TFA) auf pH 2,1 angesäuert und mit NaOH reneutralisiert. Das präzipitierte Protein wurde sedimentiert und die gewünschten Peptide aus dem Überstand immunchromatographisch mittels mAK C-24-Sepharose aufgereinigt.

Auftrennung der verschiedenen β -TG Ag-Isoformen durch Säulenchromatographie

Die Auftrennung von vollständigem NAP-2 und der C-terminal verkürzten Variante aus Überständen stimulierter mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (MNZ) erfolgte mittels Immunaффinitäts- und Kationenaustauschchromatographie wie beschrieben [20]. Nachfolgend wurden die gebildeten Pools P₁ und P₂ mit Hilfe der Umkehrphasen-HPLC über eine analytische Cyanopropylsäule (4,6x250mm, 5 μ m; J.T. Baker Inc.) separiert. Proben in 0,1% TFA wurden direkt aufgetragen und bei einer Flußrate von 0,5ml/min mit einem Gradienten von 0-35% 1-Propanol in 0,1% TFA eluiert.

Massenspektroskopie

Das Molekulargewicht der nativen, C-terminal verkürzten NAP-2 Variante wurde mittels MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization)-Massenspektroskopie durch die Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) bestimmt.

Proteinsequenzierung

N-terminale Sequenzanalysen wurden von Dr. A. Petersen (Abteilung für klinische Medizin, Forschungsinstitut Borstel) auf einem automatischen Gasphasensequenziergerät (Modell 473A, Applied Biosystems Inc., Foster City, USA) durchgeführt. Die Identifizierung des C-Terminus der nativen NAP-2-Variante erfolgte durch vollständige Sequenzierung des nach Endoproteinasen Lys-C-Verdau erhaltenen C-terminalen Fragments (durchgeführt von der Firma Eurogentec).

Elektrophorese, ELISA, Immunoblotting und Antikörper

Elektrophoresen, der Transfer von Proteinbanden auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen und Zymimmunoassays (ELISA's) wurden nach schon beschriebenen Protokollen durchgeführt [20]. Der monoklonale Antikörper mAK C-24, sowie die polyklonalen Kaninchenantisera α - β TG und α -70 wurden hergestellt, wie vormals beschrieben [2,20].

PMN-Aufreinigung und Degranulationsassay

Humane PMN aus Citratblut einzelner gesunder Spender wurden durch Dichtegradientenzentrifugation wie beschrieben zu einer Reinheit von über 95% aufgereinigt [2]. Die Aktivitäten der Stimuli wurden anhand der Freisetzung lysosomaler Elastase bestimmt [2].

Rezeptorkompetitionsassay

Die Interaktion von unmarkiertem NAP-2 und von NAP-2 Varianten mit Bindungsstrukturen auf PMN, wurde anhand der Verdrängung einer konstanten Dosis von radioaktiv markierten, nativen NAP-2 durch steigende Konzentrationen unmarkierter Liganden untersucht (beschrieben in [27]).

Ergebnisse

Aufreinigung und Charakterisierung der nativen, C-terminal verkürzten NAP-2 Variante

Überstände von Kulturen stimulierter (PHA/Calciumionophor), Thrombozyten enthaltender mononukleärer Zellen (MNZ) dienen als Ausgangsmaterial. Nach Anreicherung der β -TG Ag-Polypeptide

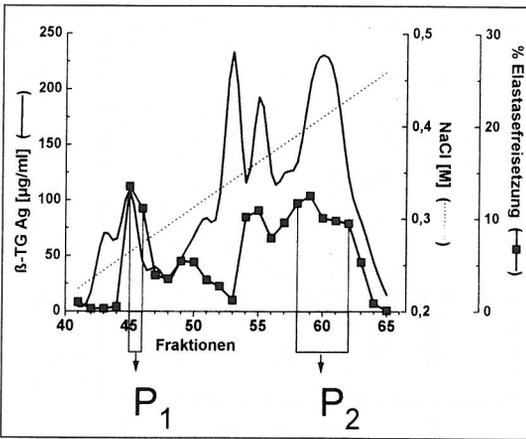


Abbildung 1: Aufreinigung von β -TG Ag durch Kationenaustauschchromatographie. Durch Immunitätschromatographie aus Kulturüberständen stimulierter MNZ angereichertes β -TG Ag wurde mittels einer Mono S-Säule separiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden mit Hilfe eines ELISA auf ihren β -TG Ag-Gehalt sowie im PMN-Degranulationsassay auf ihre biologische Aktivität untersucht. P_1 und P_2 bezeichnen die im Folgenden weiter analysierten vereinigten Fraktionen.

mittels Immunitätschromatographie an mAk C-24-Sepharose wurden diese mittels Kationenaustauschchromatographie weiter aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen auf Neutrophile aktivierende Bestandteile im PMN-Degranulationsassay untersucht (Abb.1). Dabei ergaben sich wiederholt zwei Aktivitätsmaxima, die bei ca. 0,27 M NaCl (P_1), bzw. 0,40 M NaCl (P_2) eluierten. Die entsprechenden Fraktionen wurden jeweils vereinigt, durch Umkehrphasen-HPLC weiter separiert und die resultierenden Proteinmaxima analysiert. Sowohl in P_1 , als auch in P_2 trat jeweils nur ein Proteinmaximum auf, das aktivierende Wirkung gegenüber PMN zeigte. Diese als P_{1a} , bzw. P_{2a} bezeichneten Proteine erwiesen sich, gemäß gelelektrophoretischer Analyse und nach Rechromatographie in der Umkehrphasen-HPLC, als homogen. Gegenüber P_{1a} wies P_{2a} eine ca. dreifach höhere Potenz zur Aktivierung von PMN auf. Die N-terminale Sequenzierung beider Proteine ergab identische aminoterminalen Sequenzen (AELR...), die dem für NAP-2 bekannten N-Terminus entsprachen. Demgegenüber äußerte sich das Vorliegen voneinander abweichender C-terminaler Strukturen durch unterschiedliche Reaktionsmuster mit dem Kaninchenantiserum α -70, das zur Bindung an NAP-2 unbedingt die Anwesenheit der letzten Aminosäure D_{70} benötigt.

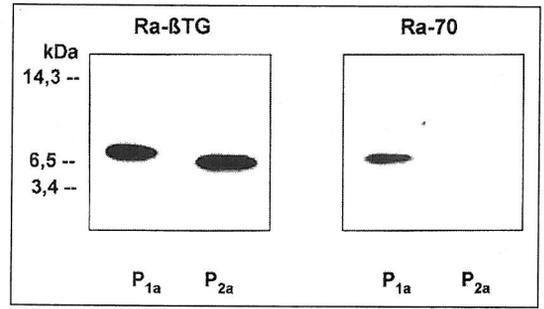


Abbildung 2: Nachweis der C-terminalen Verkürzung des Proteins P_{2a} im Western Blot. Die Proteine P_{1a} und P_{2a} wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit den aus Kaninchen erhaltenen Antiseren α -70 (spezifisch für die C-terminale Sequenz ESAD) und α - β TG (spezifisch für alle β -TG Ag-Isoformen) detektiert.

Im Western Blot zeigte P_{1a} , jedoch nicht P_{2a} deutliche Reaktivität (Abb.2). Dagegen erkannte ein weiteres, gegen β -TG gerichtetes Kaninchenantiserum (α β TG) beide Isoformen gleichermaßen. Somit handelte es sich bei P_{1a} eindeutig um vollständiges NAP-2[1-70], wohingegen P_{2a} die gesuchte, am C-Terminus verkürzte NAP-2 Variante darstellte. Die massenspektrometrische Analyse von P_{2a} nach der MALDI-Methode ergab ein Molekulargewicht von 7227, das von dem theoretisch errechneten Gewicht von 7222 für eine um vier C-terminale Aminosäuren verkürzte NAP-2 Variante um weniger als 0,1% abwich. Die indirekte Sequenzierung des C-Terminus führte zur Identifizierung eines Fragments mit der Sequenz KLAGD. Dieses Pentapeptid stimmt exakt mit den Positionen 62-66 in NAP-2 überein. Somit belegen beide Untersuchungen, daß es sich bei der nativen, C-terminal verkürzten NAP-2 Variante um NAP-2[1-66] handelt.

Herstellung rekombinanter NAP-2 Varianten

Zur Herstellung schrittweise am C-Terminus deletierter NAP-2 Varianten etablierten wir ein prokaryotisches Expressionssystem für NAP-2 in *Escherichia coli*. Ein Schema der Vorgehensweise ist in Abbildung 3 dargestellt. Die Einschleusung der genetischen Information für NAP-2, bzw. für entsprechende Deletionsmutanten in Bakterien mit Hilfe der Expressionsvektoren pAXNP70-64 führte nach Induktion der Proteinexpression zur Bildung eines Fusionsproteins, bestehend aus einem N-terminalen bakteriellen Anteil und der jeweiligen NAP-2-Variante am C-Terminus. Gemäß Western Blot Analyse entsprach das in der SDS-PAGE beobachtete Molekulargewicht dieses Pro-

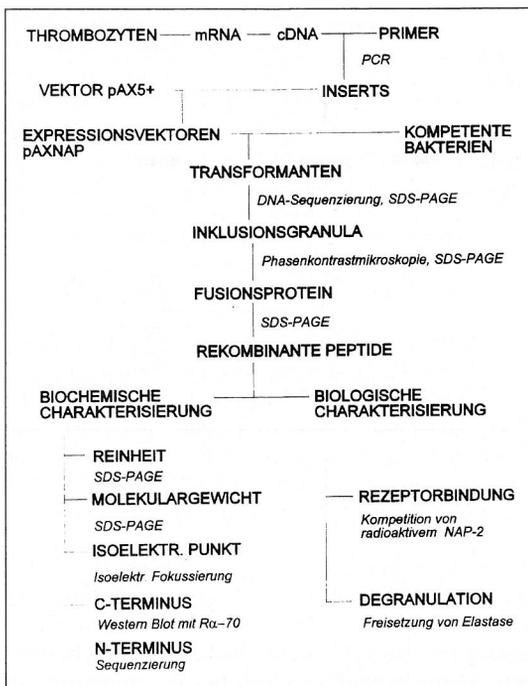


Abbildung 3: Schema der Vorgehensweise bei der Herstellung und Charakterisierung von rekombinanten NAP-2 Varianten. Die Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung der einzelnen Produkte sind in Kursivschrift angegeben.

teins der zu erwartenden Größe von ca. 130.000 (Abb.4). Die überwiegende Lokalisation des Fusionsproteins in Inklusionsgranula erlaubte seine Anreicherung durch Differentialzentrifugation (Reinheit nach Solubilisierung in 8 M Harnstoff: ca 80%). Nach Renaturierung führte Abbau mittels der Endoproteinase Faktor Xa (FXa) zur Freisetzung eines ca. 8 kDa großen sowie einiger weiterer immunreaktiver Fragmente. Das 8 kDa-Fragment konnte über spezielle Fällungsprotokolle und Immunaффinitätschromatographie (Abb.4) bis zur Homogenität aufgereinigt werden. Analysen des Endprodukts hinsichtlich dessen N-terminaler Sequenz, seines Reaktivitätsmusters mit verschiedenen Antikörpern, des isoelektrischen Punktes und Molekulargewichts (Daten nicht gezeigt) bestätigten, daß es sich um die jeweils gewünschte NAP-2 Variante handelte.

Vergleich der Aktivitäten von rekombinanten und nativen NAP-2 Varianten

Voraussetzung für die vergleichende Untersuchung von rekombinanten und nativen NAP-2 Varianten war, daß die biologische Aktivität von re-

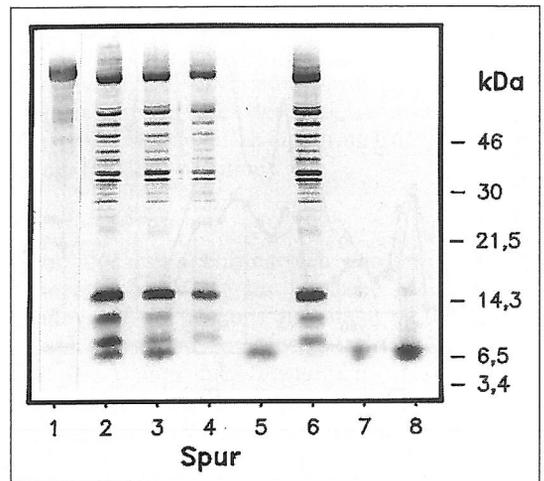


Abbildung 4: Aufreinigung von rekombinatem NAP-2 nach FXa-Abbau des Fusionsproteins (FP); Nachweis im Western Blot mit Rα-βTG. Spur 1: FXa-Verdau des FP, t=0; Spur 2: t=48h; Spur 3: Überstand (ÜS) von 2 nach Säurefällung (pH 3,0); Spur 4: Pellet von 2 nach Säurefällung; Spur 5: ÜS von 3 nach Reneutralisierung; Spur 6: Pellet von 3 nach Reneutralisierung; Spur 7: Eluat nach mAk C24-Immunaффinitätschromatographie; Spur 8: natives NAP-2. (vgl. Material und Methoden, Abschnitt: Expression und Aufreinigung der rekombinanten NAP-2-Varianten).

kombinatem, vollständigem NAP-2 derjenigen von nativem NAP-2 entsprach. Die Analyse beider Proteine im PMN-Degranulationsassay ergab identische biologische Aktivitäten mit deckungsgleichen Kinetiken (s. Abb.5A). Weiterhin konnte auch die Aktivität von rNAP-2[1-70] konzentrationsabhängig von dem, auf natürliches NAP-2 inhibitorisch wirkenden mAk C-24 unterdrückt werden (s. Abb.5B). Zusätzlich wurde im Rezeptorkompetitionsassay die Kapazität der Polypeptide untersucht, über spezifische Rezeptoren an PMN zu binden. Beide Proteine waren gleichermaßen in der Lage, eine konstante Konzentration an radioaktiv markiertem, nativem NAP-2 von der Oberfläche von PMN zu verdrängen (Abb.6). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß rekombinantes rNAP-2[1-70] und natives, vollständiges NAP-2 äquivalente Eigenschaften besitzen. Im Folgenden wurde der Einfluß C-terminaler Verkürzungen auf die biologische Aktivität von NAP-2 anhand der rekombinant hergestellten Deletionsmutanten untersucht (Abb.6). Gemäß Analyse im PMN-Degranulationsassay steigt die funktionelle Aktivität der Mutanten bis zu einer

Verkürzung von vier Aminosäuren sukzessiv an rNAP-2[1-66] erweist sich dabei als ca. dreifach potenter als das zum Vergleich gemessene native, vollständige NAP-2. Weitere Verkürzung um bis zu sechs Aminosäuren führt hingegen zu einem Abfall der Aktivität. Dieser biphasische Verlauf der biologischen Aktivität der Mutanten spiegelt sich auch in ihren Rezeptorbindungseigenschaften wider. Das Affinitätsmaximum zeigt sich wiederum bei rNAP-2[1-66]. Mit weiterer Deletion nimmt die Bindungsaffinität ab und erreicht mit rNAP-2[1-64] das Niveau des vollständigen NAP-2. Interessanterweise zeigt die native, C-terminal verkürzte NAP-2 Variante, die wir als NAP-2[1-66] identifiziert haben, sowohl im PMN-Degranulationsassay, als auch im Rezeptorbindungsassay, äquivalente Eigenschaften zu rNAP-2[1-66] (Abb.6). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die erhöhte biologische Aktivität und Rezeptorbindung der nativen, C-terminal exakt um vier Aminosäuren verkürzten NAP-2 Variante NAP-2[1-66] auf einer genauen proteolytischen Spaltung beruht und der Einfluß weiterer, posttranslatiöner Modifikationen ausgeschlossen werden kann.

Diskussion

Unsere kürzliche Entdeckung einer neuen molekularen Variante des Chemokins NAP-2, die nach immunchemischen Kriterien einen verkürzten C-Terminus aufwies und gegenüber PMN eine ungefähr drei- bis vierfach erhöhte biologische Aktivität im Vergleich zu vollständigem NAP-2 zeigte [20] wies darauf hin, daß neben dem N-Terminus auch der C-Terminus an der Regulation der NAP-2 Funktion beteiligt sein könnte. Es blieb zunächst jedoch unklar, ob die erhöhte Aktivität eine direkte Auswirkung der Verkürzung darstellte, oder ob, neben proteolytischer Prozessierung, weitere posttranslationalen Modifikationen dafür verantwortlich waren. In der vorliegenden Arbeit ist es uns gelungen, diese Variante bis zur Homogenität aufzureinigen und sowohl deren Molekulargewicht als die genaue Sequenz des C-Terminus zu ermitteln. Die Variante zeigte, wie schon aus einer vorhergehenden Arbeit bekannt [20], den gleichen N-Terminus wie vollständiges NAP-2. Die massenspektroskopische Analyse des Molekulargewichts und die Bestimmung der C-terminalen Sequenz ergaben übereinstimmend, daß dieses Polypeptid ein um exakt vier Aminosäuren verkürztes NAP-2-Molekül (NAP-2[1-66]) darstellt.

Weiterhin ist es uns gelungen, ein prokaryotisches Expressionssystem für NAP-2 und deletierte Vari-

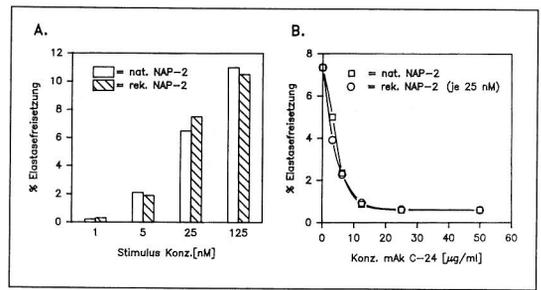


Abbildung 5: Vergleich von rekombinanten und nativem vollständigem NAP-2 im PMN-Degranulationsassay. A. PMN wurden mit steigenden Konzentrationen an nativem und rekombinanten NAP-2 stimuliert und anschließend die in den Überstand abgegebene Elastaseaktivität gemessen. Beide Stimuli zeigen identische biologische Potenz. B. PMN wurden mit einer konstanten Konzentration von jeweils 25 nM nativem bzw. rekombinanten NAP-2 in An- bzw. Abwesenheit steigender Konzentrationen des β -TG Ag-spezifischen mAk C24 inkubiert. Die biologische Wirkung beider Proteine wird durch den Antikörper gehemmt.

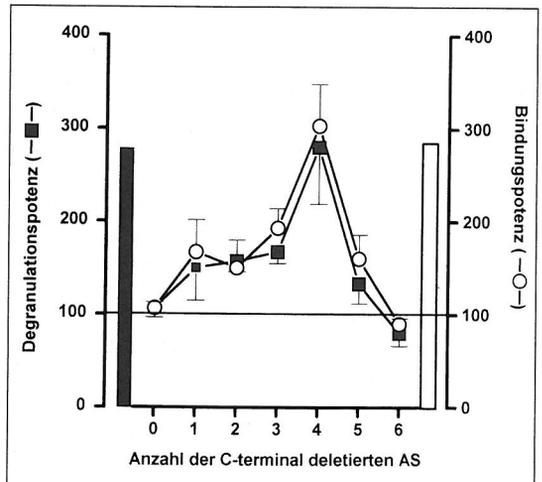


Abbildung 6: Einfluß C-terminaler Deletionen in NAP-2 auf dessen biologische Aktivität und auf die Bindung an PMN. Kurvendigramm: Potenz der rekombinanten NAP-2 Varianten rNAP-2[1-70] bis rNAP-2[1-64] (verkürzt um 0 bis 6 Aminosäuren) im Vergleich zu vollständigem nativem NAP-2 (Potenz=100%) im PMN-Degranulationsassay und im Rezeptorbindungsassay. Säulen: Potenz der nativen, C-terminal verkürzten NAP-2 Variante NAP-2[1-66] (schwarz= Degranulationsassay, weiss= Rezeptorbindungsassay).

anten zu etablieren. Vergleichende Untersuchungen der biologischen Aktivität von vollständigem nativem und rekombinantem NAP-2 (rNAP-2[1-70]) zeigten, daß beide Formen strukturell und funktionell äquivalent zueinander sind. Ihre Kapazität, einerseits PMN zu aktivieren und andererseits spezifisch an diese Zellen zu binden, wird offensichtlich allein durch die Primärstruktur des Moleküls bedingt und nicht durch potentielle, posttranslationale Modifikationen.

Damit war die Voraussetzung geschaffen, den Einfluß sukzessiver Deletionen am C-Terminus von NAP-2 mittels rekombinanter Mutanten zu überprüfen. Funktionelle Untersuchungen an den bis zu sechs Aminosäuren verkürzten NAP-2 Varianten (rNAP-2[1-69] bis rNAP-2[1-64]) legten eine charakteristische Beziehung zwischen der C-terminalen Struktur der Chemokine und ihrer biologischen Wirksamkeit offen. Die Deletion von bis zu vier Aminosäuren führte zu einem Anstieg, sowohl in der Degranulationsaktivität der Polypeptide als auch in ihrer Affinität zu spezifischen Rezeptoren auf Granulozyten, wohingegen eine weitere Verkürzung mit einem Abfall der Aktivität auf das ursprüngliche Niveau des vollständigen Chemokins einherging. Offensichtlich kann schon das Vorhandensein bzw. Fehlen einer einzelnen Aminosäure einen entscheidenden Einfluß auf die Funktion von NAP-2 haben. Die aktivste Form stellte rNAP-2[1-66] dar, die sich in allen untersuchten Parametern äquivalent zu der nativen Variante NAP-2[1-66] verhielt. Damit zeigt auch dieses Ergebnis, daß die erhöhte biologische Aktivität der Variante unabhängig von potentiellen posttranslationalen Modifikationen ist. Es steht damit in Übereinstimmung mit dem Befund aus der massenspektrometrischen Analyse, bei der das gemessene Molekulargewicht der Variante so gut mit dem theoretischen Wert für NAP-2[1-66] übereinstimmte, daß weitere Modifikationen ausgeschlossen werden konnten.

Es stellt sich nun die Frage, auf welche Weise das Fehlen der letzten vier Aminosäuren einen Einfluß auf die funktionell relevante Struktur von NAP-2 haben könnte. Kürzliche Untersuchungen zur räumlichen Struktur des Chemokins [28,29] bestätigten, daß NAP-2 prinzipiell eine zu den homologen Polypeptiden IL-8 [12] und MGSA [13] sehr ähnliche Konformation besitzt (Abb.7). Interessanterweise wurde für die C-terminale Struktur gefunden, daß diese nicht, wie aus der IL-8 Struktur zu vermuten gewesen wäre [30], bis zum Ende in einer streng geordneten, α -helikalen Form vorliegt. Stattdessen endet die α -Helix von NAP-2 bei der Aminosäure D₆₆. Die darauf folgenden Reste

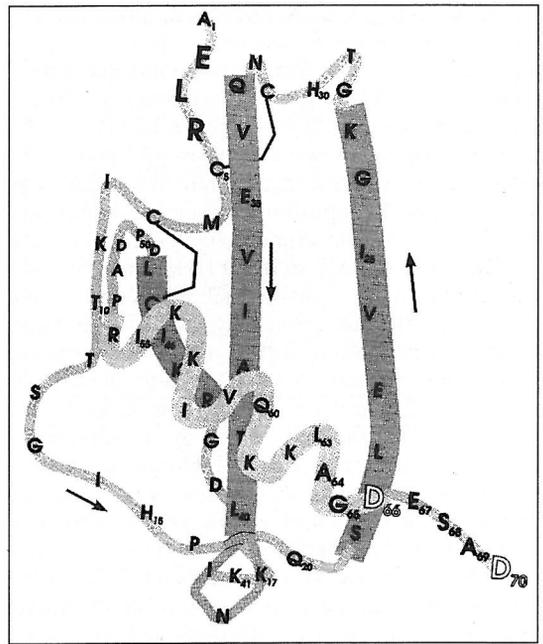


Abbildung 7: Schematisches Bändermodell der NAP-2 Struktur. Entwurf nach NMR-Daten [28] in Anlehnung an die IL-8-Struktur [32].

E₆₇-D₇₀ sind kaum an intramolekularen Wechselwirkungen beteiligt und verfügen daher über eine hohe Beweglichkeit. Die Autoren stellten die Hypothese auf [29], daß diese Reste in NAP-2 zur Favourisierung einer dimeren Struktur beitragen könnten. Da NAP-2 anderen Befunden zufolge als Monomer biologisch aktiv ist [31], müßte eine Verschiebung des Monomer/Dimer-Gleichgewichts zugunsten des Monomers die Aktivität des Moleküls erhöhen. Damit wäre eventuell die höhere Aktivität von NAP-2[1-66] zu erklären, dem diese beweglichen Reste fehlen und das somit vorzugsweise als Monomer vorliegen müßte. Eine alternative Erklärungsmöglichkeit besteht darin, daß die Interaktion zwischen dem Liganden und dessen spezifischer Bindungsstelle auf PMN verbessert wird. Unter der Annahme, daß eine gute Zugänglichkeit der α -Helix für eine optimale Bindung notwendig ist, ist es vorstellbar, daß das Vorhandensein eines stark beweglichen Anteils sterisch störend wirkt. In NAP-2[1-66] wäre die Bindung verbessert, weil die mobilen Reste fehlen und der C-Terminus direkt mit der α -Helix endet. Über die physiologische Bedeutung des Vorkommens von NAP-2[1-66] können bisher nur Vermutungen angestellt werden. Unter der Annahme, daß die verkürzte Variante simultan mit NAP-2 durch proteolytische Prozessierung entsteht, könn-

te sie als ein potenterer Aktivator bei der Sofortabwehr fungieren. Vorläufigen Ergebnissen zufolge scheint es jedoch, daß die Bildung der NAP-2 Variante außer der Anwesenheit von Thrombozyten und Granulozyten die Beteiligung weiterer aktivierter Leukozyten erfordert. Da solche Bedingungen eher bei fortgeschrittenen Entzündungsstadien auftreten, ist damit zu rechnen, daß zu diesem Zeitpunkt schon wesentlich potentere PMN-Aktivatoren, wie z.B. IL-8, vorliegen. In einer solchen Situation könnte die vornehmliche Funktion von NAP-2[1-66] in der Herabregulation der PMN-Antwort bestehen. Wie wir für vollständiges NAP-2 beschrieben haben [8], können sehr niedrige (d.h. nicht stimulatorische) Dosen des Chemokins die neutrophilen Granulozyten gegenüber einer nachfolgenden Aktivierung durch andere Chemokine desensibilisieren. Vorläufige Untersuchungen mit NAP-2[1-66] weisen darauf hin, daß diese Variante eine zwei- bis dreifach höhere Desensibilisierungskapazität als NAP-2 besitzt (Ehlert, unveröffentlicht). Daher könnte NAP-2[1-66] rückregulatorisch an der Terminierung einer Entzündungsreaktion beteiligt sein.

Literatur

- Walz, A., Baggiolini, M. (1990): Generation of the neutrophil-activating peptide NAP-2 from platelet basic protein or connective tissue-activating peptide III through monocyte proteases. *J. Exp. Med.* 171: 449-454
- Brandt, E., van Damme, J., Flad, H.-D. (1991): Neutrophils can generate their activator neutrophil-activating peptide 2 by proteolytic cleavage of platelet-derived connective tissue-activating peptide III. *Cytokine* 3: 311-321
- Leonard, E.J., Yoshimura, T., Rot, A., Noer, K., Walz, A., Baggiolini, M., Walz, D.A., Goetzl, E.J., Castor, C.W. (1991): Chemotactic activity and receptor binding of neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-1) and structurally related host defense cytokines: Interaction of NAP-2 with the NAP-1 receptor. *J. Leukocyte Biol.* 49: 258-265
- Walz, A., Dewald, B., von Tschamer, V., Baggiolini, M. (1989): Effects of the neutrophil-activating peptide NAP-2, platelet basic protein, connective tissue-activating peptide III, and platelet factor 4 on human neutrophils. *J. Exp. Med.* 170: 1745-1750
- van Damme, J., Rampart, M., Conings, R., Decock, B., Van Osselaer, N., Willems, J., Billiau, A. (1990): The neutrophil-activating proteins interleukin 8 and β -thromboglobulin: in vitro and in vivo comparison of NH₂-terminally processed forms. *Eur. J. Immunol.* 20: 2113-2118
- Moser, B., Schumacher, C., von Tschamer, V., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M. (1991): Neutrophil-activating peptide 2 and gromelanoma growth stimulatory activity interact with neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8 receptors on human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 266: 10666-10671
- Schumacher, C., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., Moser, B. (1992): High- and low-affinity binding of gro alpha and neutrophil-activating peptide 2 to interleukin 8 receptors on human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10542-10546
- Petersen, F., Flad, H.-D., Brandt, E. (1994): Neutrophil-activating peptides NAP-2 and IL-8 bind to the same sites on neutrophils but interact in different ways. *J. Immunol.* 152: 2467-2478
- Oppenheim, J.J., Zachariae, C.O.C., Mukaida, N., Matsushima, K. (1991): Properties of the novel proinflammatory supergene „intercrine“ cytokine family. *Annu. Rev. Immunol.* 9: 617-648
- Brandt, E., Flad, H.-D. (1992): Structure and function of platelet-derived cytokines of the β -thromboglobulin/interleukin 8 family. *Platelets* 3: 295-305
- Kelvin, D.J., Michiel, D.F., Johnston, J.A., Lloyd, A.R., Sprenger, H., Oppenheim, J.J., Wang, J.-M. (1993): Chemokines and serpentes: the molecular biology of chemokine receptors. *J. Leukocyte Biol.* 54: 604-612
- Clore, G.M., Appella, E., Yamada, M., Matsushima, K., Gronenborn, A.M. (1990): Three-dimensional structure of interleukin 8 in solution. *Biochemistry* 29: 1689-1696
- Fairbrother, W.J., Reilly, D., Colby, T., Horuk, R. (1993): ¹H assignment and secondary structure determination of human melanoma growth stimulatory activity (MGSA) by NMR spectroscopy. *FEBS* 330: 302-306
- Peveri, P., Walz, A., Dewald, B., Baggiolini, M. (1988): A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 167: 1547-1559
- Tanaka, S., Robinson, E.A., Yoshimura, T., Matsushima, K., Leonard, E.J., Appella, E. (1988): Synthesis and biological



Schütt & Grundei
Sanitätshaus GmbH

Jetzt auch am Klinikum
Ratzeburger Allee 111-125
im Wirth-Center

SEIT ÜBER 20 JAHREN VERTRAGSPARTNER DER ORTHOPÄDISCHEN
KLINIK DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Lübeck: Wahnstr./Ecke Königstraße
Fackenburger Allee 30 a
Ratzeburger Allee 111-125
Grapengießerstraße 21

Bad Schwartau: Lübecker Straße 12

in jedem Fall... ..Tel.: 04 51/89 07-0

- characterization of monocyte-derived neutrophil chemotactic factor. FEBS Letters 236: 467-470
16. Clark-Lewis, I., Schumacher, C., Baggiolini, M., Moser, B. (1991): Structure-activity relationships of interleukin-8 determined using chemically synthesized analogs. J. Biol. Chem. 266: 23128-23134
 17. Moser, B., Dewald, B., Barella, L., Schumacher, C., Baggiolini, M., Clark-Lewis, I. (1993): Interleukin-8 antagonists generated by N-terminal modification. J. Biol. Chem. 268: 7125-7128
 18. Schraufstatter, I.U., Barritt, D.S., Ma, M., Oades, Z.G., Cochrane, C.G. (1993): Multiple sites on IL-8 responsible for binding to alpha and beta IL-8 receptors. J. Immunol. 151: 6418-6428
 19. Clark-Lewis, I., Dewald, B., Geiser, T., Moser, B., Baggiolini, M. (1993): Platelet factor 4 binds to interleukin 8 receptors and activates neutrophils when its N terminus is modified with Glu-Leu-Arg. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 3574-3577
 20. Brandt, E., Petersen, F., Flad, H.-D. (1993): A novel molecular variant of the neutrophil-activating peptide NAP-2 with enhanced biological activity is truncated at the C-terminus: Identification by antibodies with defined epitope specificity. Mol. Immunol. 30: 979-991
 21. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed., Cold Spring Harbor laboratory press, Cold Spring Harbor
 22. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467
 23. Wenger, R.H., Wicki, A. N., Walz, A., Kieffer, N., Clemetson, K.J. (1989): Cloning of cDNA coding for connective tissue activating peptide III from a human platelet-derived lambda gt11 expression library. Blood 73: 1498-1503
 24. Schoner, R.G., Ellis, L.F., Schoner, B.E. (1985): Isolation and purification of protein granules from *Escherichia coli* cells overproducing bovine growth hormone. Bio/Technology 2: 151-154
 25. Marchesi, S.L., Steers, E.J., Shifrin, S. (1969): Purification and characterization of the multiple forms of β -galactosidase of *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta 181: 20-34
 26. Nagai, K., Thogersen, H.G. (1984): Generation of β -globin by sequence-specific proteolysis of a hybrid protein produced in *Escherichia coli*. Nature 309: 810-812
 27. Mollereau, C., Muscatelli, F., Mattei, M.-G., Vassart, G., Parmentier, M. (1993): The high-affinity interleukin 8 receptor gene (IL8RA) maps to the 2q33-q36 region of the human genome: cloning of a pseudogene (IL8RBP) for the low-affinity receptor. Genomics 16: 248-251
 28. Mayo, K.H., Yang, Y., Daly, T.J., Barry, J.K., LaRosa, G.J. (1994): Secondary structure of neutrophil-activating peptide-2 determined by ^1H -nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biochem. J. 304: 371-376
 29. Malkowski, M.G., Wu, J.Y., Lazar, J.B., Johnson, P.H., Edwards, B.F.P. (1995): The crystal structure of recombinant human neutrophil-activating peptide-2 (M6L) at 1.9-Å Resolution. J. Biol. Chem. 270: 7077-7087
 30. Grasberger, B.L., Gronenborn, A.M., Clore, G.M. (1993): Analysis of the backbone dynamics of interleukin-8 by ^{15}N relaxation measurements. J. Mol. Biol. 230: 364-372
 31. Schnitzel, W., Monschein, U., Besemer, J. (1994): Monomer-dimer equilibria of interleukin-8 and neutrophil-activating peptide 2. Evidence for IL-8 binding as a dimer and oligomer to IL-8 receptor B. J. Leukocyte Biol. 55: 763-770
 32. Clore, G.M., Gronenborn, A.M. (1995): Three-dimensional structures of α and β chemokines. FASEB 9: 57-62



Lübecker Frauenkalender 1996

Herausgegeben von
Gertrud H. M. Kreiger
Lübecker
Frauenliteratur-Tage e.V.
Schwartauer Allee 39-41
23554 Lübeck

1. Auflage, 8/95
ISBN 3-7950-0717-8
288 Seiten, Format A5
DM 16,80

Im Buchhandel erhältlich

**SCHMIDT
RÖNHILD**

Posttranslationelle Modifizierungen und ihr Einfluß auf die Allergenität untersucht am Majorallergen Phl p 1 des Lieschgrases

A. Petersen, W.-M. Becker, M. Schlaak

Zusammenfassung:

Ziel dieser Untersuchungen war es, posttranslationelle Modifizierungen auf dem Majorallergen Phl p 1 des Lieschgrases zu identifizieren und ihren Einfluß auf die IgE-Reaktivität zu bestimmen. Bisher wurden diese Strukturen bei der Verwendung von rekombinanten Allergenen nicht berücksichtigt. Das Phl p 1 weist folgende posttranslationelle Modifizierungen auf: intramolekulare Disulfidbrücken, eine Glykosylierungsstelle, Phosphorylierungen und Hydroxylierungen. Disulfidbrücken erweitern die Möglichkeit der Epitopbildung, wobei es auch zum Verschwinden potentieller Epitope kommen kann (kryptogene Epitope). Mit einigen Patientenseren konnte nachgewiesen werden, daß auch die Kohlenhydratseitenkette IgE-reaktive Epitope trägt. Hydroxylierung von Prolinresten am N-Terminus des Phl p 1 scheint ebenfalls die IgE-Reaktivität zu steigern. Unsere Ergebnisse zeigen deutlich, daß die posttranslationellen Modifizierungen eine wichtige Rolle für die Allergenität spielen. Bei der Verwendung von rekombinanten Allergenen in Diagnostik und Therapie sollten diese Strukturen berücksichtigt werden.

Summary:

The aim of this study was to identify posttranslational modifications on the major grass pollen allergen Phl p 1 and to determine their influence on the IgE-reactivity. Until now such structures were not taken into consideration when recombinant allergens were used. Phl p 1 reveals posttranslational modifications e.g. intramolecular disulfide bonds, one glycosylation site, phosphorylated and hydroxylated amino acid residues. Cystine formations are involved in the conformational structure of the Phl p 1-molecule: On the one hand they create new B-cell epitopes, while on the other hand parts of the molecule are made inaccessible for antibodies (cryptic epitopes). The carbohydrate side chain was shown to bear IgE-reactive epitopes by a few patient sera. This can cause cross-reactivities between unrelated allergen sources. Hydroxylation of proline residues at the N-terminus of the Phl p 1

also increases the IgE reactivity. Our results clearly show that posttranslational modifications play an important role for the allergenicity. Therefore, these structures must be taken into account when recombinant allergens should be used for diagnostics and therapy.

Einleitung

Laut Schätzungen liegt bei etwa 20 % der Bevölkerung in Deutschland eine Allergie vor. Gräserpollen stellen dabei die wichtigste Quelle von Outdoor-Allergenen dar (1). Als kausale Therapie wird die Hyposensibilisierung mit Allergenextrakten durchgeführt. Die Therapieerfolge sind bei den verschiedenen Allergenen recht unterschiedlich, scheinen aber mit zunehmender Komplexität der Extrakte abzunehmen: > 95 % bei Wespengift-, 70 - 80 % bei Gräserpollen- und < 50 % bei Hausstaubmilben- und Schimmelpilzallergie (2). Neuerdings wird der Einsatz rekombinanter Allergene diskutiert. Insbesondere für die Diagnostik, aber eventuell auch für die Therapie könnten Mischungen von rekombinanten Allergenen, die nur wenige verschiedene und gut charakterisierte Komponenten enthalten, eingesetzt werden. Zahlreiche Allergene wurden in den letzten Jahren bezüglich ihrer Primärstruktur aufgeklärt und rekombinant hergestellt (3, Übersicht). Die Verwendung rekombinanter Allergene hat für die Standardisierung und Diagnostik große Vorteile, da von definierten Komponenten ausgegangen wird. Sehr kontrovers wird der Einsatz von rekombinanten Allergenen für die Therapie eingeschätzt.

Bei den Gräsern werden aufgrund der großen phylogenetischen Verwandtschaft strukturell und immunologisch sehr ähnliche Komponenten zwischen den einzelnen Spezies gefunden. Die Allergene wurden daher in Gruppen eingeteilt (4). Etwa 95 % der Gräserpollenallergiker zeigen IgE-Reaktivitäten mit dem Gruppe I-Allergen des Lolchgrases (*Lolium perenne*), Lol p 1 (5). Über die cDNA-Technologie konnte die Primärstruktur von den Gruppe I-Allergenen des Lolchgrases, Lieschgrases (*Phleum pratense*) und Honiggrases (*Holcus la-*

natus) ermittelt werden (6,7,8). Sie weisen eine Sequenzidentität > 85 % und eine Sequenzhomologie > 90 % auf (7). IgE-reaktive Abschnitte (B-Zell Epitope) wurden von Esch und Klapper (9) im N-terminalen Bereich des Lol p 1 (Aminosäuren 23 - 35) und im C-terminalen Bereich (Aminosäuren 217 - 240) bestimmt. In unserer Arbeitsgruppe konnten wir beim Lieschgras und dem Honiggras diese Bereiche über die Expression von cDNA-Fragmenten der Gruppe I-Allergene und durch überlappende, synthetische Peptide bestätigen und z.T. weiter eingrenzen (10). IgE-reaktive Epitope werden bei diesen Techniken aber nur dann erfaßt, wenn sie sequenzieller Natur sind. Diskontinuierliche (konformationelle) Epitope, bedingt durch die Tertiärstruktur oder Epitope, die durch posttranslationelle Modifizierungen, wie z.B. Disulfidbrücken, Kohlenhydratstrukturen zustande kommen, werden nicht erfaßt.

Es ist das Ziel dieser Studie, den Einfluß der posttranslationellen Modifizierungen auf die IgE-Reaktivität zu untersuchen. Beeinflussen diese Strukturen die IgE-Reaktivität, oder sind sie vernachlässigbar, so daß ohne Bedenken rekombinante Allergene eingesetzt werden können?

Material und Methoden

Herstellung des Pollenextraktes

1 g Lieschgras-Pollen (ARTU Biologicals, Lelystad, Niederlande) wurde in 50 ml 0,1 M NH_4HCO_3 -Puffer (pH 8,0) aufgenommen und unter Schütteln 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation bei 17000 x g für 30 Min. (4°C) wurde der Überstand filtriert und gegen Aqua bidest. dialysiert. Die Extraktlösung wurde anschließend lyophilisiert und bei 4°C gelagert.

Patientenseren und monoklonale Antikörper

Für die Untersuchungen wurden Seren von Patienten aus der Ambulanz der Medizinischen Klinik des Forschungsinstituts Borstel ausgewählt, die im RAST (Radioallergosorbent Test) (Pharmacia, Bromma, Schweden) eine Stufe ≥ 3 aufwiesen. Die monoklonalen Antikörper wurden nach Immunisierung mit Lieschgras-Pollenextrakt erhalten. IG 12, Bo 14 und HB 7 sind gegen das Phl p 1 gerichtet, Bo 1 gegen Phl p 5 (7,11).

Affinitätschromatographische Isolierung des Phl p 1

Der monoklonale Antikörper IG 12 wurde an eine HighTrap NHS-Säule nach den Angaben des Herstellers (Pharmacia) kovalent gekoppelt. Die Isolierung des Phl p 1-Allergens aus Pollenextrakt er-

folgte affinitätschromatographisch unter Verwendung von 20 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) als Bindungspuffer und 0,1 M Glycin/HCl-Puffer (pH 3,0) als Elutionspuffer.

Isolierung des rekombinanten Phl p 1

Zur Gewinnung von rekombinantem Phl p 1-Fusionsprotein wurden *E. coli* K12 XL-Blue mit dem Bakteriophagenvektor λ -ZAP transfiziert, der das Plasmid pPHLPI.p1 enthielt (7). Die Expression des Fusionsproteins wurde mit 2 mM Isopropyl β -D-thiogalactopyranosid ausgelöst. Durch Aufkochen der Bakterienzellen in SDS-haltigem Probenpuffer wurden die Zellen lysiert und die Suspension im SDS-PAGE Immunoblot untersucht.

IEF-Immunoprint

Lieschgraspollen Rohextrakt bzw. affinitätschromatographisch isoliertes Phl p 1 (10 $\mu\text{g}/\text{cm}$ Gel) wurde in einem 0,9 %igen Agarosegel mit einem pH-Bereich von 3 bis 10 über 1200 Vh aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mittels Kapillarlösung auf Nitrozellulose übertragen (12,13).

SDS-PAGE Blot

Für die SDS-PAGE (14) wurde Phl p 1 bzw. Lieschgraspollen Rohextrakt (5 $\mu\text{g}/\text{cm}$ Gel) auf ein Gel (T = 15 %, C = 2,6 %) aufgetragen. Für die Untersuchung unter reduzierenden Bedingungen wurden dem Probenpuffer 60 mM DTT zugesetzt, bevor eine Inkubation für 5 Min. bei 95°C erfolgte. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mittels Elektroblothing bei einer Feldstärke von 0,1 mA/cm^2 auf Nitrozellulosemembran übertragen (15).

Proteinfärbung und Immunodetektion

Nach dem Blotten wurden die Proteine auf der Nitrozellulosemembran mit 0,1 % (v/v) India Ink (Pelikan AG, Hannover) in 0,1 M TBS-Puffer (pH 7,4) mit 0,05 % Tween angefärbt (16). Zum immunologischen Nachweis wurden die Transfermembranen nach dem Blocken mit Patientenseren (1:20) bzw. Hybridomzellüberstand (1:1000) inkubiert. Als Sekundärantikörper dienten Alkalische Phosphatase-markierter Ziege anti-Maus IgG+M (Dianova, Hamburg) oder Ziege anti-Human IgE. Der Nachweis erfolgte mit dem Substrat Nitrobluetetrazoliumchlorid (NBT) und 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat Kaliumsalz (BCIP) (Serva, Hamburg) in 0,1 M TBS-Lösung (pH 9,5) (17).

Zur Differenzierung von Kohlenhydratstrukturen wurden Digoxigenin-markierte Lektine (Boehringer

ger, Mannheim) eingesetzt und deren Bindung über Alkaline Phosphatase-markierte anti-Digoxigenin-Antikörper und das NBT/BCIP-Substrat nachgewiesen.

Phosphorylierte Proteine wurden im Immunoblot mit den Alkaline Phosphatase-markierten anti-Serin, anti-Threonin und anti-Tyrosin Antikörpern (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) nachgewiesen. Um die Nachweisempfindlichkeit zu erhöhen, wurde das ECL-System (Amersham International, Buckinghamshire, England) eingesetzt, das über eine Verstärkungsreaktion mit Luminol als Substrat durch Chemilumineszenz detektiert (18).

Epitopmapping mit der Pin-Technologie

Vom N-terminalen Bereich des Phl p 1 wurden überlappende Dekapeptide nach der Merrifield-Synthese (20) hergestellt. Die synthetisierten Peptide wurden im Sandwich-ELISA mit einzelnen Patientenseren auf IgE-Reaktivität getestet.

Computeranalysen

Sequenzdaten wurden mittels PCGENE Software (Intelligenetics, Geel, Belgium) analysiert.

Ergebnisse

1. Vorhersagen über mögliche posttranslationelle Modifizierungen

Von der cDNA Sequenz des Phl p 1 wurde die zugehörige Primärstruktur des Proteins abgeleitet und mit Hilfe von Motivanalysen mögliche posttranslationelle Modifizierungen bestimmt.

Wie aus Abb. 1 hervorgeht, weist das Phl p 1-Molekül 7 Cysteinreste auf, die untereinander Disulfidbrücken bilden und/oder mit einem zweiten Molekül dimerisieren können. Gemäß der Computeranalyse wurden eine Kohlenhydratseitenkette (Aminosäureposition 9) und 7 phosphorylierte Aminosäuren (3 x Phosphoserin, 4 x Phosphothreonin) angegeben. Von der N-terminalen Ansequenzierung des Allergens ist bekannt, daß 2 Prolinreste (Aminosäurepositionen 5 und 8) hydroxyliert sind. Die drei letztgenannten Modifizierungen bewirken, daß das Phl p 1 an den betreffenden Proteinabschnitten hydrophiler wird und damit die Wahrscheinlichkeit als antigene Bindungsstelle zunimmt.

2. IEF-Print zur Detektion individueller IgE-Reaktivitäten gegen Gräserpollenallergene

Zum Nachweis von IgE-Reaktivitäten wurde der IEF-Immunoprint durchgeführt, um die Allergen-

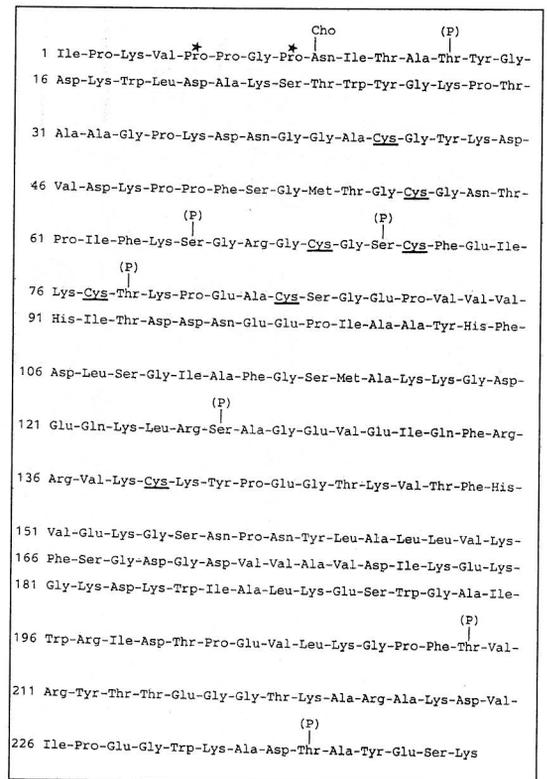


Abb. 1: Computervorhersage von posttranslationellen Modifizierungen am Phl p 1: CHO = Kohlenhydratseitenkette, (P) = Phosphorylierung, Cys = Cysteinreste, die untereinander Disulfidbrücken ausbilden können, * = hydroxylierte Prolinreste.

extrakte möglichst schonend unter nativen Bedingungen zu trennen. Außerdem erlaubt diese hochauflösende Technik, bereits geringfügige Unterschiede in den isoelektrischen Punkten (pI) nachzuweisen und damit genetisch wie auch posttranslationell bedingte Isoformen der Allergene zu erfassen.

Die Abb. 2 zeigt die individuellen Reaktivitäten von monoklonalen Antikörpern und Patientenseren gegen Komponenten des Lieschgrases. Die Bindungsmuster der 3 gegen die Gruppe I-Allergene gerichteten monoklonalen Antikörper IG 12, Bo 14 und HB 7 sind untereinander identisch. Es handelt sich um intensive Banden mit pI 6,1, 6,8, 7,6 und 8,5 und um mehrere schwächere Banden im Bereich von pI 6,0 - 6,5. (Der monoklonale Antikörper Bo 1 detektiert Allergenkomponenten der Gräsergruppe V im pI-Bereich von 4,7 - 8,0.) Vergleicht man die Proteinbanden mit denen von den Patientenseren, so findet man zahlreiche übereinstimmende Banden, die alle oder nahezu alle

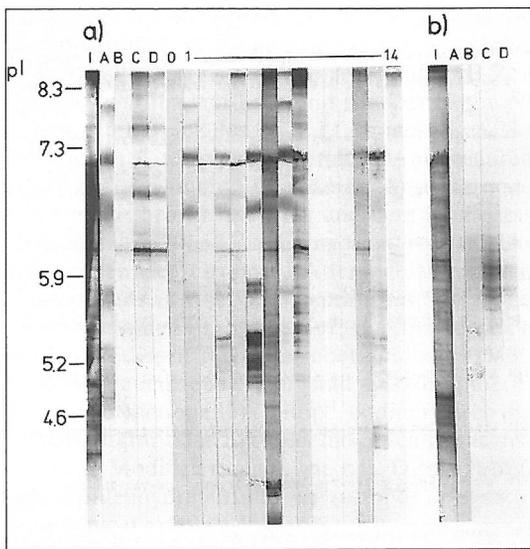


Abb. 2: IgE-Reaktivitäten verschiedener Graspollenallergiker dargestellt im IEF-Print (a), Bindungsmuster der monoklonalen Antikörper gegen affinitätschromatographisch isoliertes Phl p 1 (b). I = Proteinfärbung mit India Ink, A,B,C,D = monoklonale Antikörper Bo 1, IG 12, HB 7, Bo 14, 0 = Normalserum, 1 - 14 = Patientenseren.

Seren detektieren („common allergens“), z.B. bei pI 6,1 und 8,5. Neben diesen übereinstimmend nachgewiesenen Komponenten gibt es auch individuell detektierte Allergene („private allergens“), wie z.B. PS 3 und 4 bei pI 6,8.

Eine genaue Zuordnung der Banden zu den verschiedenen Allergengruppen ist aufgrund der Komplexität und der teilweisen Überlappungen nicht möglich. Schonendere Trennbedingungen, wie z.B. die Gelfiltration konnten aufgrund sehr ähnlicher Molekulargewichte zu anderen Allergenen nicht benutzt werden. Ionenaustauschchromatographie ergab ohne langwierige Trennungsschritte bei uns keine vollständig reine Phl p 1-Fraktion. Deshalb wurde versucht, die Gruppe I-Allergene affinitätschromatographisch zu isolieren. Dazu wurde Gesamtextrakt über eine Säule mit immobilisiertem monoklonalen Antikörper IG 12 geleitet. Die isolierte Phl p 1-Fraktion wurde erneut im IEF-Print aufgetrennt und mit monoklonalen Antikörpern und Patientenseren untersucht. Gegenüber dem unvorbehandelten Gesamtextrakt zeigten sich stark veränderte Bindungsmuster (Abb. 1b): Die monoklonalen Antikörper binden im pI-Bereich 5,3 - 6,2. Dies wurde auf die teilweise denaturierenden Elutionsbedingungen zurückgeführt. Für eine effektive Aufreinigung wurde in

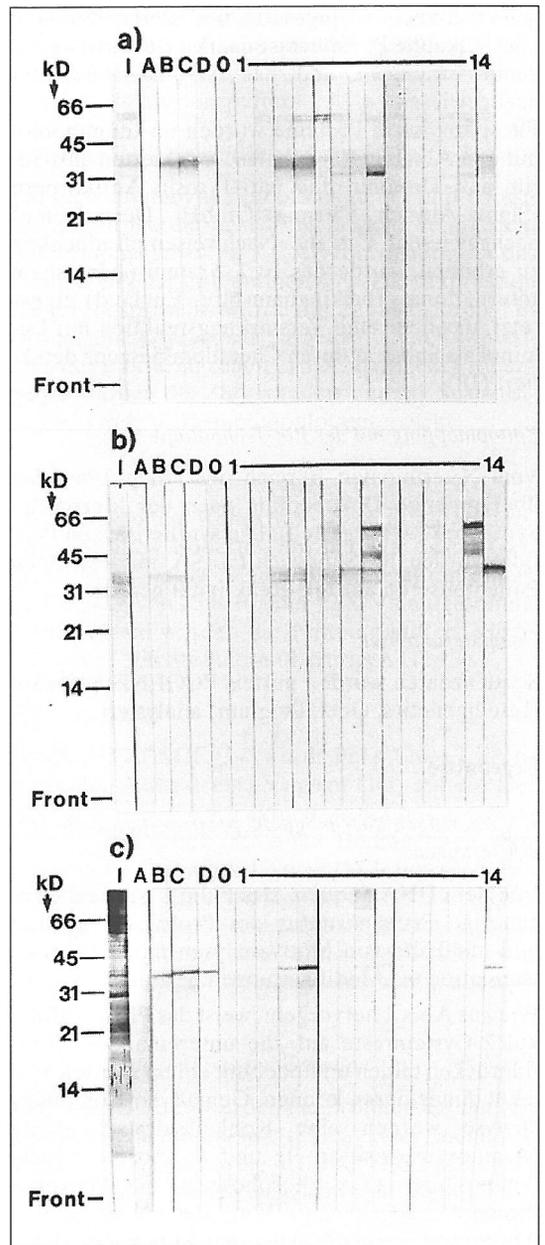


Abb. 3: IgE-Reaktivitäten verschiedener Graspollenallergiker gegen affinitätschromatographisch isoliertes Phl p 1. (a) Trennung unter nicht reduzierenden Bedingungen, (b) Trennung unter reduzierenden Bedingungen) und gegen rekombinantes Phl p 1 aus *E. coli* Zellysat (c). I = Proteinfärbung mit India Ink, A,B,C,D = monoklonale Antikörper Bo 1, IG 12, HB 7, Bo 14, 0 = Normalserum, 1 - 14 = Patientenseren. (mit Genehmigung des VCH Verlages, Weinheim) (20).

den weiteren Untersuchungen trotz dieser Nachteile das affinitätschromatographisch isolierte Phl p 1 eingesetzt.

3. Einfluß von Disulfidbrücken auf die IgE-Reaktivitäten

Das isolierte Phl p 1 wurde unter reduzierenden und unter nicht reduzierenden Bedingungen in der SDS-Elektrophorese aufgetrennt, geblottet und immunologisch untersucht.

Abb. 3 zeigt IgE-Reaktivitäten von individuellen Patientenseren, links unter Bewahrung der Disulfidbrücken (nicht reduzierend), rechts nach Spaltung der Cystine durch 60 mM DTT (reduzierend). Hauptreaktivitäten liegen im Bereich von 37-33 kD. Unter nicht reduzierenden Bedingungen weisen viele Proben zusätzliche Banden bei etwa 60 kD auf. Dies zeigt, daß auch die Phl p 1-Dimere IgE-Reaktivität besitzen. Nicht reduzierend behandeltes Phl p 1 weist nach Western Blotting weniger scharfe Banden auf, als die entsprechenden reduzierend behandelten Membranstreifen. Das Bindungsmuster der Patientenseren Nr. 3 und 4 erscheint bei den nicht reduzierten Proben gegenüber den reduzierten intensiver, was auf einen Verlust von IgE-bindenden Epitopen durch Reduktion hindeutet. Andererseits zeigen Seren wie PS 8 und 13 das umgekehrte Verhalten. Mit dem rekombinanten Phl p 1, das als Fusionsprotein ein Molekulargewicht von 38 kD aufweist, reagieren die Patientenseren z.T. schwächer; keine Bindung konnte bei den Seren 1, 2, 5, 6 und 9 - 13 nachgewiesen werden.

3. IgE-Reaktivität der Kohlenhydratseitenkette

Um IgE-reaktive Epitope auf der Kohlenhydratseitenkette zu identifizieren, wurde nach dem Blotting ein Teil der Nitrozellulosestreifen mit Natriumperjodatlösung behandelt. Die Reaktionsbedingungen mußten so eingestellt werden, daß die Kohlenhydratstrukturen möglichst vollständig zerstört wurden, ohne den Proteinanteil zu verändern. Unter diesen Bedingungen bindet das Lektin *Aleuria aurantia* Agglutinin, das gegen Kohlenhydratstrukturen gerichtet ist, nicht mehr, während der gegen den Proteinanteil gerichtete monoklonale Antikörper IG 12 in seinem Bindungsverhalten unbeeinflusst ist.

Abb. 4 zeigt die IgE-Reaktivitäten von 3 Patientenseren nach Westernblot (Proben 6 - 8). Aufgetrennt wurde Lieschgraspollen Gesamtextrakt ohne Vorbehandlung (a) und mit Perjodat-Behandlung (b). Außerdem wurden die Reaktivitäten auf dem rekombinanten Phl p 1-Fusionsprotein

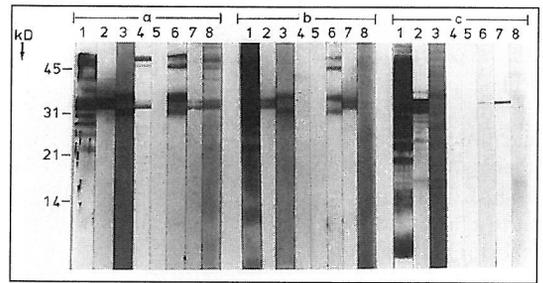


Abb. 4: Identifizierung von IgE-reaktiven Strukturen des Phl p 1. Westernblot von Lieschgras Pollenextrakt: a) unbehandelt, b) Perjodat-behandelt, c) Blotting von *E. coli* Zellysate, das das rekombinante unglykosylierte Phl p 1-Fusionsprotein enthält. 1 = Proteinfärbung mit India Ink, 2 = monoklonaler Antikörper IG 12, 3 = monoklonaler Antikörper Bo 1, 4 = *Aleuria aurantia* Agglutinin, 5 = Kontrollserum, 6 - 8 = individuelle Patientenseren.

aus *E. coli*-Zellysate getestet (c). Bei den Patientenseren 6 und 7 ruft die Perjodatoxidation keine Veränderung gegenüber den unbehandelten Nitrozellulosestreifen hervor. Probe 8 weist nach Periodatbehandlung keine Reaktivität zum Phl p 1 auf. Auch das rekombinante, unglykosylierte Fusionsprotein zeigt bei diesem Patientenserum keine Bindung. Bei einigen der untersuchten Seren war eine Abschwächung nach Perjodatbehandlung nachweisbar. Diese Ergebnisse beweisen, daß die Kohlenhydratstrukturen IgE-reaktive Epitope tragen können.

4. Nachweis von phosphorylierten Aminosäuren im Phl p 1

Die Bestimmung von phosphorylierten Aminosäuren wurde immunologisch mit Hilfe von enzymmarkierten Antikörpern gegen Phosphoserin, -threonin und -tyrosin geführt. Nach SDS-PAGE Blot wurden die geeigneten Antikörperkonzentrationen in Verdünnungsreihen ausgetestet und über Chemiluminiszenz bestimmt.

Wie in Abb. 5 dargestellt, weisen alle 3 Antikörper eine Bande im Bereich von 35 kD nach. Dies ist trotz der starken Hintergrundfärbung beim Nachweis von Phosphoserin und -threonin erkennbar. Neben den bereits über die Computervorhersagen postulierten Aminosäuren konnten auch Phosphotyrosin-Phosphorylierungen nachgewiesen werden. Die Lokalisierung der Phosphorylierungsstellen und ihr Einfluß auf die IgE-Bindung wurden bisher noch nicht untersucht.

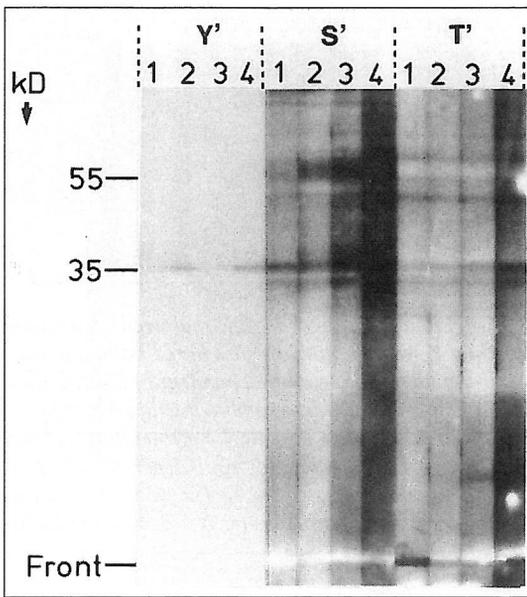


Abb. 5: Immunologischer Nachweis auf phosphorylierte Aminosäuren mit der Chemilumineszenzmethode. 1 = Proteinfärbung, 1 = moab Bo 1, 2 = moab IG 12, a - d = Verdünnungsstufen des Sekundäntikörpers (anti-Phosphotyrosin (Y') 1:1000 - 1:8000), anti-Phosphoserin (S') und -threonin (T') 1:25 - 1:200).

5. Einfluß von Hydroxyprolinresten

Durch die N-terminale Ansequenzierung waren an den Positionen 5 und 8 der Aminosäuresequenz Hydroxyprolin-Reste bestimmt worden. Um den Einfluß dieser posttranslationalen Modifizierungen zu bestimmen, wurden überlappende Dekapeptide mit Hydroxyprolinresten bzw. Prolinresten synthetisiert und die Reaktivität verschiedener Patientenserum getestet.

Die Abb. 6 zeigt die im ELISA bestimmten IgE-Reaktivitäten von einem Patientenserum und einem Kontrollserum. Die Modifizierungen beziehen sich nur auf die 3 ersten Dekapeptide, die mit einem Versatz von drei Aminosäuren synthetisiert wurden. Das Patientenserum weist eine deutliche Reaktivität zum N-Terminus des Phl p 1 auf (Peptid 1). Die Bindungsstärke zum Hydroxyprolin-enhaltenden Peptid liegt um etwa 30 % höher als in dem posttranslational unmodifizierten. Damit ist auch eine Verstärkung der IgE-Reaktivität durch die Hydroxylierung nachgewiesen.

Diskussion

Die Gruppe I-Allergene werden von 95 % der Gräserpollenallergiker detektiert (Majorallerge-

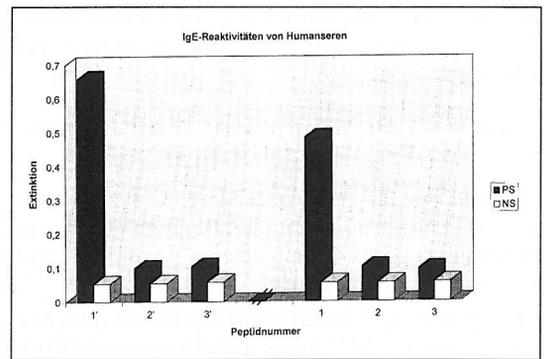


Abb. 6: Untersuchung des Einflusses von posttranslationaler Hydroxylierung des Prolins auf die IgE-Bindung von einem Patientenserum (PS) und einem Kontrollserum (NS). Es wurden folgende synthetische Dekapeptide im ELISA getestet: 1) IPKVXPGXNI, 2) VXPGXNITAT, 3) GXNITATYGD. In den Peptiden 1' - 3' steht X für Hydroxyprolin, in den Peptiden 1 - 3 für Prolin.

ne) (5) und spielen daher sowohl für die Diagnostik als auch für die Hyposensibilisierungstherapie der Gräserpollenallergie eine entscheidende Rolle. Durch unsere Untersuchungen konnten wir zeigen, daß das Phl p 1 eine Vielzahl von posttranslationalen Modifizierungen aufweist, die einen Einfluß auf die IgE-Reaktivität haben. Diese Strukturen fehlen bei den in *E. coli* exprimierten Proteinen.

Der Nachweis aller IgE-bindenden Strukturen auf einem Allergen ist unmöglich, da bereits während der Extraktion und Isolierung denaturierende Prozesse ablaufen können, die das Allergen verändern. So können bei der Herstellung von Pollenextrakten Enzyme wirksam werden, die die Proteine abbauen. Beim Dialysieren und bei der Elution zur Isolierung des Allergens (Phl p 1) können weitere Denaturierungen auftreten, die ein verändertes Protein- und Reaktionsmuster im Immunoprint bewirken. Die schonende und weitgehend native Elektrofokussierung eignet sich aufgrund des komplexen Trennmusters für unsere Untersuchungen nicht. Bei der SDS-Elektrophorese wird das ionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) verwendet, das die räumliche Struktur der Proteine und damit die nicht kovalent fixierten Epitope zerstört. Diese Epitope lassen sich dann im Westernblot nicht mehr nachweisen. Weiter im Molekülinneren gelegene Bereiche werden dagegen durch die SDS-Behandlung zugänglich gemacht. So können IgE-Reaktivitäten, die nach IEF-Print nicht nachweisbar waren, im Westernblot detek-

tiert werden. Schließlich findet durch die Abtrennung des SDS vom Protein während des ElektrobloTTings eine teilweise „Renaturierung“ statt. Alle diese Effekte müssen bei der Interpretation der Reaktivitäten berücksichtigt werden.

Die Proteinsequenz des Phl p 1 weist 7 Cysteinreste auf (Aminosäuren Nr. 41, 57, 69, 72, 77, 83, 139), die im mittleren Bereich des Moleküls liegen (7). Das Vorhandensein intramolekularer Disulfidbrücken konnten wir aus dem Bindungsmuster von monoklonalen Antikörpern gegen Phl p 1 erschließen, das sich unter zunehmender Konzentration des Reduktionsmittels geringfügig verändert. Die IgE-Bindung einzelner Patientenserum ist unter reduzierenden Bedingungen deutlich niedriger als unter nicht reduzierenden Bedingungen. Dies deutet darauf hin, daß ein Teil der IgE-reaktiven Epitope im Bereich der Disulfidbrücken liegt und bei der Reduktion zerstört wird. Andererseits weisen einige andere Seren stärkere IgE-Reaktivitäten gegen das reduziert vorliegende Phl p 1 hin. Denn verborgene Bereiche im nativen Molekül werden durch die Reduktion für Antikörper zugänglich gemacht (kryptogene Epitope).

Untersuchungen von Esch & Klapper (9) und Schramm (10) identifizierten IgE-reaktive Bereiche im N- und C-Terminus des Gruppe I-Proteins, dagegen keine im mittleren Teil des Proteins, obwohl nach Computervorhersagen für antigene Bindungsstellen z.T. hohe antigene Indices ermittelt wurden (Algorithmus von Jameson und Wolf, 21). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz wäre, daß das Molekül unter nativen (unreduzierten) Bedingungen durch die Disulfidbrücken eine stark veränderte räumliche Struktur einnimmt gegenüber dem rekombinanten Phl p 1 aus *E. coli*, das keine Disulfidbrücken besitzt.

Bufe et al. (22) aus unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, daß nach kurzer Inkubation von Gräserpollengesamtextrakt mit Nasensekret Allergenfragmente gebildet werden. Dies entspricht der in vivo Situation beim Kontakt der Pollen mit der Nasenschleimhaut. Nicht die intakten Gesamtallergemoleküle binden letztlich an die FcεI-Rezeptoren auf den Effektorzellen (Basophilen und Mastzellen), sondern IgE-reaktive Fragmente des Allergens. Diese Fragmente können, da sie Disulfidbrücken enthalten, sich strukturell stark von denen aus rekombinanten Allergenen bzw. reduzierten Proben unterscheiden. Außerdem sieht die räumliche Struktur der Fragmente anders aus als die der betreffenden Teilstrukturen im Gesamtmolekül. So bleiben auch die konformationellen Epitope nur z.T. erhalten. Die Bestimmung, welche Cysteinreste miteinander verknüpft sind, ist daher

ganz entscheidend für die Allergenität und ist eines unserer gegenwärtigen Untersuchungsprojekte.

Ein Einfluß der Kohlenhydratstrukturen auf die IgE-Reaktivität konnte bei einzelnen Seren nachgewiesen werden. Ein Serum zeigte nach Perjodat-oxidation gar keine Bindung mehr. Das *Aleuria aurantia* Agglutinin, das intensiv mit dem Phl p 1 reagiert, detektiert α-Fucose-Reste. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß möglicherweise eine α1,3-Fucosylierung vorliegen könnte (20). Diese Kohlenhydratstrukturen werden auch für die stark antigene Wirkung der Meerrettichperoxidase und z.T. für die allergische Reaktion auf die Phospholipase A2 im Bienengift verantwortlich gemacht (23). Ein starker Hinweis auf IgE-Reaktivität, bedingt durch Kohlenhydratstrukturen, ist dann gegeben, wenn ein Patient Allergien gegen phylogenetisch sehr unterschiedliche Allergenquellen zeigt, wie z. B. Nahrungsmittel, Pollen und Insektengift (24). Um das Phl p 1 in glycosylierter Form zu erhalten, arbeiten wir zur Zeit an der Expression des Allergens in der Hefe.

Sicherlich weniger starken Einfluß auf die Allergenität haben Hydroxylierungen und Phosphorylierungen, da sie das Allergen nur sehr lokal hydrophiler machen. Durch die 2 Hydroxyprolinreste wurde eine 30 %ige Steigerung der IgE-Reaktivität gegenüber dem unmodifizierten Peptid gefunden, das auch bereits eine deutliche Bindung aufwies. Phosphoryliert ist oft nur ein bestimmter Anteil der Moleküle. Der Nachweis von phosphorylierten Aminosäuren ist durch Fragmentierung des Phl p 1 und Identifizierung mittels Proteinsequenzierung oder Massenspektroskopie möglich.

Bei der Bestimmung von B-Zell-Epitopen müssen auch die posttranslationalen Modifizierungen berücksichtigt werden. Das Phl p 1 weist durch die intramolekularen Disulfidbrücken fixierte konformationelle Epitope auf. *E. coli* besitzt die Fähigkeit zur Bildung von Cystinen in den rekombinanten Proteinen nicht (25). Unter in vivo Bedingungen bleiben aber die Disulfidbrücken des natürlichen Phl p 1 auch nach enzymatischer Fragmentierung erhalten. Um diese für die räumliche Struktur des Allergens sehr wichtigen Disulfidbrücken im rekombinanten Allergen zu bilden, kann unter kontrollierten Bedingungen eine langsame und schonende Oxidation durchgeführt werden (26). Ob die so erhaltenen Allergene dann den nativen entsprechen, muß auf jeden Fall kontrolliert werden. Bei 7 Cysteinresten, wie im Fall des Phl p 1, erscheint dies allerdings fraglich.

Das in *E. coli* exprimierte Phl p 1-Allergen besitzt keinen Kohlenhydratanteil. Um ein glycosyliertes

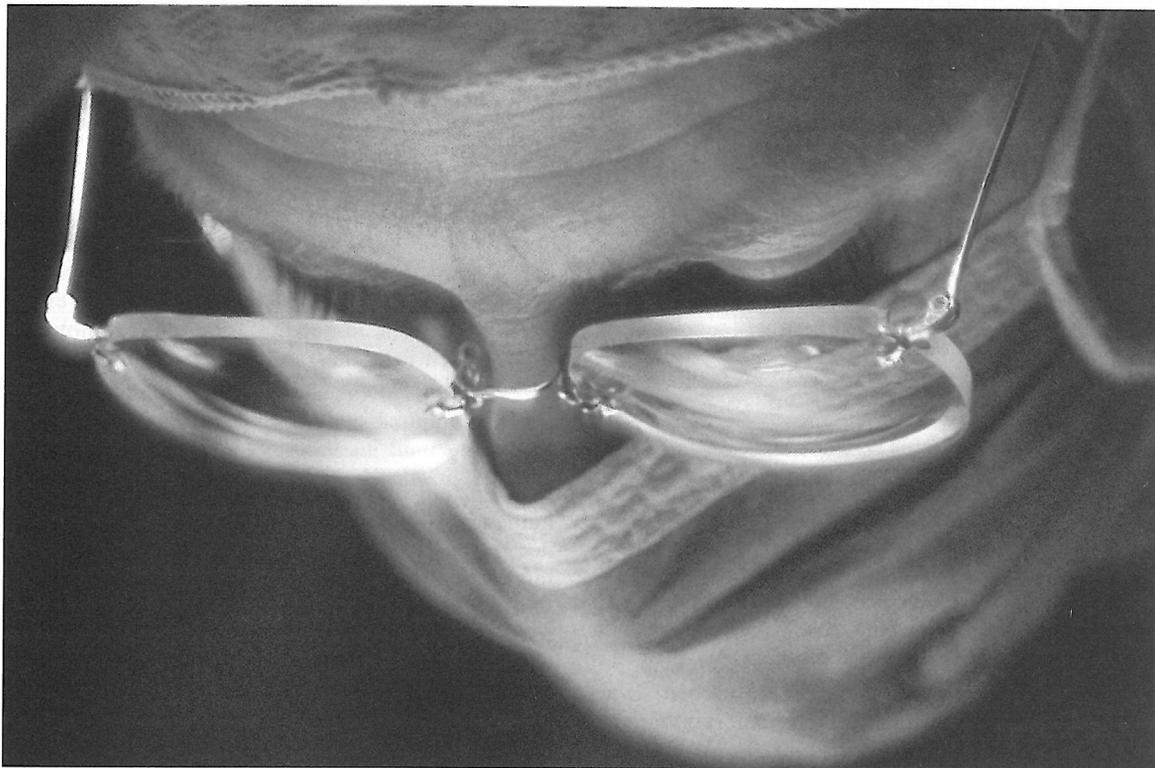
Protein zu erhalten, müssen andere Expressionssysteme, wie z. B. Hefen, eingesetzt werden. Nach Erhalt dieses rekombinanten Allergens muß auf Übereinstimmung mit dem natürlichen Allergen geprüft werden, da viele Expressionssysteme zu einer Überglykosylierung neigen (27).

Unsere Ergebnisse zeigen deutlich die Komplexität der Struktur-Wirkungs-Beziehungen. Auf der Strukturseite haben wir es mit einer hohen Allergenvielfalt zu tun (Isoallergene des Phl p 1). Dieser steht die hohe Individualität in der Immunantwort der Allergiker gegenüber. Das Verständnis dieser komplexen Vorgänge ist notwendig, um die Wechselbeziehungen zwischen Allergenstruktur und Immunantwort zu verstehen. Erst dann ist eine gezielte, verbesserte Immuntherapie möglich.

Literatur

- Weeke B, Løwenstein H (1973). Epidemiology of hay fever and perennial allergic rhinitis. Monogr Allergy 21, 1-20
- Lawlor GJ, Fischer TJ (1982). Manual of allergy and immunology. Diagnosis and therapy. Little, Brown and Company, Boston
- Scheiner O, Kraft D (1995). Basic and practical aspects of recombinant allergens. Allergy 50, 384-391
- Marsh DG, Goodfriend L, King TP, Løwenstein H, Platts-Mills TAE (1986). Allergen nomenclature. Bull WHO 64, 767-770
- Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, John MS (1986). A study of the immune response to *Lolium perenne* (rye) pollen and its components, *Lol p I* and *Lol p II* (Rye I and Rye II). J Allergy Clin Immunol 78, 1190-1200
- Perez M, Ishioka GY, Walker LE, Chesnut RW (1990). cDNA cloning and immunological characterization of rye grass allergen *Lol p I*. J Biol Chem 265, 16210-16215
- Petersen A, Bufe A, Schramm G, Schlaak M, Becker WM (1995). Structural investigations of the major allergen *Phl p I* on the cDNA and protein level. J Allergy Clin Immunol 95, 987-994
- Schramm G, Bufe A, Petersen A, Becker WM, Schlaak M (1993). cDNA cloning and sequencing of *Hol 1 I* and *Hol 1 V* the major allergens of *Holcus lanatus*. Allergy 48, 127 (Abstract)
- Esch RE, Klapper DG (1989). Identification and localization of allergenic determinants on grass group I antigens using monoclonal antibodies. J Immunol 142, 179-184
- Schramm G (1995) Identifizierung IgE-reaktiver Epitope des Honiggrases (*Holcus lanatus*). Dissertation Bayreuth
- Becker WM, Schaubschläger W, Westphal W, Schlaak M (1988). Purification of grass pollen allergens by means of immobilized monoclonal antibodies. In: Chmiel H, Hammes WP, Baily JE, eds. Biochemical engineering. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 440-442
- Haas H, Becker WM, Maasch HJ (1986). Analysis of the allergen components in grass pollen extracts using immunoblotting. Int Arch Allergy Appl Immunol 79, 434-440
- Peltre G, Lapeyre J, David B (1982). Heterogeneity of the grass pollen allergens (*Dactylis glomerata*) recognized by IgE antibodies in human patient sera by a new nitrocellulose immunoprint technique. Immunol Lett 5, 127-131
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685
- Kyhse-Anderson J (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. Biophys Meth 10, 203-209
- Hancock K, Tsang VCW (1983). India ink staining of proteins of nitrocellulose paper. Anal Biochem 133, 157-162
- Leary JJ, Brigati DJ, Ward DC (1983). Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blot. Proc Natl Acad Sci USA 80, 4045-4049
- Ong EK, Suphioglu C, Singh MB, Knox RB (1990). Immunodetection method for grass pollen allergens on western blots. Int Arch Allergy Appl Immunol 93, 338-343
- Geysen HM, Rodda SJ, Mason TJ, Tribbick G, Schoofs PG (1987). Strategies for epitope analysis using peptide synthesis. J Immunol Meth 102, 259-274
- Petersen A, Becker WM, Moll H, Blümke M, Schlaak M (1995). Studies on the carbohydrate moieties of the timothy grass pollen allergen *Phl p I*. Electrophoresis 16, 869-875
- Jameson BA, Wolf H (1988). The antigenic index; a novel algorithm for predicting antigenic determinants. CABIOS 4, 181-186
- Bufe A, Schramm G, Petersen A, Schlaak M, Becker WM (1994). Allergy Clin Immunol News Supplement 2, 88, Abstr. 312
- Tretter V, Altmann F, Kubelka V, März L, Becker WM (1993). Fucose $\alpha 1,3$ -linked to the core region of glycoprotein N-glycans creates an important epitope for IgE from honeybee venom allergic individuals. Int Arch Allergy Immunol 102, 259-266
- Aalberse RC, Koshte V, Clemens GJG (1981). Immunoglobulin E antibodies that crossreact with vegetable foods, pollen, and Hymenoptera venom. J Allergy Clin Immunol 68, 356-364
- Brown TA (1990). Gene cloning. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg
- Marston FAO (1986). The purification of eucaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. Biochem J 240, 1-12
- Kukuruzinska MA, Bergh MLE, Jackson BJ (1987). Protein glycosylation in yeast. Ann Rev Biochem 56, 915-944.

Sie leisten ganze Arbeit im OP.



Ihre postoperative Thromboembolie-Prophylaxe muß es auch.

Fraxiparin® 0,3

Das Menschenmögliche

Wirkstoff: Heparinfraktion-Calcium von Heparin aus Schweinedarmmukosa, mittlere Molekülmasse 4000 - 5000. **Zusammensetzung:** 1 Fertigspritze Fraxiparin 0,3 mit 0,3 ml Injektionslösung enthält: 36 mg Heparinfraktion-Calcium von Heparin aus Schweinedarmmukosa, mittlere Molekülmasse 4000 - 5000. **Andere Bestandteile:** Calciumhydroxid-Lösung, Wasser für Injektionszwecke. **Anwendungsgebiete:** Bei erhöhtem thromboembolischem Risiko zur Verhütung von thromboembolischen Prozessen nach Operationen. **Gegenanzeigen:** Überempfindlichkeit gegen Heparin einschließlich immunologisch bedingter heparininduzierter Thrombozytopenie (Typ II), frische intrazerebrale und/oder gastrointestinale Blutungen, hämorrhagische Erkrankungen, akute Pankreatitis, drohende Fehlgeburt, Endocarditis lenta. Als relative Gegenanzeigen gelten: die fixierte arterielle Hypertonie (systolisch > 200 mm Hg, diastolisch > 110 mm Hg); nicht abgeheilte Magen-Darm-Ulzera; begleitende Behandlung mit Substanzen, die eine Wirkung auf das Gerinnungs- oder Thrombozytensystem aufweisen; Hämodilution; anamnestisch bekannte intrazerebrale Blutungen bei Gefäßaneurysmen. Fraxiparin 0,3 sollte in der Schwangerschaft nicht verabreicht werden, da über die Unbedenklichkeit der Anwendung noch keine ausreichenden Erfahrungen vorliegen. Tierexperimentelle Studien ha-

ben keine Hinweise auf fruchtschädigende Einflüsse ergeben. **Nebenwirkungen:** In Einzelfällen oder bei Überdosierung sind Haut- oder Schleimhautblutungen möglich. Gelegentlich tritt eine leichte vorübergehende Thrombozytopenie (Typ I) auf. Selten sind lokale Hautreaktionen, vorübergehender Abfall des Aldosteronspiegels mit Anstieg der Blutkaliumkonzentration, antikörpervermittelte schwere Thrombozytopenie (Typ II); sehr selten sind generalisierte Hautreaktionen; in Einzelfällen treten Hautnekrosen, vorübergehender Haarausfall, vorübergehender Anstieg der Leberenzyme auf. Das Auftreten seltener Nebenwirkungen der Therapie mit unfractioniertem Heparin ist unter Fraxiparin 0,3 nicht grundsätzlich auszuschließen. Osteoporose und Priapismus sind bisher nicht beobachtet worden. **Dosierung:** Eine Fertigspritze Fraxiparin 0,3 zwei Stunden vor der Operation s.c., anschließend einmal täglich s.c. bis zur vollständigen Mobilisierung. **Hinweis:** Kontrollen der Thrombozytenzahl sollten regelmäßig in den ersten drei Wochen durchgeführt werden. **Packungsgrößen und Preise:** OP mit 10 Fertigspritzen zu 0,3 ml (N1) DM 99,-, OP mit 20 Fertigspritzen zu 0,3 ml (N2) DM 189,27; Klinikpackung. Verschreibungspflichtig. Stand: Januar 1995. **SANOFI WINTHROP GmbH, 80323 München**

sano  **WINTHROP**

Die Bedeutung des Epstein-Barr-Virus in lymphoblastoiden Zelllinien – Beziehungen zum Morbus Hodgkin und großzellig anaplastischen Lymphomen

H. Merz, A. Müller, C. Schoch*, C. Fonatsch*, A. C. Feller

Zusammenfassung

Die Pathogenese maligner Lymphome ist in vielen Fällen – trotz intensiver Forschungsbemühungen – ungeklärt. Zweifelsfrei ist der Zusammenhang zwischen der Epstein-Barr-Virus-Infektion und dem endemischen Burkitt-Lymphom. Auch bei immunsupprimierten Patienten kennt man den Zusammenhang zwischen Epstein-Barr-Virus-Reaktivierungen und der Entstehung von B-Zell-Lymphoproliferationen, die sich nach Unterbrechung der immunsuppressiven Therapie vollständig zurückbilden können, bei Fortsetzen der Therapie jedoch zu einer Progression mit fatalem Ausgang führen.

Im Morbus Hodgkin und der verwandten Lymphomentität des großzelligen anaplastischen Lymphoms finden sich mehrere Besonderheiten. Obwohl in ca. der Hälfte der Fälle das Virus in den neoplastischen Lymphozyten nachgewiesen werden kann, ist die Bedeutung des Virus für die Tumorentstehung offen, zumal einerseits die überwiegende Mehrzahl aller infizierten Träger nie ein Lymphom entwickeln, andererseits morphologisch identische Lymphomentitäten Epstein-Barr-Virus enthalten können oder nicht.

Epstein-Barr-Virus-infizierte B-Zellen weisen große morphologische, immunologische und funktionelle Parallelen zu den neoplastischen Zellen des Morbus Hodgkin und des großzelligen anaplastischen Lymphoms auf.

Die großen, häufig bi- oder multinucleären blastären Zellen exprimieren teilweise identische Antigene, vor allem Aktivierungsantigene, während einzelne Differenzierungsantigene verloren gehen oder nicht nachweisbar sind. Zahlreiche Zytokine und Zytokin-Rezeptoren werden von „lymphoblastoiden“ und Hodgkin- und Sternberg-Reed-Zellen exprimiert. Eine Besonderheit stellt dabei die aberrante Expression von Zytokinen dar, welche auf autokrine Mechanismen in der Pathogenese schließen lassen. Die Entwicklung von zunehmenden chromosomalen Abberationen im Zeitverlauf

dürfte für die Entstehung der Neoplasien entscheidend sein, wobei dem Epstein-Barr-Virus eine entscheidende Rolle in der Initiation und Promotion in (Mehrschrittmodell) der Tumorentstehung zukommen dürfte.

Einleitung

Das Epstein-Barr-Virus (EBV), ein ubiquitäres, humanes, B-lymphotropes Virus aus der Gruppe der Herpesviren, spielt eine kausale Rolle bei der infektiösen Mononukleose (IM), dem endemischen Burkitt-Lymphom (eBL), lympho-proliferativen (Ip) Erkrankungen bei angeborenen oder erworbenen Immundefizienzen sowie beim endemischen Nasopharynx-Karzinom (eNPC).

Die Bedeutung des EBV für maligne Lymphome, wie Morbus Hodgkin (MH), großzellig anaplastisches Lymphom (LCL), T-Zell Lymphom vom AILD-Typ und andere seltene T-Zell Lymphome wird zur Zeit kontrovers beurteilt (Klein 1994, Pallesen et al. 1993).

Das Epstein-Barr-Virus kann B-Zellen mit hoher Effizienz *in vitro* und *in vivo* immortalisieren. Es konnte gezeigt werden, daß das Epstein-Barr-Virus (EBV) von allen bekannten Viren die höchste transformierende Kapazität aufweist (Klein 1994). Nur eine kleine Minderheit von infizierten Trägern erkrankt im Laufe des Lebens an einer der o.g. EBV-assoziierten Erkrankungen. EBV-infizierte B-Lymphozyten bewirken, da sie hoch immunogen sind, im immunkompetenten Wirt eine starke zytotoxische T-Zell Antwort, unabhängig vom MHC-Phänotyp. Dennoch kann das Virus nicht vollständig eliminiert werden, sondern verbleibt vielmehr lebenslang in B-Lymphozyten des Knochenmarks, des Lymphknotens und Mucosa-assoziiierter lymphatischer Organe. Eine veränderte Immunüberwachung (Verlust der Immunkompetenz), eine Veränderung des EBV-Latenzstatus, eine Veränderung des Methylierungsmusters (Hu et al) und genomische Veränderungen, sowie die Integration

an unterschiedlichen Stellen in das Wirtsgenom mögen für die paradoxen Beobachtungen bei EBV-assoziierten malignen Lymphomen, aber auch bei anderen EBV-assoziierten Erkrankungen bedeutsam sein (Delecluse et al, Henderson et al, Lestou et al).

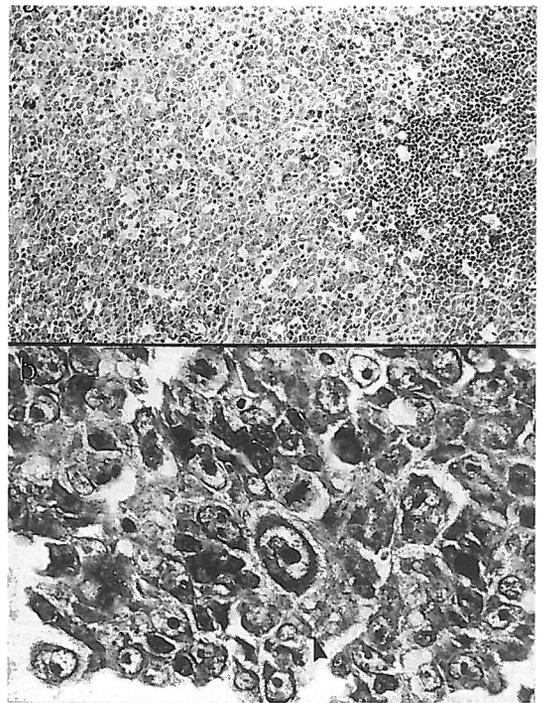
In vitro Versuche haben gezeigt, daß EBV infizierte B-Zellen neben der typischen Expression von B-Zell-Antigenen Zellaktivierungsantigene an der Oberfläche nachweisen lassen (CD25, CD30), die u. a. auch im MH, bei LCAL, AILD und anderen T-Zell Lymphomen von Tumorzellen exprimiert werden, die jedoch im gesunden Individuum auf Lymphozyten wenig oder nicht nachgewiesen werden. Derartig transformierte und immortalisierte B-Zellen wachsen in der Kultur ohne Begrenzung und ohne Zugabe besonderer Wachstumsfaktoren.

In mindestens 50 % der Fälle von Morbus Hodgkin sowie großzellig anaplastischen Lymphomen und auch einigen T-Zell-Lymphomen findet man eine EBV-Infektion, die durch den Nachweis klonaler EBV-Genom-Anteile Hinweise dafür gibt, daß die Infektion auf einer sehr frühen Stufe der Neoplasieentstehung stattgefunden hat (Boiocci et al, Brousset et al).

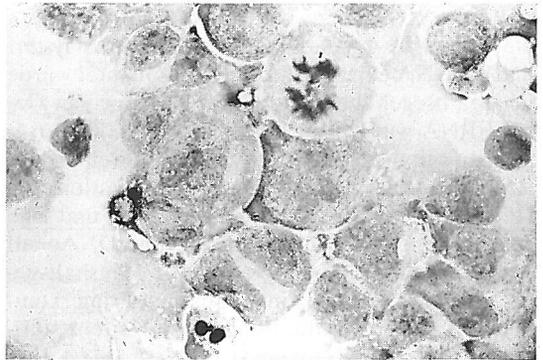
Wenn EBV in der Lage ist, B-Zellen zu immortalisieren, und offenbar unter bestimmten Voraussetzungen auch in der Lage ist, T-Zellen zu infizieren, stellt sich die Frage, welche Bedeutung eine EBV-Infektion für die Tumor-Entstehung und das Tumor-Wachstum hat, wenn innerhalb einer Entität lediglich 50 % der Fälle eine solche Infektion nachweisen lassen.

Lymphoblastoide Zelllinien können spontan aus dem peripheren Blut von Patienten mit infektiöser Mononukleose (Abb.1a,b), Transplantaten oder HIV-Infektionen gewonnen werden. Ebenso können aber derartige Zelllinien aus dem peripheren Blut normaler gesunder Spender entstehen, die in der Vergangenheit eine EBV-Infektion durchgemacht haben. Schließlich können derartige Zelllinien auch aus Tumormaterial gewonnen werden, wie etwa bei dem Versuch, Tumorzelllinien aus Material von Morbus Hodgkin zu gewinnen (Abb. 2). Die EBV-positiven, offenbar nicht-neoplastischen B-Zellen besitzen jedoch in vitro einen Wachstumsvorteil, so daß die Etablierung derartiger lymphoblastoider Zelllinien aus solchem Material häufig gelingt.

In der vorliegenden Arbeit haben wir eine systematische Analyse lymphoblastoider Zelllinien im Vergleich zu MH und LCAL-Zelllinien über zwei Jahre durchgeführt. Dabei haben wir die phänotypischen und genotypischen Veränderungen stu-



1. Virusassoziierte, partiell destruierende Lymphadenitis (infektiöse Mononukleose). Rasen von „lymphoblastoiden“ Zellen (Pfeiffer-Zellen)(a), die in der Vergrößerung (b) einen hohen Pleomorphiegrad aufweisen (Zelle mit Pfeil: hodgkinähnlich)



2. Lymphoblastoide Zelllinie nach Etablierung in Kultur. Pappenheim-Färbung. Einzelne mehrkernige (Sternberg-Reed ähnliche Zellen).

diert, die im Laufe der Zeit entstehen. Der von uns geführte Nachweis einer Expression zahlreicher Zytokine soll im folgenden ein Modell aufzeichnen, welches Aspekte der Bedeutung der EBV-Infektion in einigen Lymphom-Entitäten beleuchtet.

Material und Methoden:

Mehrere lymphoblastoide Zelllinien (Latenz-3-Gruppe) konnten aus Lymphknotenbiopsien von Patienten mit Morbus Hodgkin etabliert werden. Daneben gelang es, zwei großzellige anaplastische Lymphomzelllinien zu etablieren, wovon eine spontan aus peripheren Blutlymphozyten eines gesunden Spenders nach Langzeitkultur etabliert werden konnte (HAKI), während die Zelllinie L82 von einem Patienten mit großzelligem anaplastischen Lymphom mit malignem Pleuraerguß etabliert wurde. Die großzelligen anaplastischen Lymphomzelllinien DEL und SKA wurden zur Verfügung gestellt (Netzelof, Kadin). Die Hodgkin Zelllinien CO, L540, L428 (Diehl), KMH2 und HDLM2 sind seit Jahren etabliert und teilweise kommerziell erhältlich.

Bestimmung der Antigenexpression

Eine Phänotypisierung der Zelllinien erfolgte durch immunhistologische Antigendarstellung und durch FACS-Analyse. Es wurden die Antigene CD3, CD4, CD15, CD19, CD21, CD23, CD25, CD30, Mac387, EBV-EBNA, EBV-LMP bestimmt.

RNA-Analysen

Die genannten Zelllinien von Morbus Hodgkin, großzelligen anaplastischen Lymphomen und die lymphoblastoiden Zelllinien wurden zu unterschiedlichen Zeiträumen auf ihre Zytokinexpression auf mRNA-Ebene untersucht. Dabei wurden die Zellen in Guanidinium-iso-thiocyanat lysiert und die RNA extrahiert. Die RNA-Qualität wurde im Agarosegel überprüft. Gleiche Mengen an Gesamt-RNA wurden für die nachfolgende Reverse-Transkription eingesetzt. Nach Umschreiben der RNA in cDNA erfolgte eine Amplifikation von Haushaltsgenen (β -Aktin und β -Globin) und eine Äquilibrierung der unterschiedlichen cDNAs auf eine äquivalente Amplifikation der Haushaltsgene. Mit Hilfe von zytokinspezifischen Primerkombinationen erfolgte die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für die Zytokine IL1, IL2, IL3, IL4, IL6, IL7, IL9, IL10, virales IL10 (vIL10), GMCSF und Interferon- γ sowie vier verschiedene Rezeptoren-IL6R, IL7R, IL9R, c-kit (stem-cell factor Rezeptor).

Morphologische Untersuchungen

Die lymphoblastoide Zelllinie FFH 72 wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Kultur morphologisch untersucht. Dies erfolgte lichtmikroskopisch nach Anfärbung der Zellen nach Pappen-

heim. Zusätzlich wurden die Zellen stimuliert mit CD30 Ligand oder einem monoklonalem Antikörper (anti-CD30), der intrinsische Liganden-Aktivität aufweist.

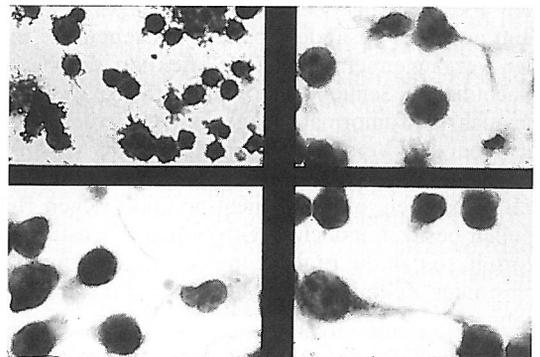
Chromosomale Untersuchungen

Von den Zelllinien wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten ein Karyogramm angefertigt, um chromosomale Aberrationen zu entdecken. Die cytogenetische Analyse erfolgte mittels G-Banding und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit Chromosomen-Painting-Proben, Zentromerproben, YACs und Cosmiden.

Ergebnisse und Diskussion

Morphologische Untersuchungen

Nach Etablierung einer lymphoblastoiden Zelllinie kann in der Regel CD30 auf der überwiegenden Mehrzahl der Zellen nachgewiesen werden. CD30 ist ein kürzlich kloniertes Molekül der Nerve-Growth-Factor Rezeptorfamilie (NGFR), welches konstant im Morbus Hodgkin und in großzelligen anaplastischen Lymphomen nachweisbar ist. Die Rolle des CD30 für die Pathogenese dieser Erkrankungen ist offen. Der Ligand (CD30L) ist ebenfalls kloniert. Eindeutige funktionelle Daten über die Rezeptor/Ligand Interaktion fehlen jedoch bisher. Die Stimulation von CD30 positiven Zellen mit dem CD30-Liganden oder einem intrinsisch wirkenden monoklonalen Antikörper führt allerdings zu einer bemerkenswerten Änderung der Morphologie der Zellen. Es werden Zellen beobachtet, die villöse zytoplasmatische Ausläufer produzieren, die an Dendriten (Neuriten) erinnern. Beispiele für die Änderung der Morphologie sind in Abbildung 3 zu erkennen. Auch ohne derar-

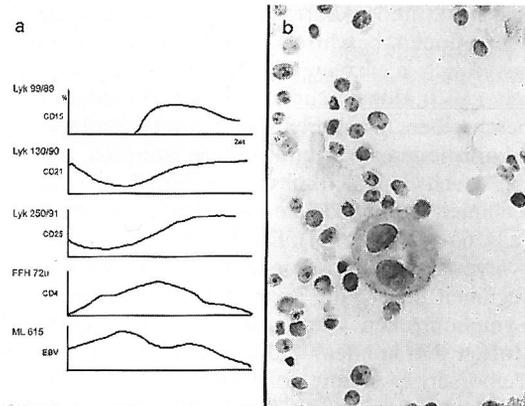


3. Stimulation einer lymphoblastoiden Zelllinie mit Anti-CD30: Vgl. hierzu Abb. 2. Die Zellen nehmen bizarre Formen an und weisen dendritische Ausläufer auf.

tige stimulative Effekte unterscheidet sich das konventionell morphologische Bild erheblich.

Phänotyp

Phänotypische Studien der lymphoblastoiden Zelllinien über einen zweijährigen Untersuchungszeitraum zeigten, daß manche Zelllinien erhebliche Unterschiede in ihrer Antigenexpression über den Zeitverlauf zeigten. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Abbildung 4a dargestellt. Die

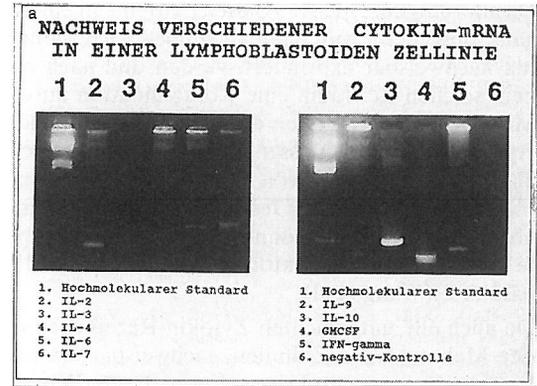


4. Antigenprofil verschiedener lymphoblastoider Zelllinien über den Zeitverlauf (a). Darstellung der CD15 Antigenexpression in einer Sternberg-Reed ähnlichen Zelle - EBV positive lymphoblastoide B-Zelllinie (b).

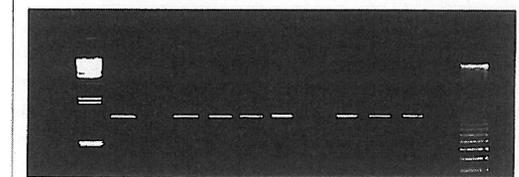
Expression des EBV-Rezeptors (CD21) und viruspezifischer Antigene (LMP, EBNA) war über den Zeitraum schwankend (siehe auch Cordier et al), wobei schließlich in einer Zelllinie ein fast vollständiger Verlust der Virusgenexpression nachweisbar war. Hingegen konnte gezeigt werden, daß Aktivierungsantigene (CD25 und CD30) über den Zeitraum stark ansteigen. Auch eine aberrante Expression von CD4 (wird normalerweise von T-Zellen und monocytären Zellen exprimiert) und CD15 (Abb. 4b) (wird physiologisch von monocytären Zellen und von Granulozyten exprimiert) wurde beobachtet. Auch im Morbus Hodgkin wird häufig eine Expression der Aktivierungsantigene CD15, CD25 und CD30 auf den Tumorzellen beobachtet, bei großzelligen anaplastischen Lymphomen eine Expression von CD25 und CD30. Schließlich wurde sowohl in lymphoblastoiden Zellen als auch im Hodgkin-/Sternberg-Reed Zellen eine erhöhte bcl-2 Expression nachgewiesen, was für die Immortalisation der Zellen/Tumorzellen bedeutsam sein könnte (Henderson et al, Gregory et al).

Zytokin-Expression

Lymphoblastoide Zelllinien zeigten bei einem frühen (kurz nach Etablierung) Screening eine besondere Expression von Zytokinen. Dabei ließ sich mRNA für IL2, IL3, IL4, IL6, IL7, IL9, IL10, vIL10, GMCSF und Interferon- γ nachweisen (Abb. 5a). Da eine geringe Zahl kontaminierender



5. RT-PCR für verschiedene Zytokine in einer lymphoblastoiden Zelllinie (a). RT-PCR für IL-7 an lymphoblastoiden-, Hodgkin- und LCAL-Zelllinien (b).



DNA-Marker I, Michel-3 months culture, Michel-1 week in culture, FFH72, L428, L540, HDLM2, KMH2, DEL, HAKI, SKA, Negative-control DNA Marker II

5. RT-PCR für verschiedene Zytokine in einer lymphoblastoiden Zelllinie (a). RT-PCR für IL-7 an lymphoblastoiden-, Hodgkin- und LCAL-Zelllinien (b).

Zelllinie	IL-1 β	IL-4	IL-6	IL-7	IL-9	IL-9R	IL-10	SCF	ckit
MH Cole	-	-	-	-	+	+	-	-	+
L540	-	-	-	+	+	+	-	-	+
L428	-	-	+	-	+	+	(+)	-	-
KMH2	-	-	+	-	-	(+)	-	-	++
HDLM2	-	+	+	+	+	-	-	-	++
LCAL Del	-	-	+	+	+	+	+	+	++
Haki	-	-	+	+	+	+	(+)	+	+
SKA	-	+	+	+	+	-	-	+	(+)
L82	-	(+)	-	+/-	(+)	+	+	-	-
LCL Michel	+	+	+	+	-	+	(+)	-	++
FFH72	+	+	+/-	-/+	-	+	+	-	++
ML615	-	-	+	+	-	+	+	+	-
Lyk 99/89	+	+	+	+	-	+	++	-	-
Lyk130/90	+	+	+	+	-	+	(+)	-	+
Lyk250/91	+	+	+	+	(+)	+	+	-	+

Tabelle: gekürzte Darstellung der RT-PCR Ergebnisse für verschiedene Zytokine an den untersuchten lymphoblastoiden-, Hodgkin- und LCAL-Zelllinien.

Zellen (T-Zellen, Monozyten) über einen längeren Zeitraum in der Kultur verbleibt, ist nicht ausgeschlossen, daß einzelne Zytokine von den kontaminierenden Zellen produziert werden. Eine Expression von IL2, IL9, Interferon- γ und GM-CSF wird normalerweise nur bei T-Zellen beobachtet. Ferner wurde eine Expression von IL7 (vgl. Abb. 5b) und SCF bisher nur von Stromazellen beschrieben. Da allerdings die meisten dieser Zytokine in einem ganz ähnlichen Profil dann auch noch nach Monaten nachweisbar exprimiert wurden und nach einem solchen Zeitraum eine Kontamination durch Monozyten und T-Zellen durch die Immunphänotypisierung ausgeschlossen wurde, muß eine hoch aberrante Expression von Zytokinen in den lymphoblastoiden B-Zellen festgestellt werden. Diese aberrante Expression könnte durch EBV-assoziierte transaktivierende Faktoren induziert sein (LMP, EBNA-2) (Wang et al).

Da auch alle untersuchten Zytokin-Rezeptoren in der Mehrzahl der Zelllinien nachweisbar waren, kann auf einen autokrinen Loop dieser Wachstumsfaktoren geschlossen werden, d.h. daß die Zytokin-produzierenden Zellen so ihr eigenes Wachstum unterhalten.

Für IL1 und CD23 (lösliches CD23 – proteolytisches Spaltprodukt mit B-Zell – Wachstumsfaktoreigenschaften), für IL5 und IL6 konnten solche autokrinen Regulationsmechanismen zumindest partiell bestätigt werden (Bertoglio et al, Baumann et al, Tosato et al). Auch für IL10 konnte eine Proliferationsinduktion nachgewiesen werden (Burdin et al); gleiches gilt für das virale IL10 (Miyazaki et al), welches neben seiner wachstumsstimulierenden Eigenschaft auf die B-Zellen eine immunsupprimierende Aktivität für zytotoxische T-Zellen entfaltet. Für das Zytokin IL7 wurde gezeigt, daß es einen essentiellen Faktor in der B-Zellentwicklung (speziell frühe B-Zellen) darstellt. Die übrigen Zytokine, u.a. IL2, IL4, IL9, können sowohl die Proliferation als auch Differenzierung von Lymphozyten induzieren. Da gleichzeitig multiple Zytokine und Zytokinrezeptoren exprimiert werden, gelingt eine Darstellung eines autokrinen Loops durch die Inhibition des entsprechenden Faktors oder seines Rezeptors in der Regel nur partiell oder nicht.

Interessanterweise werden eine ganze Reihe von Zytokinen und Zytokinrezeptoren auch in Hodgkin- und in großzelligen anaplastischen Lymphomzelllinien nachgewiesen. Hier sind sowohl Unterschiede als auch Parallelen festzustellen (vgl. Tabelle). Während IL1 nur in lymphoblastoiden Zelllinien exprimiert wird, finden sich die Mehrzahl der untersuchten Zytokine in den drei untersuch-

ten Zellsystemen. IL9 hingegen wird in lymphoblastoiden Linien inkonstant nachgewiesen. Über eine Hemmung der EBNA-2- und LMP-Expression könnte die Bedeutung dieser viralen Faktoren auf die zelluläre Transaktivierung (z.B. Zytokininduktion) untersucht werden.

Chromosomale Aberrationen

In malignen Lymphomen (großzelliges anaplastisches Lymphom, T-Zell Lymphome, Morbus Hodgkin) werden häufig zahlreiche numerische und strukturelle Aberrationen, auch als Einzelzellaberrationen, beschrieben (Fonatsch et al). Somit lassen sich in einzelnen Lymphomen charakteristische, auch klonale chromosomale Veränderungen beschreiben, in anderen sind dies nicht redundante Aberrationen. Wir und andere konnten zeigen, daß nach Langzeitkultur die lymphoblastoiden Zelllinien chromosomale Aberrationen entwickeln (z.B. 6q-) (Steel et al). Die Untersuchung des Karyotyps zeigt Aberrationen, die in Chromosomenregionen liegen, die auch in Leukämie und/oder Lymphomzellen von Strukturveränderungen betroffen sein können, und in denen Onkogene und Tumorsuppressorgene lokalisiert sind. Es konnte gezeigt werden, daß LCL mit chromosomalen Aberrationen tumorigen im Nacktmaussystem werden (Fabarius, Morten et al). In vitro können chromosomale Aberrationen nur dann stabilisiert werden, wenn die Aberration einen entscheidenden Wachstumsvorteil für die Zellen erbringt.

Gleiches dürfte auch für Mutanten gelten, die aberrant zum Beispiel CD4, CD15, CD25 exprimieren und eine reduzierte oder fehlende Expression von EBV-Genen (Verlust, Mutationen) aufweisen. Letztgenannte Veränderungen, die zweifellos vorkommen, können in vitro durch ein Überwachsen dieser „mutanten“ Zellpopulation mit „nicht-veränderten“ lymphoblastoiden Zellen in der Regel nicht stabilisiert werden (und auch nur schwer detektiert werden), da dies wahrscheinlich mit einem (vorübergehend?) verminderten Wachstum einhergeht. In vivo hingegen könnte die Situation völlig unterschiedlich sein, da die weniger immunogenen Zellen (EBV-down-Regulation) einen entscheidenden Überlebens(nicht Wachstums)-Vorteil erfahren könnten. Auf diese Weise können Mutationen im EBV-Genom oder der Verlust des Epstein-Barr-Virus und die zusätzliche Gewinnung von chromosomalen Aberrationen zu einer Stabilisierung eines Klones führen, der im weiteren Zeitverlauf unter Gewinnung weiterer Aberrationen tumorigen wird (Mehrschrittmodell der Tumorigenese). Dieser theoretische Ansatz könnte für maligne Lymphome, wie Morbus Hodgkin, entschei-

dend sein und das paradox erscheinende Nebeneinander von EBV-positiven und negativen Lymphomen einerseits, und die lange Latenz zwischen Infektion und Ausbruch der Erkrankung (Monate bis Jahre, Jahrzehnte) erklären.

Literatur

1. Baumann-MA; Paul-CC: Interleukin-5 is an autocrine growth factor for Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes. *Blood*. 1992; 79: 1763-7.
2. Bertoglio-J; Wollman-E; Shaw-A; Rimsky-L; Fradelizi-D: Identification of interleukin 1 alpha produced by the 3B6 human EBV-B cell line. *Lymphokine-Res*. 1989; 8: 19-24.
3. Boiocchi-M; Dolcetti-R; De-Re-V; Gloghini-A; Carbone-A: Demonstration of a unique Epstein-Barr virus-positive cellular clone in metachronous multiple localizations of Hodgkin's disease. *Am-J-Pathol*. 1993; 142: 33-8.
4. Brousset-P; Knecht-H; Rubin-B; Drouet-E; Chittal-S; Meggetto-F; Saati-TA; Bachmann-E; Denoyel-G; Sergeant-A; et-al: Demonstration of Epstein-Barr virus replication in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Blood*. 1993; 82: 872-6.
5. Burdin-N; Peronne-C; Banchereau-J; Rousset-F: Epstein-Barr virus transformation induces B lymphocytes to produce human interleukin 10. *J-Exp-Med*. 1993; 177: 295-304.
6. Cordier-M; Calender-A; Billaud-M; Zimmer-U; Rousselet-G; Pavlish-O; Banchereau-J; Tursz-T; Bornkamm-G; Lenoir-GM: Stable transfection of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 in lymphoma cells containing the EBV P3HR1 genome induces expression of B-cell activation molecules CD21 and CD23. *J-Virol*. 1990; 64: 1002-13.
7. Delecluse-HJ, Bartnikze-S, Hammerschmidt-W, Bullerdiek-J, Bornkamm-GW: Episomal and integrated copies of Epstein-Barr virus coexist in Burkitt lymphoma cell lines. *J Virol*. 1993; 67: 1292-1299 .
8. Fabarius-A: Experimentelles System zur Untersuchung sekundärer Neoplasien nach Morbus Hodgkin. Dissertation Medizinische Universität zu Lübeck 1994
9. Fonatsch-C, Gradl-G, Rademacher-J: Genetics in Hodgkin's lymphoma. in: *Recent Results in Cancer Research, New Aspects in the Diagnosis and Treatment of Hodgkin's Disease*, eds.: V. Diehl, M. Pfreundschuh, M. Loeffler, Springer Verlag 1989
10. Gregory-CD; Dive-C; Henderson-S; Smith-CA; Williams-GT; Gordon-J; Rickinson-AB: Activation of Epstein-Barr virus latent genes protects human B cells from death by apoptosis. *Nature*. 1991; 349: 612-4.
11. Henderson-S; Rowe-M; Gregory-C; Croom-Carter-D; Wang-F; Longnecker-R; Kieff-E; Rickinson-A: Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* 1991; 65: 1107-1115.
12. Henderson-A, Ripley-S, Heller-M, Kieff-E: Chromosome site for Epstein-Barr virus DNA in Burkitt tumor cell line and in lymphocytes growth-transformed in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 80: 1987-1991.
13. Hu-LF; Minarovits-J; Cao-SL; Contreras-Salazar-B; Rymo-L; Falk-K; Klein-G; Ernberg-I: Variable expression of latent membrane protein in nasopharyngeal carcinoma can be related to methylation status of the Epstein-Barr virus BNLF-1 5'-flanking region. *J-Virol*. 1991b; 65: 1558-67
14. Hurley-EA; Agger-S; McNeil-JA; Lawrence-JB; Calendar-A; Lenoir-G; Thorley-Lawson-DA: When Epstein-Barr virus persistently infects B-cell lines, it frequently integrates. *J-Virol*. 1991; 65: 1245-54
15. Klein-G: Epstein-Barr virus strategy in normal and neoplastic B cells. *Cell*. 1994; 77: 791-3
16. Lestou-VS, De Braekeleer-M, Strehl-S, Ott-G, Gadner-H, Ambros-PE: Non-random integration of Epstein-Barr Virus in Lymphoblastoid cell lines. *Genes Chrom Cancer*. 1993; 8: 38-48
17. Miyazaki-I; Cheung-RK; Dosch-HM: Viral interleukin 10 is critical for the induction of B cell growth transformation by Epstein-Barr virus. *J-Exp-Med*. 1993; 178: 439-47
18. Morten-JEN, Hay-JH, Steel-CM, Foster-ME, De Angelis-CL and Busuttill-A: Tumorigenicity of human lymphoblastoid cell lines, acquired during in vitro culture and associated with chromosome gains. *Int J Cancer* 1984; 34: 463-470
19. Rochford-R; Hobbs-MV; Garnier-JL; Cooper-NR; Cannon-MJ: Plasmacytoid differentiation of Epstein-Barr virus-transformed B cells in vivo is associated with reduced expression of viral latent genes. *Proc-Natl-Acad-Sci-USA*. 1993; 90: 352-6
20. Steel-CM, Shade-M, Woodward-MA. Chromosome aberrations aquired in vitro by human B-cell lines. I. Gains and losses of material. *JNCI* 1980; 65: 95-99.
21. Tosato-G; Tanner-J; Jones-KD; Revel-M; Pike-SE: Identification of interleukin-6 as an autocrine growth factor for Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *J-Virol*. 1990; 64: 3033-41
22. Wang-F; Gregory-C; Sample-C; Rowe-M; Liebowitz-D; Murray-R; Rickinson-A; Kieff-E: Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J-Virol*. 1990; 64: 2309-18

Wirkung des Schlags auf die Verteilung mononukleärer Zellpopulationen im Blut und auf die Zytokinproduktion beim Menschen

K. Hansen¹, T. Lange², T. Wagner¹, J. Born², H.L. Fehm^{1,2}

Zusammenfassung

Die Frage, ob und wie Schlaf die Immunfunktion beim Menschen beeinflusst, ist bisher unzureichend untersucht. Frühere Humanstudien deuteten an, daß die Produktion von Zytokinen durch verschiedene Subpopulationen mononukleärer Zellen ein empfindliches Maß für Wirkungen von Schlaf und Schlafentzug sind. Um Wirkungen des Schlags auf die Zytokinproduktion und Immunzellzahlen zu differenzieren, wurden in der vorliegenden Studie die Produktion von Interleukin-1 β und -2 (IL-1 β , IL-2) sowie gleichzeitig die Zellzahlen verschiedener mononukleärer Subpopulationen im Blut (Monozyten, B-Zellen, T-Zellen, T4, T8, aktivierte T-Zellen, NK-Zellen) während Schlaf und Schlafentzug untersucht. Außerdem sollten Effekte des Schlags von denen circadianer Rhythmik differenziert werden.

Zehn gesunde männliche Probanden wurden in jeweils zwei 51 Stunden dauernden Sitzungen untersucht, beginnend um 8.00 h morgens. Eine der Sitzungen bestand aus zwei regulären Wach-Schlaf-Zyklen (WS-WS-Bedingung). In der anderen Sitzung wurde in der ersten Nacht nicht geschlafen, in der zweiten Nacht folgte der Erholungsschlaf (WW-WS-Bedingung). Blut wurde alle 3 Stunden abgenommen. Die Produktion von IL-1 β und IL-2 wurde nach Mitogenstimulation (Lipopolysaccharid E.coli bzw. Phytohemagglutinin) im Vollblutassay gemessen. Die Bestimmung mononukleärer Subpopulationen erfolgte mittels Durchflußzytometrie.

Im Vergleich zur durchwachten Nacht verminderte der reguläre Nachtschlaf die Zahl zirkulierender Monozyten und Lymphozyten (einschließlich aller Subpopulationen; $p < 0.05$). Schlaf reduzierte außerdem die Produktion von IL-1 β ($p < 0.05$), stimulierte aber die Produktion von IL-2 ($p < 0.05$). Bei kontinuierlicher Wachheit zeigten die Zellzahlen aller mononukleären Subpopulationen im Blut und die IL-2-Produktion signifikante circadiane Rhythmen ($p < 0.05$). Regulärer Nachtschlaf erhöhte die Amplitude der circadianen Rhythmik der

Monozytenzahl und der IL-2-Produktion und bewirkte für die T-Zellzahl eine Phasenvorverschiebung der Rhythmik.

Der dämpfende Einfluß des Schlags auf die Produktion von IL-1 β könnte durch eine parallele Erniedrigung der Zahl im Blut zirkulierender Monozyten vermittelt sein. Dagegen läßt sich die Stimulation der Produktion von IL-2 während des Schlags nicht mit regulativen Einflüssen des Schlags auf die T-Zellmigration erklären. Wirkungen des Schlags auf die T-Zellzahl und die IL-2-Produktion könnten über einen Einfluß des Schlags auf übergeordnete circadiane Schrittmacher vermittelt werden.

Summary

Whether and how sleep influences human immune function is presently unclear. In foregoing human studies the production of cytokines by certain mononuclear cell subpopulations turned out to be sensitive to effects of sleep and sleep deprivation. To separate effects of sleep on cytokine production and mononuclear cell subsets, the present experiments assessed changes in the production of interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-2, and concurrent changes in blood mononuclear cell counts (monocytes, B cells, T cells, T4, T8, activated T cells, NK cells) during sleep and sleep deprivation. Also, effects of sleep should be distinguished from those of circadian rhythm.

Each of 10 healthy men was examined during two 51-h sessions, starting at 8.00 h. One of these sessions included two normal consecutive wake-sleep cycles (condition WS-WS). During the other session, sleep was deprived on the first night and recovered on the second night (condition WW-WS). Blood was sampled every 3 hours. Production of IL-1 β and IL-2 was determined in whole blood samples, following stimulation with lipopolysaccharid and phytohemagglutinin, respectively. Mononuclear cell subsets were enumerated by flow cytometry.

Compared with nocturnal wakefulness, nocturnal sleep reduced the numbers of monocytes, lymphocytes and lymphocyte subsets ($p < 0.05$). Sleep also reduced production of IL-1 β ($p < 0.05$), but increased production of IL-2 ($p < 0.05$). During continuous wakefulness, circadian rhythms were detectable for all mononuclear cell subset counts and for the production of IL-2 ($p < 0.05$). Nocturnal sleep enhanced the amplitude of the circadian rhythm of monocyte counts and production of IL-2. Moreover, during nocturnal sleep maximum T cell counts were reached earlier than during wakefulness ($p < 0.05$).

The diminishing effect of sleep on the production of IL-1 β could be due to the concurrent reduction of blood monocytes. In contrast, the enhancing effect of sleep on the production of IL-2 cannot be reduced to a regulatory influence of sleep on migration of T cells. Effects of sleep on T cell counts and production of IL-2 are both likely to be mediated via an influence on circadian oscillators.

Einleitung

Schlaf wird allgemein als restaurativer Prozeß angesehen, der auch Immunfunktionen unterstützt. Entsprechend könnten durch Schlafentzug induzierte zentralnervöse Veränderungen einen schwächenden Einfluß auf Immunfunktionen haben. Derartige Einflüsse könnten bei einer ganzen Reihe von Erkrankungen eine Rolle spielen, die mit Schlafstörungen vergesellschaftet sind, wie beispielsweise Rheumatoide Arthritis, Fibromyalgie-Syndrom und Allergien [17]. So gesehen wäre auch nicht auszuschließen, daß Schwächung der Immunfunktion im Alter eine Folge der altersbedingten chronischen Schlafstörungen sind.

Die Wirkungen des Schlafs auf Immunfunktionen wurden jedoch beim Menschen bisher nur in wenigen Studien untersucht [Übersicht: 4, 6]. Zwar wurde tierexperimentell ein erhöhtes Auftreten von Infektionen und Bakteriämien nach Schlafentzug gezeigt [22, 5], andere Autoren konnten jedoch keinen kausalen Zusammenhang zwischen Schlafentzug und Immunfunktion herstellen [1]. Solche Diskrepanzen tierexperimenteller Ergebnisse könnten teilweise in einer Artspezifität der Interaktionen zwischen Schlaf und Immunfunktion begründet sein. Schon deshalb ist ihre Übertragbarkeit auf den Menschen fraglich.

Die wenigen Humanstudien zu dieser Fragestellung zeigen jedoch auch keine konsistenten Ergebnisse. Zum Beispiel fanden Palmblad et al. [20] keine Veränderung der Zahl im Blut zirkulierender Leukozyten, Monozyten und B-Lymphozyten

während und nach 77 stündigem Schlafentzug. Demgegenüber stiegen in einer jüngeren Studie die Zahl der Granulozyten und Monozyten im Verlauf einer 64 Stunden dauernden Schlafentzugsphase deutlich an [3]. Lymphozytenfunktionstests, wie beispielsweise die in-vitro stimulierte Lymphozytenproliferation durch Phytohemagglutinin (PHA) oder Pokeweed Mitogen (PWM), erbrachten ebenfalls sehr divergente Resultate hinsichtlich der Wirkungen von Schlaf und Schlafentzug [19, 14, 15, 3].

Konsistentere Ergebnisse lieferten dagegen Studien, die Auswirkungen des Schlafs auf die Produktion verschiedener Zytokine evaluierten. Schlaf verminderte im Vergleich zu Schlafentzug nicht nur die Lipopolysaccharid- (LPS-) stimulierte Produktion von IL-1 β [24], sondern auch die direkt im Plasma gemessene IL-1-Aktivität [15, 4]. Ebenso verminderte Schlaf die Produktion von Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), der wie IL-1 β im Blut hauptsächlich durch Monozyten freigesetzt wird [24, 23]. Während die Produktion dieser Monokine durch Schlaf gehemmt wird, scheint die Produktion von IL-2, einem vorwiegend durch T-Zellen freigesetzten Lymphokin, durch Schlaf stimuliert zu werden. Partieller Schlafentzug rief in drei Humanstudien konsistent signifikante Reduktionen der IL-2-Produktion hervor [13, 9, 24]. Schlafentzug erhöhte aber die Produktion von Interferon-gamma (IFN-gamma), das ebenfalls vor allem durch T-Zellen freigesetzt wird [20, 23, 3].

Insgesamt zeigten diese Studien selektive und spezifische Einflüsse des Schlafs auf die Produktion verschiedener Zytokine. Unklar blieb jedoch, ob Schlaf die Zytokinproduktion per se veränderte oder ob die Effekte auf Veränderungen in der Zahl bestimmter Subpopulationen mononukleärer Zellen beruhten, die für die Produktion der entsprechenden Zytokine verantwortlich sind. In der Regel wurde nämlich bei der Bestimmung der Zytokinproduktion in den vorausgegangenen Studien nur die Gesamtzahl der Mitogen-stimulierten mononukleären Zellen für die verschiedenen experimentellen Bedingungen (Schlafentzug versus Schlaf) konstant gehalten bzw. kontrolliert. Die Möglichkeit, daß Variationen hinsichtlich der Zellzahl einzelner Subpopulationen auftreten könnten, wurde vernachlässigt. In der vorliegenden Studie sollten daher Effekte des Schlafs auf die Zytokinproduktion und auf die Migration von Subpopulationen mononukleärer Zellen differenziert werden. Dazu wurden Wirkungen von Schlaf und Schlafentzug auf die Produktion eines Monokins (IL-1 β) und eines Lymphokins (IL-2) analysiert und zu Veränderungen der Zahl zirkulierender

Monozyten und Lymphozytensubpopulationen in Beziehung gesetzt.

Ein weiterer Grund, der die Interpretation bisheriger immunologischer Studien zur Wirkung von Schlaf und Schlafentzug einschränkt, ist die Tatsache, daß in den meisten dieser Studien nur ein oder zweimal am Tag Blut abgenommen wurde, wobei diese Blutabnahmen in den verschiedenen Studien zu unterschiedlichen Tageszeitpunkten stattfanden. Nachweislich zeigt aber die Zellzahl vieler mononukleären Subpopulationen im Blut systematische tageszeitliche Schwankungen [7]. Auch für die Produktion verschiedener Zytokine, wie z.B. IL-1, sind circadiane Rhythmen nachgewiesen worden [25, 26]. Hinter den in bisherigen Studien beobachteten Effekten des Schlafs auf die Zytokinproduktion könnte sich daher eine modulierende Wirkung des Schlafs auf übergeordnete Schrittmacher circadianer Rhythmik verbergen.

In der vorliegenden Studie sollten daher Effekte des Schlafs und der circadianen Rhythmik auf die Zellzahl mononukleärer Subpopulationen und die Zytokinproduktion voneinander abgegrenzt werden. Dazu wurden Wirkungen von Schlaf und Schlafentzug innerhalb von zwei längeren experimentellen Sitzungen untersucht, die es ermöglichten, gleichzeitig die circadiane Rhythmik der abhängigen Variablen bei konstanter Wachheit des Probanden zu evaluieren. Eine der Sitzungen bestand aus zwei regulären Wach-Schlaf-Zyklen, in der anderen Sitzung wurde in der ersten Nacht der Schlaf entzogen und der Proband durfte erst in der zweiten Nacht nach einer insgesamt 40-stündigen Wachphase schlafen.

Material und Methoden

Versuchspersonen

Zehn geistig und körperlich gesunde junge Männer im Alter zwischen 20 und 30 Jahren (mittleres Alter 25,0 Jahre) nahmen an der Studie teil. Alle Probanden waren Nichtraucher, nahmen keine Medikamente ein und hatten keine Schlafstörungen. Mindestens vier Wochen vor Versuchsbeginn mußten die Versuchspersonen einen regelmäßigen, synchronisierten Schlaf-Wach-Rhythmus einhalten sowie zwei Tage vor Versuchsbeginn zwischen 23.00 h und 23.30 h einschlafen und um 7.00 h aufstehen. Alle Probanden verbrachten eine Eingewöhnungsnacht im Schlaflabor, in der, wie in den Versuchsnächten, eine Braunüle gelegt und Elektroden für polysomnographische Ableitungen geklebt wurden. Die Probanden wurden vor Versuchsbeginn über Sinn und Ziel der Studie aufgeklärt und legten ihr Einverständnis schriftlich nie-

der. Die Studie war von der örtlichen Ethik-Kommission genehmigt.

Versuchsablauf

Jeder Proband nahm an zwei Sitzungen von 51 Stunden Dauer teil, welche jeweils um 8.00 h begannen und zwei Tage später um 11.00 h endeten. Zwischen beiden Sitzungen eines Probanden lag ein Zeitraum von mindestens 7 Tagen. Die Reihenfolge der Versuchsbedingungen war über die Versuchspersonen balanciert. Eine der Sitzungen bestand aus zwei aufeinander folgenden normalen Wach-Schlaf-Zyklen (Bedingung WS-WS). Ab 23.00 h schliefen die Probanden. In der ersten Nacht standen sie um 7.00 h morgens auf, in der zweiten Nacht durften sie ausschlafen. In der anderen Sitzung blieben die Probanden am ersten Tag vollständig, d.h. auch nachts wach, am zweiten Tag durften sie ab 23.00 h bis maximal 11.00 h morgens schlafen (Bedingung WW-WS).

Der Schlaf wurde mittels Standardsomnopolygraphie ausgewertet [21]. Während der nächtlichen Wachbedingung saßen die Versuchspersonen im Bett, konnten lesen, Fernsehen schauen oder sich unterhalten. In beiden Versuchsbedingungen wurden standardisierte Mahlzeiten um 7.30 h, 13.00 h, 16.00 h und 19.00 h gereicht. Coffeinhaltige Getränke und Alkohol waren nicht erlaubt. Durch die Versuchsleiter wurde gewährleistet, daß die Probanden während der Wachbedingung nicht einschliefen, weiterhin wurden ihre Tagesaktivitäten protokolliert.

Zu Versuchsbeginn (8.00 h) wurde zunächst ein Venenverweilkatheter gelegt, aus dem regelmäßige Blutentnahmen in dreistündlichen Abständen erfolgten. Um den Schlaf nicht zu stören, wurden die Blutentnahmen nachts mittels Schlauchsystem von einem benachbarten Raum aus durchgeführt. Während der Nacht wurden 200 ml Kochsalzlösung infundiert, um einer Thrombosierung des Blutentnahmesystems vorzubeugen. Dieselbe Menge Kochsalzlösung erhielten die Probanden auch während der Wachbedingung.

Abhängige Variablen

Differentialblutbild und Lymphozytentypisierung. Die Bestimmung des Differentialblutbildes erfolgte automatisiert aus EDTA-Blut spätestens 9 Stunden nach Blutentnahme (Technicon H1, Technicon, Basingstoke, UK). Die Lymphozytensubpopulationen wurden im Durchflußzytometer (FacsScan, Becton Dickinson) standardgemäß bestimmt. Die Subtypisierung beinhaltete folgende Markierungen: T-Zellen (CD3⁺), B-Zellen (CD19⁺), NK-

Zellen (CD16⁺ und/oder CD56⁺), T-Helferzellen (CD4⁺), T-Suppressor-Zellen (CD8⁺) und aktivierte T-Zellen (CD3⁺/HLA-DR⁺).

Zytokine. Zur Stimulation der Freisetzung von IL-1 β und IL-2 wurde heparinisiertes Blut gleich nach Entnahme im Vollblutassay [11] weiterverarbeitet. Als Stimulantien dienten Lipopolysaccharid E.coli (LPS) für IL-1 β , sowie Phytohemagglutinin (PHA) für IL-2. Die Proben wurden für 48 h Stunden inkubiert. Die Zytokine wurden im Doppelansatz mittels ELISA-Assays bestimmt (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Die Sensitivität der Assays lag bei 0,3 pg/ml für IL-1 β und 2 pg/ml für IL-2. Der Intra- und Interassay-Variationskoeffizient war für beide Assays < 8%.

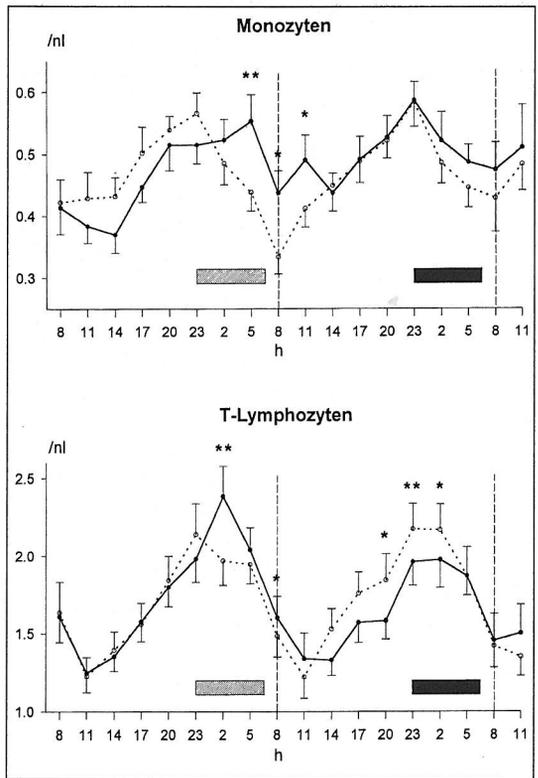
Statistik

Für die Analytik des Verlaufs der abhängigen Variablen während der beiden 54-stündigen Versuchsbedingungen wurden die Parameter zunächst auf individueller Basis z-transformiert, um die starken interindividuellen Streuungen der Ausgangswerte, vor allem für die Zytokinproduktion [10] zu reduzieren. Paarvergleiche wurden dann mittels Wilcoxon's t-Test für die einzelnen Meßzeitpunkte und für die Durchschnittswerte während der Tagesphasen (8, 11, 14, 17, 20, 23 h) und der Nachtphasen (2 und 5 h) durchgeführt.

Um Wirkungen des Schlafs im Vergleich zur Wachheit zu ermitteln, konzentrierten sich die Analysen auf den um 23.00 h beginnenden 24-Stunden-Zeitraum, in dem die Probanden unter der WW-WS-Bedingung vollständig wach waren, während sie unter der WS-WS-Bedingung nachts normal schliefen und tagsüber wach waren. Zusätzlich wurde untersucht, inwieweit die Effekte des Schlafs sich als Modulation einer circadianen Rhythmik in den abhängigen Variablen ausdrückte. Dazu wurde mittels der Cosinor-Methode [18] die Signifikanz circadianer Rhythmik während der 24-stündigen Wachphase überprüft. Bei der Cosinor-Methode wird dem zugrundeliegenden Kurvenverlauf eine Sinusschwingung (mit einer Periodenlänge von 24 Stunden) angepaßt und die Amplitude (doppelte Differenz zwischen Maximum und Minimum), der Zeitpunkt des Maximums („Akrophase“) sowie das mittlere Niveau über 24 Stunden („Mesor“) geschätzt. Erwies sich die circadiane Rhythmik für einen Parameter als signifikant, wurde für diesen Parameter Amplitude, Akrophase und Mesor der circadianen Rhythmik (für den um 23.00 h beginnenden 24-Stunden langen Zeitraum) zwischen beiden experimentellen Bedingungen verglichen. Ein $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

Ergebnisse

Mononukleäre Zellen. Abbildungen 1a und b zeigen die Verläufe der Zahl im Blut zirkulierender Monozyten und T-Lymphozyten während der beiden Versuchsbedingungen. Die Monozytenzahlen stiegen in beiden Bedingungen nachmittags ab 14.00 bis 23.00 h (bei Wachheit der Probanden) an. Während des Schlafs (Kontrollbedingung WS-WS) fielen sie dann bis zu den frühen Morgenstunden deutlich ab, um minimale Werte um 8.00 h zu erreichen. Dagegen setzte sich der Anstieg der Monozytenzahlen während der durchwachten Nacht (Bedingung WW-WS) bis 5.00 h fort. Der dann einsetzende Abfall war außerdem weniger ausge-



Abbildungen 1a und b: Verlauf der Mittelwerte \pm SEM der Monozytenzahlen (a) und T-Lymphozytenzahlen (b) bei 10 jungen gesunden Probanden während der WS-WS-Bedingung (gestrichelte Linie; W = wach; S = Schlaf) und während der WW-WS-Bedingung (durchgezogene Linie). Die Zeitspanne der Bettruhe ist durch einen horizontalen Balken dargestellt (schraffiert = Schlaf nur in der WS-WS-Bedingung, während die Probanden in der WW-WS-Bedingung in dieser Zeit wach bleiben; schwarz = in beiden Versuchsbedingungen schlafen die Probanden in dieser Zeit). * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$.

Variable /nl	Wach	Schlaf	Signifikanz p <
Monozyten	0.54 ± 0.034	0.46 ± 0.028	0.05
Lymphozyten (gesamt)	2.91 ± 0.169	2.54 ± 0.154	0.005
B-Zellen (CD19 ⁺)	0.44 ± 0.046	0.41 ± 0.064	0.05
T-Zellen (CD3 ⁺)	2.21 ± 0.162	1.96 ± 0.138	0.05
T-Helferzellen (CD4 ⁺)	1.41 ± 0.09	1.23 ± 0.076	0.05
T-Suppressor-Zellen (CD8 ⁺)	0.76 ± 0.08	0.68 ± 0.074	0.05
Aktivierte T-Zellen (CD3 ⁺ /HLA-DR ⁺)	0.11 ± 0.015	0.08 ± 0.01	0.005
NK-Zellen (CD16 ⁺ /CD56 ⁺)	0.21 ± 0.028	0.14 ± 0.013	0.05

Tabelle 1: Durchschnittswerte der ersten Nacht (2.00 h und 5.00 h) ± SEM verschiedener mononukleären Subpopulationen im Vergleich von Wach- zu Schlafbedingung.

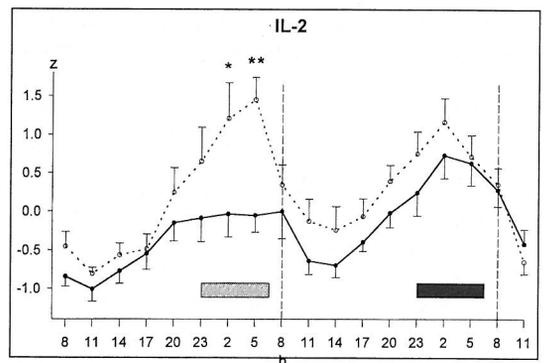
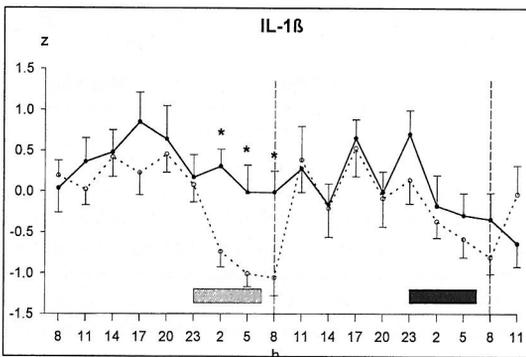
prägt, als bei nächtlichem Schlaf, so daß in dieser Bedingung zwischen 5.00 - 11.00 h die Zahl der Monozyten signifikant höher lag, als im selben Zeitraum bei regulärem Nachtschlaf.

Die T-Lymphozytenzahlen zeigten einen ähnlichen Verlauf. Während des Schlafs (WS-WS Bedingung) fielen die Zahlen nach 23.00 h deutlich ab und erreichten vormittags gegen 11.00 h ihren Tiefpunkt. Dagegen stiegen die T-Zellzahlen während der durchwachten Nacht (WW-WS Bedingung) bis 2.00 h weiter an, so daß die durchschnittlichen T-Zellzahlen in der Wach-Nacht signifikant höher lagen, als während des regulären Nachtschlafs (Tabelle 1). Am darauffolgenden Tag lagen die T-Zellzahlen nach Schlafentzug aber generell niedriger, als bei regulärem Schlaf-Wach-Rhythmus (Abbildung 1). Während der durchwachten Nacht waren auch die Zahlen zirkulierender B-Lymphozyten, T-Helfer- und Suppressorzellen, aktivierter T-Zellen

und NK-Zellen höher, als während des regulären Nachtschlafs (Tabelle 1).

Zytokine. Abbildungen 2a und b stellen die Verläufe der Mitogen-stimulierten Freisetzung von IL-1β und IL-2 dar. Die Produktion von IL-1β fiel in der Kontrollbedingung (WS-WS) während des regulären Nachtschlafs zwischen 23.00 h und 8.00 h deutlich ab. Schlafentzug (WW-WS) unterdrückte diesen Abfall fast vollständig; die IL-1β Produktion lag hier zwischen 2.00 und 8.00 h signifikant höher, als bei regulärem Nachtschlaf.

Die IL-2-Produktion war tagsüber zwischen 8.00 und 20.00 h (bei Wachheit der Probanden) niedrig und stieg insbesondere während des regulären Nachtschlafs (WS-WS) stark an. Nächtlicher Schlafentzug (WW-WS) bremste diesen Anstieg, so daß hier die um 2.00 h und 5.00 h gemessene IL-2-Produktion signifikant niedriger lag, als während des regulären Schlafs.



Abbildungen 2a und b: Verlauf der LPS-stimulierten IL-1β-Freisetzung (a) und der PHA-stimulierten IL-2-Freisetzung (b) (z-transformierte Werte ± SEM) bei 10 jungen gesunden Probanden während der WS-WS-Bedingung (gestrichelte Linie; W = wach, S = Schlaf) und während der WW-WS-Bedingung (durchgezogene Linie). Die Zeitspanne der Nacht ist durch einen horizontalen Balken dargestellt (schraffiert = Schlaf nur in der WS-WS-Bedingung, während die Probanden in der WW-WS-Bedingung in dieser Zeit wach bleiben; schwarz = in beiden Versuchsbedingungen schlafen die Probanden in dieser Zeit). * = p < 0.05; ** = p < 0.01.

Circadiane Rhythmik. Für alle mononukleären Zellklassen waren während 24-stündiger konstanter Wachheit systematische circadiane Rhythmen ihrer Zellzahlen erkennbar ($p < 0.01$). Mit Ausnahme der NK-Zellen, deren Zahl tags höher als nachts lag, stiegen die Zahlen zirkulierender Zellen aller Subpopulationen – mit geringen zeitlichen Abweichungen – während der Nachmittagsstunden bis in die frühen Morgenstunden an, um zwischen 2.00 h und 5.00 h nachts ihr Maximum zu erreichen. Tiefstwerte wurden in den Vormittagsstunden gemessen.

Bei den Zytokinen war die IL-2-Produktion einer circadianen Rhythmik unterworfen, die auch bei 24-stündiger Wachheit (d.h. unabhängig von Schlaf und Wachheit) statistisch bestätigt wurden. Nachts war die IL-2-Produktion höher als tags. Tageschwankungen der IL-1 β -Produktion erreichten dagegen bei kontinuierlicher Wachheit keine Signifikanz.

Wirkungen des Schlafs auf die circadiane Rhythmik. Schlaf veränderte vor allem die Phase und Amplitude der circadianen Rhythmen. Der Mesor (das mittlere Niveau über 24 Stunden) wurde nicht beeinflusst. Im Vergleich zur Wachheit erhöhte der reguläre Nachtschlaf die Amplitude der Tagesrhythmik der Monozytenzahl, erniedrigte aber gleichzeitig die Amplitude der T-Zellen und der T4-Zellen. Bei regulärem Nachtschlaf erreichten außerdem die T-, T4- und T8-Zellenzahlen ihr Tagesmaximum signifikant früher als bei kontinuierlicher Wachheit. Dagegen wurden die Maxima aktivierter T-Zellen und NK-Zellen im regulären Schlaf-Wach-Zyklus später erreicht ($p < 0.05$). Die Rhythmik der B-Zellen veränderte sich durch den Schlaf nicht. Nachtschlaf verstärkte zudem die Amplitude des circadianen Rhythmus der IL-2-Produktion ($p < 0.05$), ließ aber dessen Phase unbeeinflusst.

Diskussion

Die Ergebnisse der Studie zeigen deutliche Unterschiede der stimulierten Zytokinproduktion zwischen Wach- und Schlafzustand. Die IL-1 β -Produktion nahm während des Nachtschlafs deutlich ab, was mit Ergebnissen von Zabel et al. [25] übereinstimmt. Nächtlicher Schlafentzug führt im Vergleich zum Schlaf zu einer deutlichen Verstärkung der IL-1 β Produktion. Diese Befunde bestätigen frühere Ergebnisse, die zeigen, daß die IL-1 β -Produktion bereits durch partiellen Entzug des Nachtschlafs gesteigert wird [24]. Es wurde außerdem unter Schlafentzugsbedingungen eine Erhöhung der IL-1-Aktivität im Plasma beobachtet [15, 4].

Die IL-2-Produktion war in der vorliegenden Studie während des Nachtschlafs höher als bei nächtlicher Wachheit. Dieser stimulierende Effekt des Schlafs bestätigt frühere Befunde erniedrigter IL-2-Produktion bei partiellem Schlafentzug [9, 13, 24]. Die endogenen IL-2-Plasmaspiegel waren dagegen während Schlafdeprivation eher erhöht [15] – ein Hinweis, daß endogene IL-2-Plasmaspiegel und die Mitogen-stimulierte IL-2-Produktion durch unterschiedliche Mechanismen reguliert werden könnten.

Die Studie sollte Hinweise bringen, ob Wirkungen des Schlafs auf die Zytokinproduktion durch Veränderungen in den Zellzahlen der (hier im Vollblut) stimulierten Subpopulationen der mononukleären Zellen begründet sein könnten. In vergleichbaren früheren Studien waren zwar die Zahlen der Mitogen-stimulierten mononukleären Zellen insgesamt für die verschiedenen experimentellen Bedingungen (Schlaf versus Wachheit) konstant gehalten worden, die relativen Anteile von Subpopulationen wurden aber nicht evaluiert. Die Zahl der Monozyten lag bei nächtlicher Wachheit signifikant höher als während des nächtlichen Schlafs. Eine Erhöhung der Monozytenzahlen während Schlafentzug wurden auch von Dinges et al. [3] beobachtet. Da die Monozyten der wichtigste bisher bekannte Produzent von IL-1 β im peripheren Blut sind, könnte die bei nächtlicher Schlafdeprivation beobachtete Zunahme der IL-1 β -Produktion die Folge einer Monozytenzunahme im Blut sein [6].

Demgegenüber kann für die schlaf-assoziierte Zunahme der IL-2-Produktion kein vergleichbarer Zellmigrationseffekt verantwortlich gemacht werden. IL-2 wird vor allem durch T-Zellen produziert, deren Zahl während des Nachtschlafs signifikant höher als bei nächtlicher Wachheit lag. D.h. trotz niedrigerer T-Zellzahlen produzieren die mononukleären Zellen während des nächtlichen Schlafs verstärkt IL-2. Die Daten sprechen daher für einen von der Zellzahl unabhängigen Einfluß des Schlafs auf die IL-2-Produktion. Ähnliche, d.h. von der Lymphozytenmigration unabhängige Wirkungen von Schlaf, Wachheit und circadianer Rhythmik wurden in früheren Studien auch für andere Lymphozytenfunktionen (Proliferationsrate, Expression von CD3 etc.) nachgewiesen [8, 16, 2].

Die Studie sollte außerdem Hinweise erbringen, ob Schlaf direkt die Zytokinproduktion beeinflusst, oder ob seine Wirkungen durch eine Modulation der Aktivität übergeordneter circadianer Oszillatoren (Schrittmacher) vermittelt werden. Ein über circadiane Oszillatoren vermittelter Einfluß des Schlafs wäre dann zu vermuten, wenn Schlaf (ver-

sus Schlafentzug) hauptsächlich die Phase des circadianen Rhythmus (definiert über den Zeitpunkt des Maximums) eines Parameters, nicht aber den Mesor (das mittlere Niveau über 24 Stunden) beeinflusst.

Bei kontinuierlicher Wachheit zeigten die Zahlen aller Subpopulationen mononukleärer Zellen signifikante Tagesrhythmen [vgl. 7, 12]. Schlaf verstärkte die Amplitude der Tagesrhythmik der Monozyten, ohne die Phase dieser Rhythmik systematisch zu verändern. Ob die Amplitudenerhöhung unmittelbare Wirkung des Schlafs oder primär einen modulierenden Effekt auf circadiane Oszillatoren widerspiegelt, kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht entschieden werden. Aufklärung könnte in diesem Zusammenhang ein Vergleich der Wirkungen von Tag- und Nachtschlaf bringen, die im Falle einer unmittelbaren Wirkung des Schlafs auf die Monozytenzahl vergleichbar sein sollten.

Im Gegensatz zur Monozytenzahl verschob sich die Phase der circadianen Rhythmik der T-Zellzahl bei regulärem Nachtschlaf nach vorne. Schlaf übte vergleichbare Einflüsse auf die circadiane Rhythmik der T4- und T8-Subpopulationen, nicht aber auf die Rhythmik aktivierter T-Zellen, NK- und B-Zellen aus. Die Wirkungen des Schlafs auf T-Zellen und ihre hauptsächlichlichen Subpopulationen (T4, T8) müssen also als Sekundärwirkungen gewertet werden, denen ein primärer Einfluß auf die Phase eines circadianen Schrittmachers zugrundeliegt. Gleichzeitig geben diese Befunde erste Hinweise, daß Effekte des Schlafs auf die verschiedenen Lymphozyten-subpopulationen durch unterschiedliche Mechanismen vermittelt werden.

Die Variationen der T-Zellzahl können aber nicht stimulierende Effekte des Schlafs auf die IL-2-Produktion erklären, die sich gleichzeitig in einer signifikanten Amplitudenzunahme der circadianen Rhythmik der IL-2-Produktion ausdrücken. Aus früheren Studien liegen Hinweise vor, daß die schlaf-assoziierte Zunahme der IL-2-Produktion von circadianen Faktoren abhängt. Der Vergleich der Wirkungen von partiellem Schlafentzug in der ersten oder zweiten Nachthälfte zeigte, daß Schlaf nur in der zweiten Nachthälfte die IL-2-Produktion signifikant verstärkte [24].

Insgesamt zeigen die Ergebnisse eine abschwächende Wirkung von Schlaf auf die IL-1 β -Produktion. Diese Wirkung wird möglicherweise durch eine parallele Erniedrigung der Zahl im Blut zirkulierender Monozyten vermittelt. Dagegen fördert Schlaf die Produktion von IL-2, wobei dieser Effekt nicht von regulativen Einflüssen auf die T-

Zellmigration abhängt. Wirkungen des Schlafs auf die T-Zellmigration und auf die IL-2-Produktion könnten über einen Einfluß des Schlafs auf übergeordnete circadiane Schrittmacher vermittelt werden.

Danksagung: Wir danken Frau A. Otterbein, Frau S. Baxmann und Frau C. Zinke für technische Assistenz.

Literatur

1. Benca, R.M., Kushida, C.A., Everson, C.A., Bergmann, B.M., Rechtschaffen, A.: Sleep deprivation in the rat: VI immune function. *Sleep* 12: 47-52 (1989)
2. Canon, C., Lévi, F., Reinberg, A.: Rythme circadian des lymphocytes circulants de la densité des épitopes de surface (CD3 et CD4) chez l'homme adulte sain (in Vorbereitung)
3. Dinges, D.F., Douglas, S., Zaugg, L., Campbell, D., McMann, J., Whitehouse, W., Orne, E., Kapoor, S., Icaza, E., Orne, M.: Leukocytosis and natural killer cell function parallel neurobehavioral fatigue induced by 64 hours of sleep deprivation. *J. Clin. Invest.* 93: 1930-1939 (1994)
4. Dinges, D.F., Douglas, S.D., Hamarman, S., Zaugg, L., Kapoor, S.: Sleep deprivation and human immune function. *Advances in Neuroimmunology*. Im Druck (1995)
5. Everson, C.A.: Sustained sleep deprivation impairs host defense. *Am. J. Physiol.* 265: R1148-R1154 (1993)
6. Hansen, K., Fehm, H.L., Born, J.: Schlaf und Immundefunktion beim Menschen. In: Schulz, K.-H., Kugler, H.J., Schedlowski, M. (Hrsg.): *Psychoneuroimmunologie – ein interdisziplinäres Forschungsfeld* (im Druck)
7. Haus, E.: Chronobiology of circulation blood cells and platelets. In: Touitou, Y., Haus, E. (Hrsg.): *Biologic rhythms in clinical and laboratory medicine*. New York, Springer-Verlag, pp 504-526 (1992)
8. Haus, E., Lakatua, D., Swoyer, J., Sackett-Lundeen, L.: Chronobiology in hematology and immunology. *Am. J. Anat.* 168: 467-517 (1983)
9. Irwin, M., Mescovich, A., Gillen, J.C., Willoughby, R., Pike, J., Smith, T.: Partial sleep deprivation reduces natural killer cell activity in humans. *Psychosomatic Med.* 56: 493-498 (1994)
10. Katschinski, D.M., Neustock, P., Klüter, H., Kirchner, H.: Influence of various factors on interferon- α production in cultures of human leukocytes. *J. Interferon Res.* 14: 105-110 (1994)
11. Kirchner, H., Kleinicke, C., Digel, W.: A whole blood technique for testing production of human interferon by leukocytes. *J. Immunol. Meth.* 48: 213-219 (1982)
12. Levi, F.A., Canon, C., Blum, J., Mechkouri, M., Reinberg, A., Mathe, G.: Circadian and/or circahemidian rhythms in nine lymphocyte-related variables from peripheral blood of healthy subjects. *J. Immunol.* 134: 217-222 (1985)
13. McClintick, J., Costlow, C., Fortner, M., White, J., Gillin, C., Irwin, M.: Partial sleep deprivation reduces natural killer cell activity, interleukin-2 production and lymphokine-activated

killer cell activity. International Society of Psychoneuroendocrinology, Abstract.

14. Moldofsky, H., Lue, F., Davidson, J., Jephthah-Ochola, J., Carayanniotis, K., Gorczynski, R.: The effect of 64 hours of wakefulness on immune functions and plasma cortisol in humans. In: Horne, J. (Hrsg.): Sleep '88, Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, pp 185-187 (1989a)
15. Moldofsky, H., Lue, F., Davidson, J., Gorczynski, R.: Effects of sleep deprivation on human immune functions. FASEB J. 3: 1972-1977 (1989b)
16. Moldofsky, H., Lue, F., Eisen, J., Keystone, E., Gorczynski, R.M.: The relationship of Interleukin-1 and immune functions to sleep in humans. Psychosomatic Medicine 48: 309-318 (1986)
17. Moldofsky, H.: Sleep, neuroimmune and neuroendocrine functions in fibromyalgia and chronic fatigue syndrome. Adv. Neuroimmunol. 5 (in press) (1995)
18. Nelson, W., Tong, YL., Lee, JK., Halberg, F.: Methods for cosinor rhythmometry. Chronobiologica 6: 305-323 (1979)
19. Palmblad, J., Petrini, B., Wasserman, J., Åkerstedt, T.: Lymphocyte and granulocyte reactions during sleep deprivation. Psychosomatic Med. 41: 273-278 (1979)
20. Palmblad, J., Cantell, K., Strander, H., Froberg, J., Karlsson, C., Levi, L., Granstrom, M., Unger, P.: Stressor exposure and immunological responses in man: interferon producing capacity and phagocytosis. Psychosom. Res. 20: 193-199 (1976)
21. Rechtschaffen, A., Kales, A.: A manual of standardized terminology, techniques and scoring systems for sleep of human subjects (NIH Publication no. 204). Washington, DC, US Government Printing office (1968)
22. Rechtschaffen, A., Bergmann, B.M., Everson, C.A., Kushida, C.A., Gilliard, M.A.: Sleep deprivation in the rat. Integration and discussion of the findings. Sleep 12(1): 68-87 (1989)
23. Späth-Schwalbe, E., Porzolt, F., Born, J., Fehm, H.L.: Differences in stimulated cytokine release between sleep and sleep deprivation. In: Freund, M., Link, H., Schmidt, R., Welte, K. (Hrsg.): Cytokines in hemopoiesis, oncology, and AIDS II. Berlin, Springer-Verlag (1992)
24. Uthgenannt, D., Schoolmann, D., Pietrowsky, R., Fehm, H.L., Born, J.: Effects of sleep on the release of cytokines in humans. Psychosom. Med. 57: 97-104 (1995)
25. Zabel, P., Horst, H.J., Kreiker, C., Schlaak, M.: Circadian rhythm of interleukin-1 production of monocytes and the influence of endogenous and exogenous glucocorticoids in man. Klin. Wochenschr. 68: 1217-1221 (1990)
26. Zabel, P., Linnemann, K., Schlaak, M.: Zirkadiane Rhythmik von Zytokinen. Immun. Infekt. 21: 38-40 (1993)

KONGRESS

ORGANISATION

- Anmietung geeigneter Räumlichkeiten
- Hotelbuchungen
- Tagungsbüro
- Industrieausstellung
- Teilnehmerverwaltung
- Referentenbetreuung

Ihr leistungsstarker Partner mit über 30jähriger Erfahrung.

■
Kompetent bei der Durchführung von
KONGRESSEN, TAGUNGEN, SEMINAREN, SYMPOSIEN (auch via Satellit)

im gesamten Bundesgebiet und dem benachbarten Ausland.

Lassen Sie sich von uns beraten!



Hansisches Verlagskontor

Mengstraße 16, 23552 Lübeck, Tel. 04 51 / 70 31-2 05, Fax. 04 51 / 70 31-2 81

- Bereitstellen modernster Technik und Kommunikationssysteme
- Drucksachen, Herstellung und Versand
- Rahmenprogramm
- Finanzplanung/ Abrechnung
- PR unterstützende Aktivitäten

Antineutrophilenzytoplasma-Antikörper (ANCA) beim Systemischen Lupus Erythematoses und der Rheumatoiden Arthritis – Serologische Differenzierung zwischen Kollagenosen und primären systemischen Vaskulitiden

A. Schnabel, M. Braun, E. Reinhold-Keller, W.L. Gross

Zusammenfassung

Zur Klärung der Prävalenz, der Subspezifitäten und der klinischen Assoziationen von Antineutrophilenzytoplasma-Antikörpern (ANCA) beim systemischen Lupus erythematoses (SLE) und der rheumatoiden Arthritis (RA) und zur Klärung der Frage, welchen Beitrag die ANCA-Diagnostik zur Unterscheidung zwischen Kollagenosen und primären systemischen Vaskulitiden (PSV) liefert, wurden 157 Seren von SLE-Patienten und 385 Seren von RA-Patienten untersucht. Die ANCA-Prävalenz beim SLE betrug 25%, es wurden nur pANCA gefunden. Die Subspezifitäten beschränkten sich auf anti-Lactoferrin (10%), anti-Elastase (5%) und anti-Lysozym (2%), in 12 Seren (8%) konnte die Subspezifität nicht identifiziert werden. Eine Assoziation von ANCA-Befunden mit klinischen Manifestationen des SLE wurde nicht gefunden. Bei der RA wurde eine ANCA-Prävalenz von 16% gefunden, auch hier handelte es sich ausschließlich um pANCA. Die Subspezifitäten waren anti-Lysozym (2%), anti-Myeloperoxidase (1%), anti-Elastase (1%), anti-Cathepsin G (0,5%) und anti-Lactoferrin (0,5%), in 43 Seren (11%) konnte die Subspezifität nicht identifiziert werden. P-ANCA-positive RA-Patienten wiesen signifikant höhere Akutphaseparameter auf, ausgeprägtere entzündliche Destruktionen und eine höhere Rate systemischer Manifestationen. Das Fehlen von cANCA und anti-Proteinase 3 beim SLE und der RA und die sehr niedrige Prävalenz von anti-Myeloperoxidase bei der RA bestätigen die hohe Spezifität dieser ANCA-Subspezifitäten für die PSV und unterstreichen, daß ANCA neben den antinukleären Antikörpern einen wertvollen Beitrag zur serologischen Unterscheidung zwischen Kollagenosen und PSV liefern.

Einleitung

Antineutrophilenzytoplasma-Antikörper (ANCA) sind ein Autoantikörpersystem mit ei-

nem limitierten Spektrum von klinischen Assoziationen (1). Die stärkste Assoziation besteht zu den primären systemischen Vaskulitiden (PSV), speziell der Wegenerschen Granulomatose (WG), der mikroskopischen Polyangiitis und dem Churg-Strauss-Syndrom. Bei der aktiven WG im Generalisationsstadium liegt die Prävalenz von ANCA mit zytoplasmatischem Fluoreszenzmuster (cANCA) nahe 100% (2). Die Spezifität von cANCA für die WG liegt bei 95%. Etwa 85% dieser cANCA-Befunde sind durch anti-Proteinase 3 (PR3)-Reaktivität bedingt (2). Beim Churg-Strauss-Syndrom wurden sowohl cANCA mit anti-PR3 als auch pANCA mit anti-Myeloperoxidase (MPO)-Reaktivität nachgewiesen (3,4). P-ANCA mit anti-MPO-Reaktivität sind eng mit der mikroskopischen Polyangiitis und der pauci-immunen extrakapillär proliferierenden Glomerulonephritis assoziiert. Diese Patienten weisen bei florider Erkrankung zu 70-90% pANCA und zu ca. 60% anti-MPO auf (2). Während das cANCA-Muster zu 90% aus anti-PR3-Reaktivität resultiert, werden beim pANCA-Muster unterschiedliche Reaktivitäten gefunden. Gesicherte Zielantigene für pANCA sind neben MPO die Neutrophilenprodukte Laktoferrin (LF), Lysozym (LZ), Elastase (HLE), Cathepsin G (CG) und in einem kleinen Teil der Fälle PR3 (2). In jüngster Zeit wurde bactericidal permeability increasing protein (BPI) als weiteres ANCA-Zielantigen identifiziert (5).

Weitere klinische Assoziationen der ANCA sind die Kollagenosen einschließlich der rheumatoiden Arthritis (RA), chronische entzündliche Darmerkrankungen, autoimmune Lebererkrankungen und Infektionskrankheiten (1). Diese Erkrankungen weisen eine geringere ANCA-Prävalenz als die PSV auf und es handelt sich dabei überwiegend um pANCA uneinheitlicher Subspezifität.

Die klinischen Korrelate von ANCA beim SLE und der RA sind weitgehend unklar. Aufgrund ihrer Assoziation mit entzündlichen Gefäßerkrankungen

kungen ergab sich die Vermutung, ANCA könnten beim SLE und der RA bestimmte klinische Untergruppen markieren. Zur Klärung dieser Frage wurden zwei Kollektive von SLE- und RA-Patienten auf ihre ANCA-Prävalenz, ihre ANCA-Subspezifitäten und die Korrelationen zwischen ANCA-Befunden und klinischen Manifestationen untersucht.

Patienten und Methoden

Patienten

Es wurden 157 Seren von 120 Patienten mit SLE untersucht. Dabei handelte es sich um 97 Frauen und 23 Männern in einem mittleren Alter von $39,4 \pm 13,7$ Jahren, die die Kriterien der American Rheumatism Association von 1982 erfüllten (6). Patienten mit Medikamenten-induziertem SLE wurden ausgeschlossen. Für 93 Seren war der klinische Status zur Zeit der Serumgewinnung verfügbar und konnte mit den ANCA-Befunden korreliert werden. Der klinische Status wurde nach dem BILAG (British Isles Lupus Assessment Group)-Index erfaßt (7), der die Krankheitsaktivität in 8 Organen oder Systemen beurteilt, i.e. Allgemeinsymptome, Haut, zentrales Nervensystem, Bewegungsapparat, Herz-Kreislauf- und respiratorisches System, Gefäße, Nieren und Blutbild.

Die RA-Patienten wurden aus einer Gesamtzahl von 385 Patienten mit RA nach den Kriterien der American Rheumatism Association von 1987 rekrutiert (8). Bei 61 der 385 Patienten wurden ANCA nachgewiesen. Dabei handelte es sich um 40 Frauen und 21 Männer mit einem mittleren Alter von 60 ± 12 Jahren, diese Patienten stellten die Studiengruppe dar. Aus den ANCA-negativen Patienten des Gesamtkollektivs wurde eine Vergleichsgruppe von 61 Patienten gleichen Geschlechts und gleicher Krankheitsdauer rekrutiert. Dabei handelte es sich um 41 Frauen und 20 Männer mit einem mittleren Alter von 66 ± 12 Jahren. Die Patienten beider Gruppen wurden einem identischen klinischen Untersuchungsprogramm unterzogen. Dieses bestand aus Röntgen der Hände und Vorfüße dorso-volar bzw. dorso-plantar, Röntgen der Halswirbelsäule inklusive Inklinationsaufnahmen, Röntgen weiterer Gelenke mit gravierenden Funktionseinschränkungen, Bestimmung des Larsen-Index der arthritisch veränderten Gelenke (9), Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), C-reaktives Protein (CRP), Rheumafaktor und einem Suchprogramm für systemische Komplikationen, bestehend aus klinischer Untersuchung, Röntgen Thorax, Abdomen-Sonographie, Lungenfunktionsuntersuchung einschließlich der Kohlenmonoxid-

Diffusionskapazität, klinisch-chemischer Untersuchung einschließlich Kreatinin, Urinstatus und -sediment, ophthalmologischer und neurologischer fachärztlicher Untersuchung und bei klinischen Hinweisen auf Koronargefäßerkrankung Koronarangiographie.

Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT)

Als Suchtest für ANCA wurde ein IFT entsprechend der Empfehlungen der Europäischen ANCA-Studiengruppe eingesetzt (10,11). Zusammengefaßt wurden luftgetrocknete und Äthanolfixierte Zytozentrifugenpräparate von gereinigten Neutrophilen mit dem zu testenden Serum nach Verdünnung von 1:2 mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Wegen limitierter Serumengen wurde nur bei einer Serumverdünnung getestet. Gebundene Antikörper wurden mit Fluoreszein-Isothiozyanat-konjugierten $F(ab')_2$ -Fragmenten von Kaninchen-Anti-Human-IgG detektiert (DACO, Kopenhagen, Dänemark). Zur Unterscheidung zwischen pANCA und antinukleären Antikörpern wurden Seren mit perinukleärer Fluoreszenz auf Alkohol-fixierten Neutrophilen auch auf Formalin-fixierten Neutrophilen untersucht. Letztere wurden hergestellt durch Inkubation von Zytozentrifugenpräparationen von gereinigten Neutrophilen mit 0,5% Formalin bei Raumtemperatur für 5 Minuten. Eine perinukleäre Anfärbung auf Alkohol-fixierten Neutrophilen wurde nur dann als pANCA angesehen, wenn das Serum auf Formalin-fixierten Neutrophilen ein diffuses zytoplasmatisches Muster erzeugte. Wenn mit diesem Verfahren keine eindeutigen Ergebnisse erzielt wurden, wurde das Serum außerdem in einem konventionellen HEP2-Zell-Assay auf antinukleäre Antikörper (ANA) getestet. Wenn der Titer auf Alkohol-fixierten Granulozyten mindestens 2 Titer-Stufen höher war als auf HEP2-Zellen, wurde das Ergebnis als pANCA akzeptiert.

Bestimmung der Subspezifitäten mittels ELISA

Die ANCA-Subspezifitäten wurden mittels monospezifischem Festphase-ELISA bestimmt, die in Kooperation mit der Europäischen ANCA-Studiengruppe standardisiert worden waren (11). Dazu wurden hochgereinigtes MPO (0,5 µg/ml), PR3, HLE, CG, LF und LZ (2 µg/ml) in 0,1 M Karbonatpuffer, pH 9,6, über Nacht bei 4°C auf Mikrotiterplatten aufgebracht. Die Platten wurden mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung mit 0,05% Tween gewaschen und mit 2% Casein in phosphatgepufferter Kochsalzlösung geblockt. Die Test- und Kontrollseren wurden in einer Verdünnung von 1:50 aufgetragen, gebundene Antikörper wurden mit-

tels Konjugaten aus alkalischer Phosphatase und Ziegen-Anti-Human-IgG (Sigma, München) dargestellt und mit Paranitrophenylphosphat (Sigma) entwickelt. Die optische Dichte wurde bei 405 nm gemessen. Die obere Grenze des Normbereichs wurde bei 3 Standardabweichungen über dem Mittelwert von 250 Kontrollseren angesetzt.

Statistik:

Die Patientencharakteristika sind als Mittelwert ± Standardabweichung aufgeführt. Assoziationen zwischen serologischen und klinischen Befunden wurden mittels Chi²-Test, bei kleinen Beobachtungszahlen mittels Fishers-Test auf statistische Signifikanz geprüft.

Ergebnisse

ANCA mittels IFT beim SLE

40 von 157 SLE-Seren zeigten positive ANCA im IFT (Tabelle 1). Es handelte sich ausschließlich um ein pANCA-Muster, kein Serum zeigte ein cANCA-Muster.

Spezifität	Zahl (%) der positiven Seren
pANCA	40 (25%)
cANCA	0
anti-Lactoferrin	16 (10%)
anti-Elastase	8 (5%)
anti-Lysozym	4 (2%)
anti-Proteinase 3	0
anti-Myeloperoxidase	0
anti-Cathepsin H	0
unbekannte Spezifität	12 (8%)

Tabelle 1: ANCA-Befunde im indirekten Immunfluoreszenztest und ANCA-Subspezifitäten beim systemischen Lupus erythematoses

ANCA-Subspezifität beim SLE

157 Seren wurden mittels ELISA auf Reaktivität gegen PR3, MPO, CG, LF, HLE und LZ untersucht (Tabelle 1). In keinem Serum fand sich anti-PR3, anti-MPO oder anti-CG. In 16 Seren wurde anti-LF gefunden, in 8 anti-HLE und in 4 anti-LZ. Kein Serum zeigte Reaktivität gegen mehr als ein Antigen. 12 von 40 Seren mit pANCA-Nachweis im IFT zeigten keine Reaktivität gegen die 6 Testantigene.

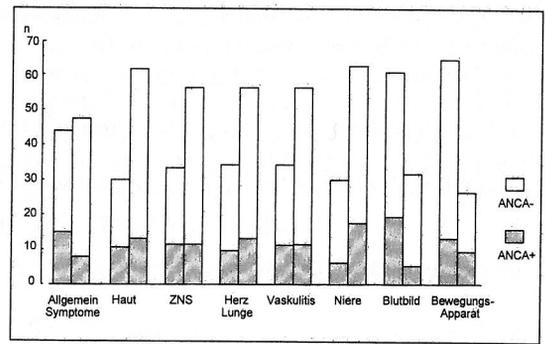


Abbildung 1: Prävalenz von pANCA beim systemischen Lupus erythematoses in Abhängigkeit vom Organbefall. Die linke Säule in jedem Paar repräsentiert die Patienten mit entsprechender Organbeteiligung, die rechte Säule Patienten ohne Organbeteiligung.

Korrelation von ANCA mit klinischen Befunden beim SLE

Zur Klärung der Frage, ob ANCA-Resultate mit bestimmten klinischen Manifestationen assoziiert sind, wurden die ANCA-Ergebnisse in 93 Seren von 56 Patienten mit der aktuellen Krankheitsaktivität in den 8 Kategorien des BILAG-Index korreliert (Abbildung 1). Dabei fand sich keine Korrelation zwischen pANCA, bestimmt im IFT, oder irgendeiner ANCA-Subspezifität und klinischer Aktivität in irgendeiner der 8 Kategorien. Weiterhin wurde keine Korrelation zwischen irgendeiner Kombination von klinischen Befunden und pANCA gefunden.

ANCA mittels IFT bei der RA

61 von 385 RA-Seren zeigten einen positiven ANCA (Tabelle 2). Dabei handelte es sich ausschließlich um ein pANCA-Muster.

ANCA-Subspezifität bei der RA

Die 61 Seren mit ANCA-Nachweis im IFT wurden mittels ELISA auf Reaktivität gegenüber PR3, MPO, CG, LF, HLE und LZ untersucht (Tabelle 2). Kein Serum zeigte anti-PR3. Sieben zeigten anti-LZ, 4 anti-MPO, 3 anti-HLE, 2 anti-CG und 2 anti-LF. Bei 43 von 61 pANCA-positiven Seren konnte die Subspezifität nicht identifiziert werden. Kein Serum zeigte Reaktivität gegen mehr als ein Antigen.

Vergleich von ANCA-positiven und ANCA-negativen RA-Patienten

Die 61 Patienten mit pANCA-Nachweis wurden mit 61 RA-Patienten gleichen Geschlechts und

Spezifität	Zahl (%) der positiven Seren
pANCA	61 (16%)
cANCA	0
anti-Lactoferrin	2 (0,5%)
anti-Elastase	3 (1%)
anti-Lysozym	7 (2%)
anti-Proteinase 3	0
anti-Myeloperoxidase	4 (1%)
anti-Cathepsin G	2 (0,5%)
unbekannte Spezifität	43 (11%)

Tabelle 2: ANCA-Befunde im indirekten Immunfluoreszenztest und ANCA-Subspezifitäten bei der rheumatoiden Arthritis

gleicher Erkrankungsdauer verglichen (Tabelle 3). Dabei zeigten die pANCA-positiven Patienten eine signifikant höhere mediane BSG (50 mm versus 30 mm/h, $p < 0,05$), ein signifikant höheres medianes CRP (5 versus 2 mg/dl, $p < 0,05$) und eine signifikant höhere Rheumafaktor-Prävalenz (81% versus 57%, $p < 0,05$). Der Vergleich des Röntgen-Status ergab in der pANCA-positiven Gruppe eine tendenziell höhere Rate postentzündlicher atlanto-axialer Instabilitäten (39% versus 21%, $p = 0,052$) und eine tendenziell höhere Prävalenz von hochgradigen entzündlichen Veränderungen an peripheren Gelenken entsprechend Larsen-Score IV bis V (51% versus 40%). Die Systemdiagnostik ergab eine tendenziell höhere Rate von extraartikulären Krankheitsmanifestationen in der pANCA-positiven Gruppe (14 versus 9 Patienten). Dabei wurden die systemischen Manifestationen Polyneuropathie, Myositis, Vaskulitis des zentralen Nervensystems, Koronariitis, fibrosierende Alveolitis und pulmonale Rheumaknoten nur in der pANCA-positiven Gruppe gefunden. Eine signifikante Korrelation irgendeines ANCA-Befunds mit extra-artikulären Manifestationen wurde nicht gefunden.

Diskussion

Kollagenosen und PSV sind systemische Autoimmunerkrankungen unklarer Ätiologie, die eine Vielzahl von klinischen und histopathologischen Gemeinsamkeiten aufweisen. Die Gemeinsamkeiten veranlaßten Klemperer, diese Erkrankungen unter dem Begriff „Kollagenkrankheiten“ zusammenzufassen (12). Erst nach der Schaffung dieses auf klinischen und histopathologischen Befunden basierenden Konzepts wurden die antinukleären Antikörper (ANA) und ihre Assoziation mit ei-

Klinik	Zahl der Patienten	
	pANCA positiv	pANCA negativ
Episkleritis/Skleritis	4	1
Polyneuropathie	3	0
Sjögren-Syndrom	2	8
Lungenfibrose	3	0
Lungengranulome	2	0
Myositis	1	0
ZNS-Vaskulitis	1	0
Koronariitis	1	0

Tabelle 3: Systemische Krankheitsmanifestationen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis in Abhängigkeit vom ANCA-Status

nem Teil der systemischen Autoimmunerkrankungen entdeckt und die mit den ANA assoziierten „Kollagenosen“ wurden konzeptionell von den nicht mit ANA assoziierten PSV abgetrennt. In den vergangenen 10 Jahren wurde mit den ANCA ein weiteres Autoantikörpersystem für die systemischen Autoimmunerkrankungen beschrieben, das in erster Linie mit den PSV assoziiert ist (2). Dabei handelt es sich zum Teil offenbar nicht nur um serologische Marker, sondern um pathogenetisch aktive Antikörper (2,13). Die neueren Befunde zur immunpathologischen Bedeutung von ANCA bei den PSV unterstützen die Sicht, daß Kollagenosen und PSV zwar eine Reihe von klinischen und histopathologischen Gemeinsamkeiten aufweisen, aufgrund ihrer Immunpathogenese und ihrer serologischen Korrelaten jedoch distinkte Erkrankungskategorien sind.

Neben ihrer Bedeutung für die Pathogeneseforschung und die Klassifikation haben sich die ANCA zu einem wichtigen Instrument für die klinische Diagnostik entwickelt. Aufgrund ihrer engen Assoziation mit der WG und der mikroskopischen Polyangiitis sind anti-PR3 und anti-MPO die wichtigsten ANCA-Subspezifitäten (1). Anti-LF, anti-LZ, anti-CG und anti-HLE liefern dagegen aufgrund ihrer breitgestreuten klinischen Assoziationen und ihrer niedrigen Prävalenz keinen wesentlichen Beitrag zur klinischen Diagnostik (1). Da bei einem Teil der Patienten mit PSV neben ANCA auch ANA gefunden werden und bei einem Teil der Patienten mit Kollagenosen neben ANA auch ANCA (14,15), ist die serologische Trennung zwischen beiden Erkrankungsgruppen nicht absolut. Die Vermeidung von Fehlklassifikationen erfordert deshalb in beiden Antikörpersystemen die Bestimmung der Antikörpersubspezifi-

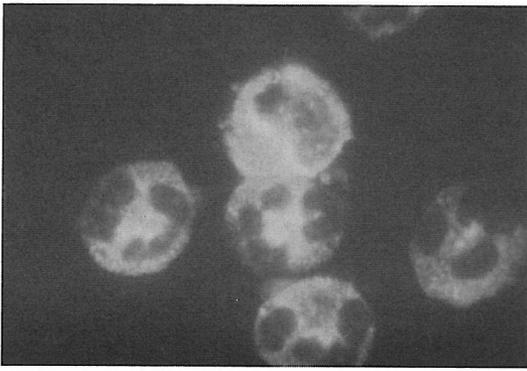


Abbildung 2: Immunhistologischer Antikörpernachweis gegen neutrophile Granulozyten mit zentral akzentuierter Fluoreszenz (c-ANCA) bei einem Patienten mit Morbus Wegener. Das Präparat wurde freundlicherweise von Prof. Dr. W. Gross, Lübeck, zur Verfügung gestellt (siehe auch Titelbild).

täten und die Kenntnis des Spektrums der zu erwartenden Subspezifitäten bei den zu unterscheidenden Erkrankungen. Es war das Ziel dieser Untersuchungen, dazu einen Beitrag zu liefern.

In dieser Studie betrug die Prävalenz von ANCA beim SLE 25%. Bei der Bestimmung der ANCA-Subspezifitäten fand sich in keinem Serum cANCA, anti-PR3 oder anti-MPO. Im IFT wurde ausschließlich ein pANCA-Muster gefunden, die pANCA-Subspezifitäten beschränkten sich auf anti-LF, anti-HLE und anti-LZ.

Diese Befunde bestätigen die hohe Spezifität von cANCA und anti-PR3 für die WG und sie stimmen überein mit Untersuchungen aus anderen Labors, in denen ebenfalls kein cANCA und kein anti-PR3 beim SLE gefunden wurde (16-18). Einzelne Mitteilungen über cANCA-Positivität bei Lupus-Patienten (19) müssen aus methodischer Sicht kritisch betrachtet werden. Die hohe Prävalenz von Autoantikörpern beim SLE beinhaltet die Möglichkeit, daß auch Antikörper, die gegen nicht-granulozytenspezifische Antigene gerichtet sind, ein positives Ergebnis im IFT ergeben und als ANCA fehlgedeutet werden. Diese Fehlermöglichkeit erfordert die Differenzierung von IFT-Ergebnissen auf verschiedenen Substraten und eine sehr restriktive Interpretation der Resultate (20). Insgesamt sprechen die verfügbaren Arbeiten und die kritische Bewertung der methodischen Verfahrensweisen dafür, daß cANCA beim SLE nicht vorkommen und cANCA und anti-PR3 folglich eine scharfe Trennung zwischen den PSV und dem SLE erlauben.

In dieser Untersuchung wurde bei keinem SLE-Patienten anti-MPO gefunden, sodaß auch diese Subspezifität eine klare Unterscheidung zwischen den PSV und den Kollagenosen zu bieten scheint. Dieser Schluß muß insofern eingeschränkt werden, als wir außerhalb dieser Untersuchung bei vereinzelten SLE-Patienten tatsächlich anti-MPO nachgewiesen haben und solche Berichte auch aus anderen Laboren vorliegen (16,17,21-24). Weiterhin wurde in dieser Arbeit anti-MPO auch bei einer kleinen Zahl von RA-Patienten gefunden. Insgesamt schließt deshalb anti-MPO-Reaktivität einen SLE oder eine andere Kollagenose nicht sicher aus, dieser Befund spricht aber bei einer entsprechenden klinischen Befundkonstellation eher für eine PSV als für einen SLE. Arbeiten, in denen auch ANCA-Titer bestimmt wurden, lassen erkennen, daß anti-MPO und pANCA beim SLE im Mittel mit niedrigerem Titer vorkommen als bei den PSV und so bei der Unterscheidung zwischen diesen Diagnosen helfen (17,18,21,22,24).

Die pANCA-Subspezifitäten waren bei den SLE-Patienten dieser Untersuchung auf anti-LF, anti-HLE und anti-LZ begrenzt. Die klinischen Assoziationen dieser Subspezifitäten umfassen das gesamte Spektrum von Erkrankungen, bei denen pANCA gefunden wurde (2). Im Gegensatz zu anti-PR3 und anti-MPO tragen diese Subspezifitäten folglich nicht zur Unterscheidung zwischen dem SLE und anderen Autoimmunerkrankungen bei.

Bei diesen SLE-Patienten fand sich keine Korrelation zwischen irgendeinem ANCA-Befund und irgendeinem der im BILAG-Index erfaßten klinischen Merkmale. Frühere Berichte, die für eine Assoziation von anti-HLE mit neurologischen SLE-Manifestationen (22) und von anti-LF mit der extrakapillär proliferierenden Glomerulonephritis der WHO-Klasse IV sprachen (26), blieben unbestätigt und lassen sich auch durch diese Untersuchung nicht stützen. Die einzige bestätigte klinische Assoziation einer ANCA-Subspezifität ist die Assoziation von anti-MPO mit dem Hydralazin-induzierten SLE, die von zwei unabhängigen Gruppen gefunden wurde (21,22).

Die in dieser Untersuchung gefundenen ANCA-Befunde und ihre klinischen Korrelate bei der RA stimmen in ihrer Tendenz mit denen beim SLE überein. Bei diesen RA-Patienten dieser Untersuchung wurde eine erhöhte ANCA-Prävalenz gefunden und es handelte sich dabei ausschließlich um pANCA. In keinem RA-Serum wurde cANCA gefunden. Verglichen mit anderen Untersuchungen, in denen eine ANCA-Prävalenz zwischen 39% und 70% bei der RA gefunden wurde (27-30),

spricht die Prävalenz von 16% in dieser Untersuchung für eine geringere Sensitivität des verwandten IFT. Dieser Umstand dürfte auch dafür verantwortlich sein, daß in dieser Untersuchung kein cANCA gefunden wurde, während in anderen Untersuchungen solche Befunde in niedriger Frequenz mitgeteilt wurden (28,29). Da niedrig-titrige ANCA-Befunde offenbar geringe Krankheitspezifität haben, sollte die Sensitivität der Methode so eingestellt sein, daß niedrig-titrige Befunde im Interesse einer möglichst hohen diagnostischen Spezifität nicht detektiert werden. Der Nachweis von anti-MPO bei 7% dieser RA-Patienten unterstreicht, daß die diagnostische Spezifität dieser Antikörper-Subspezifität für die PSV geringer ist, als die von cANCA und anti-PR3 (28-30).

Die Korrelation der ANCA-Befunde mit klinischen Merkmalen ergab bei diesen RA-Patienten lediglich schwache Assoziationen. P-ANCA positive Patienten wiesen eine höhere serologische Krankheitsaktivität auf, erkennbar an höheren Werten für BSG, CRP und Rheumafaktor. Sie zeigten eine tendenziell höhere Rate von radiologisch nachgewiesenen postentzündlichen Halswirbelsäulenveränderungen und tendenziell stärker ausgeprägte radiologische Destruktionen an den Extremitätengelenken. Weiterhin zeigten pANCA-positive Patienten eine deutlich höhere Rate von extraartikulären Krankheitsmanifestationen.

Coremans et al. fand beim Vergleich von 49 Patienten mit rheumatoider Vaskulitis und 50 Patienten mit unkomplizierter RA keinen wesentlichen Unterschied in der ANCA-Prävalenz, jedoch eine signifikant höhere Rate von anti-LF bei der rheumatoiden Vaskulitis (29). In den Studien von Mulder et al. und deBandt et al. wurde ebenso, wie in der vorliegenden Untersuchung, keine Assoziation zwischen pANCA oder irgendeiner ANCA-Subspezifität und der rheumatoiden Vaskulitis gefunden (28,30), sodaß die verfügbaren Studien mehrheitlich gegen die Annahme sprechen, ANCA seien Indikatoren für die rheumatoide Vaskulitis. Mulder et al. beschrieben eine tendenziell höhere ANCA-Prävalenz bei RA-Patienten mit langer Erkrankungsdauer (30). Auch dieser Befund konnte in der aktuellen Untersuchung nicht reproduziert werden. Die Assoziation von pANCA mit einer erhöhten Prävalenz des Rheumafaktors und einer hohen Destruktivität der RA unterstützt entsprechende Befunde von Metzger et al (27).

Zusammengefaßt bestätigt diese Untersuchung eine erhöhte Prävalenz von ANCA beim SLE und der RA. Weder beim SLE noch bei der RA konnte jedoch eine Assoziation eines ANCA-Befunds mit irgendeinem klinischen Merkmal gefunden wer-

den, die stark genug wäre, um diagnostische oder therapeutische Entscheidungen wesentlich zu beeinflussen. Insbesondere fand sich keine Assoziation von ANCA-Befunden mit der Vaskulitis oder Glomerulonephritis im Rahmen dieser Erkrankungen. Die Befunde zeigen weiterhin, daß die PSV einerseits und der SLE und die RA ein distinktes ANCA-Muster aufweisen, das für die klinische Diagnostik genutzt werden kann. Bei adäquaten Assay-Bedingungen sind dabei cANCA und anti-PR3 weitgehend spezifisch für die PSV, in erster Linie für die WG. Der Nachweis von anti-MPO spricht bei einer entsprechenden klinischen Konstellation mit überwiegender Wahrscheinlichkeit für eine PSV, in erster Linie für die mikroskopische Polyangiitis, jedoch ist die Spezifität dieses Befunds für die PSV offenbar nicht so hoch, wie die von anti-PR3. Die Befunde unterstützen die Auffassung, daß die PSV und die Kollagenosen immunpathogenetisch unterschiedliche Krankheitskategorien darstellen, die infolge ihrer Autoantikörperassoziationen auch serologisch weitgehend sicher zu differenzieren sind.

Literatur

1. Gross WL, Csernok E. Immunodiagnostic and pathophysiologic aspects of antineutrophil cytoplasmic antibodies in vasculitis. *Curr Op Rheumatol* 1995;7:11-19.
2. Gross WL, Schmitt WH, Csernok E. ANCA and associated diseases: Immunodiagnostic and pathogenetic aspects. *Clin Exp Immunol* 1993;91:1-12.
3. Klinkenborg A, Reinhold-Keller E, Csernok E, Gross WL. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in Churg-Strauss syndrome (CSS) -Prevalence, specificities, and clinical significance. *Arthritis Rheum* 1994;37:S267(Abstract)
4. Cohen Tervaert JW, Goldschmeding R, van dem Borne AEGKR, Kallenberg CGM. Anti-myeloperoxidase antibodies in the Churg-Strauss syndrome. *Thorax* 1991;46:70-71.
5. Herzberg C, Csernok E, Stoffel M, Carroll SF, Szymkowiak C, Gross WL. Disease associations of ANCA with specificity for bactericidal/permeability increasing protein (BPI). *Clin Exp Immunol* 1995;101 Suppl.1:41(Abstract)
6. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Green Schaller J, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-1277.
7. Symmons DPM, Coppock JS, Bacon PA, Bresnihan B, Isenberg DA, Maddison P, McHugh N, Snaith ML, Zoma AS. Development and assessment of a computerized index of clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. *Q J Med* 1988;69:927-937.
8. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, Medsger TA, Mitchell DM, Neustadt DH, Pinals RS, Schaller JG, Sharp JT, Wilder RL, Hunder GG. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-324.

9. Hagen EC, Andrassy K, Csernok E, Daha MR, Gaskin G, Gross WL, Lesavre P, Lüdemann J, Pusey CD, Rasmussen N. The value of indirect immunofluorescence and solid phase techniques for ANCA detection: a report on the first phase of an international cooperative study on the standardization of ANCA assays. *J Immunol Methods* 1993;159:1-16.
10. Larsen A, Dale K, Eck M. Radiographic evaluation of rheumatoid arthritis and related conditions by standard reference films. *Acta Radiol Diagn* 1977;18:481-491.
11. Nölle B, Specks U, Lüdemann J, Rohrbach MS, DeRemee RA, Gross WL. Anticytoplasmic autoantibodies: their immunodiagnostic value in Wegener's granulomatosis. *Ann Intern Med* 1989;111:28-40.
12. Klemperer P. The concept of collagen diseases. *Am J Pathol* 1950;26:505-519.
13. Shoenfeld Y. Autoimmunity and autoimmune diseases like systemic lupus erythematosus. In: Lahita RG, ed. *Systemic lupus erythematosus*. 2nd Ed. New York: Churchill Livingstone, 1992:3-14.
14. Coulthart A, Athanassiou P, Loizou S, Cazabon J, Norsworthy P, Pusey CD, Gaskin G, Davies K. Relationship between ANA, ANCA and other autoantibodies in rheumatic diseases. *Clin Exp Immunol* 1995; 101, Suppl. 1:59 (Abstract).
15. Bygren P, Rasmussen N, Isaksson B, Wieslander J. Antineutrophil cytoplasm antibodies, anti-GBM antibodies and anti-dsDNA antibodies in glomerulonephritis. *Eur J Clin Invest* 1992;22:783-792.
16. de Bandt M, Meyer O, Haim T. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) testing in systemic lupus erythematosus (SLE) and drug induced lupus (DILE). *Clin Exp Immunol* 1995;101 Suppl. 1:60(Abstract)
17. Küster S, Apenberg S, Andrassy K, Ritz E. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus. *Contrib Nephrol* 1992;99:94-98.
18. Lawton JWM, Lee SS. Anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) in systemic lupus erythematosus (SLE). *Am J Kidney Dis* 1991;18:200-201.(Abstract)
19. Puzner R, Urowitz M, Gladman D, Gough J. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1994;21:1670-1673.
20. Schnabel A, Csernok E, Isenberg DA, Mrowka C, Gross WL. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1994;38:633-637.
21. Cambridge G, Wallace H, Bernstein RM, Leaker B. Autoantibodies to myeloperoxidase in idiopathic and drug-induced systemic lupus erythematosus and vasculitis. *Br J Rheumatol* 1994;33:109-114.
22. Nässberger L, Sjöholm AG, Jonsson H, Sturfeld G, Akeson A. Autoantibodies against neutrophil cytoplasm components in systemic lupus erythematosus and in hydralazine-induced lupus. *Clin Exp Immunol* 1990;81:380-383.
23. Gallicchio MC, Savige JA. Detection of anti-myeloperoxidase and anti-elastase antibodies in vasculitides and infections. *Clin Exp Immunol* 1991;84:232-237.
24. Falk RJ, Jennette JC. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988;318:1651-1657.
25. Nässberger L, Jonsson H, Sjöholm AG, Sturfeld G, Heubner A. Circulating anti-elastase in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1989;333:509
26. Lee SS, Lawton JWM, Chan CE, LI CS, Kwan TH, Chau KF. Antilactoferrin antibody in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 1992;31:669-673.
27. Metzger D, Röther E, Melchers I, Schlesier M, Peter H-H. Autoantibodies against neutrophil cytoplasmic antigens (ANCA): specificity and MHC association in rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 1993;93 Suppl.1:30(Abstract)
28. de Bandt M, Meyer O, Haim T. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 1995;101 Suppl.1:72(Abstract)
29. Coremans IEM, Hagen EC, Daha MR, van der Woude FJ, van der Voort EA, Kleijburg-van der keur C, Breedveld FC. Antilactoferrin antibodies in patients with rheumatoid arthritis are associated with vasculitis. *Arthritis Rheum* 1992;35:1466-1475.
30. Mulder AHL, Horst G, van Leeuwen MA, Limburg PC, Kallenberg CGM. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1993;36:1054-1060.

Immunpathogenese bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

M. Seyfarth¹, D. Ludwig², A. Woywodt^{1,2}, M. Stahl², B. E. Wenzel², C. Pfister², G. Jantschek², A. Schnabel³, H. Merz⁴, H. Kirchner¹ und E.F. Stange²

Zusammenfassung

Bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen fanden sich in unterschiedlicher Häufigkeit Antikörper gegen Pankreasgewebe, intestinale Becherzellen und Neutrophile. Eine neu entwickelte Methode erlaubte erstmalig die Beschreibung von lokalen Antikörpern in der Mucosa, die gegen spezifische Autoantigene, wie z.B. humanes Hitzeschockprotein-70, gerichtet sind. Möglicherweise spielen diese verschiedenen Autoimmunphänomene eine Rolle bei der Aktivierung des Cytokinsystems in der chronisch entzündeten intestinal Mucosa.

Summary

Subgroups of patients with chronic inflammatory bowel disease were shown to display antibodies against pancreatic tissue, intestinal goblet cells as well as neutrophils. A newly developed method allowed for the first time the identification of local antibodies in the mucosa which were shown to interact with specific autoantigens such as human heat shock protein 70. Possibly, these autoimmune phenomena are involved in the activation of the cytokine system in chronically inflamed intestinal mucosa.

Einleitung

Die ständige Präsenz einer Vielzahl antigener Substanzen, zu denen sowohl essentielle Nahrungsbestandteile und physiologische Darmflora, als auch potentiell pathogene Keime zählen, erfordert differenzierte Erkennungs- und Abwehrmechanismen des Organismus. Die Induktion lokaler Immunität und unspezifischer systemischer Toleranz ist das charakteristische Merkmal des intestinalen Immunsystems. Obwohl das auslösende Ereignis bisher nicht identifiziert werden konnte, gilt als gesichert, daß Störungen der Immunregulation für die Ätiologie und die Pathogenese der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED), insbe-

sondere für den Morbus Crohn und die Colitis ulcerosa von Bedeutung sind (1). Noch unklar ist, ob es sich hierbei um eine aggressive Immunantwort gegenüber Pathogenen oder eine gestörte Down-Regulation gegenüber normalerweise harmlosen Agentien handelt. Die vorliegenden lokalen Veränderungen sind durch entzündliche Reaktionen mit den daraus resultierenden Gewebsschädigungen gekennzeichnet. In der intestinalen Mucosa finden sich vermehrt aktivierte Makrophagen, T-Zellen und B-Zellen. Dabei spielen die T-Zellen im Rahmen zellvermittelter Immunreaktionen eine wichtige Rolle. Unter Mitwirkung löslicher Mediatoren, den Cytokinen, sind sie wesentlich an der Differenzierung und Reifung der B-Zellen zu Plasmazellen und damit an der Induktion der Immunglobulinsynthese beteiligt. Bei CED finden sich sowohl veränderte Cytokinsynthesemuster (2) als auch eine gestörte Produktion der Immunglobulin-Isotypen-Subklassen (3).

Während systemische Immunreaktionen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oft unspezifisch sind, können mukosale Antigen determinanten auf der einen Seite und luminal bakterielle Antigene auf der anderen Seite Ausgangspunkt von Autoimmunreaktionen sein (4). Hitze-Schock-Proteine (HSP) mit der charakteristischen ausgeprägten Strukturhomologie zwischen verschiedenen Spezies könnten somit als Antigen system in der Ätiopathogenese der mukosalen Entzündung eine Rolle spielen (5). Die HSP-Synthese kann in fast allen Zellen durch verschiedene Streßfaktoren (Hitze, Anoxie, Cytokine usw.) induziert werden. Hitzeschockproteine dienen der Aufrechterhaltung der zellulären Integrität, regulieren die Proteinsynthese der Zelle und können Antigene präsentieren. HSP-60 und 70 können zusätzlich als Autoantigen fungieren. So fanden sich in Seren von Patienten mit rheumatoider Arthritis und systemischem Lupus erythematodes HSP-Autoantikörper und HSP-autoreaktive T-Zellen (6). In serologischen Untersuchungen fand Elsaghier bei Patien-

ten mit CED erhöhte Antikörperspiegel gegen mykobakterielles HSP-65 bei über der Hälfte der M. Crohn-Patienten (5). Die Induktion dieser Antikörper kann durch die Aufnahme bakterieller Antigene oder den Verlust von humanem HSP durch die entzündlich veränderte Darmschleimhaut bedingt sein und Ursprung einer möglichen Kreuzreaktivität zwischen humanen und bakteriellen Antigen determinanten sein.

Mit einem interdisziplinären Ansatz sollte daher untersucht werden, inwieweit Autoimmunitätsvorgänge bei CED eine Rolle spielen. Ziel der vorliegenden Arbeit war zu klären, welche Bedeutung dem Nachweis verschiedener Hitzeschockproteine und systemischer und mukosaler lokaler Autoantikörper bei Patienten mit CED zukommt. Ferner sollten die für diese Darmerkrankungen charakteristischen Veränderungen im Cytokinmuster und in der Expression von Adhäsionsmolekülen aufgezeigt werden. Schließlich sollte die Frage beantwortet werden, ob aus diesen Beobachtungen weitere Schlüsse für die Diagnostik, Therapie oder Prognose gezogen werden können.

Patientengut und Methoden

Die Patienten wurden aus dem Krankengut der Polikliniken oder aus dem stationären Kollektiv rekrutiert. Die Diagnosen M. Crohn bzw. Colitis ulcerosa waren klinisch und histologisch gesichert, die Erkrankung selbst bestand bei allen mindestens seit 6 Monaten. Als Kontrollgruppe dienten Patienten, bei denen eine CED mit Sicherheit ausgeschlossen werden konnte bzw. solche mit einer infektiösen Enterocolitis.

Wir untersuchten Serumproben von Patienten auf Autoantikörper gegen Pankreas-/Azinus-Zellen, gegen intestinale Becherzellen und gegen antinukleäre zytoplasmatische Antikörper vom perinukleären Typ (p-ANCA). Die entsprechenden Schnitte wurden von der Firma Euroimmun, Lübeck, bezogen und der Testablauf entsprach den Vorgaben durch den Hersteller. Die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch durch zwei voneinander unabhängige Untersucher. Die Bestimmung der Cardiolipin-Antikörper (aCL-AK) basierte auf einem in der Rheumaklinik Berlin Buch

entwickelten Anticardiolipin-Isotypischen Festphasen-Elisa (Fa. Imtec).

In ileokoloskopisch entnommenen Biopsien wurde mukosales Hsp 70 mittels Westernblot nachgewiesen. Die zelluläre Lokalisation erfolgte durch indirekte Immunperoxidasereaktion an Cryostatschnitten. Das Verteilungsmuster weiterer Hitzeschockproteine (Hsp 27, Hsp 60 und Hsp 90) wurde immunhistochemisch an Paraffinschnitten chirurgischer Resektate (APAAP) untersucht. Schließlich wurde erstmalig eine Methode entwickelt, um nach Ultraschallhomogenisierung und isoelektrischer Fokussierung der Proteine spezifische Antikörper in der Mucosa, z. B. gegen humanes HSP-70, im umgekehrten Immunoblot nachzuweisen. Außerdem führten wir exemplarisch den Nachweis der proinflammatorischen Cytokine IL-1 β , IL-6 und TNF α in Schleimhautbiopsien durch *in situ* Hybridisierung der jeweiligen mRNA unter Verwendung radioaktiv markierter Sonden (7). In parallelen Schnitten wurden CD3, CD14, CD68 sowie HLA-DR als Oberflächenepitope potentiell Cytokine sezernierender Zellpopulationen sowie die unter Cytokineinfluß exprimierten Adhäsionsmoleküle ICAM-1, LFA-1 α/β und ELAM-1 immunhistochemisch dargestellt.

Ergebnisse

Serologische Untersuchungen

Die Daten der serologischen Untersuchungen zu Antikörpern gegen Pankreasazinuszellen, intestinale Becherzellen und antineutrophile cytoplasmatische Antigene (ANCA) sind für die Patienten aller drei Gruppen in Tabelle 1 zusammengefaßt. Es zeigte sich, daß Patientenserum mit Morbus Crohn kaum gegen Pankreas/Azinus-Zellen bzw. p-ANCA reagierten, hingegen 40% gegenüber intestinalen Becherzellen. Bei den Patienten mit Colitis ulcerosa war auffällig, daß ein Großteil dieser Patienten Autoantikörper gegen p-ANCA zeigte. In der Kontrollgruppe traten lediglich zwei positive Autoantikörpernachweise auf. Die Ergebnisse der Verlaufsuntersuchungen wurden in den Tab.2 und 3 dargestellt.

	Pancreas-Azinus-Zellen	p-ANCA	intestinale Becherzellen
M. Crohn	2/19	1/19	7/19
Colitis ulcerosa	1/21	6/21	4/21
Kontrollgruppe	0/25	1/25	1/25

Tabelle 1: Anzahl positiver Testergebnisse / Gesamtuntersuchungen bei den 3 Patientengruppen

Pancreas-Azinus-Zellen	1 : 8	1 : 8	1 : 8
	1 : 4	1 : 4	1 : 4
p-ANCA	1 : 10	1 : 20	1 : 10
intestinale Becherzellen	1 : 20	1 : 20	1 : 20
	1 : 20	1 : 20	1 : 20
	1 : 40	1 : 40	1 : 20
	1 : 40	1 : 40	n.d.
	1 : 20	1 : 20	1 : 40
	1 : 10	1 : 10	1 : 20
	+ / -	1 : 10	+ / -
	1. Untersuchung	90 Tage später	180 Tage später

Tabelle 2: Verhalten der Autoantikörper bei Pat. mit M. Crohn in der Verlaufsuntersuchung (n.d. = nicht untersucht)

Pancreas-Azinus-Zellen	1 : 16	1 : 16	1 : 16
p-ANCA	1 : 20	1 : 40	1 : 20
	1 : 1280	1 : 1280	1 : 1280
	1 : 40	1 : 40	1 : 40
	1 : 40	n.d.	1 : 40
	1 : 80	1 : 80	1 : 80
	1 : 80	1 : 40	1 : 40
intestinale Becherzellen	1 : 20	1 : 20	n.d.
	1 : 40	1 : 20	1 : 40
	1 : 40	1 : 40	1 : 20
	1 : 320	1 : 320	1 : 180
	1. Untersuchung	90 Tage später	180 Tage später

Tabelle 3: Verhalten der Autoantikörper bei Pat. mit Colitis ulcerosa in der Verlaufsbeobachtung (n. d. = nicht untersucht)

Ingesamt waren 11 von 37 Patienten mit Colitis ulcerosa (29 %) anti-Cardiolipin-Antikörper positiv: Vier Patienten mit aCL-IgG, 6 mit aCL-IgM und ein Patient war sowohl aCL-IgG als auch aCL-IgM positiv. Bei 4 Patienten fanden sich in der Anamnese thromboembolische Ereignisse, aber nur ein Patient war aCL-AK positiv. Die anderen 10 Patienten zeigten in der Anamnese keine Thromboembolien. Von 40 M. Crohn Patienten waren nur 6 (15 %) positiv. Bei einem von zwei Patienten mit Thromboembolien in der Anamnese fanden sich aCL-AK. Bei beiden Erkrankungen ergab sich keine Beziehung zwischen Auftreten von aCL-AK und Krankheitsaktivität.

Nachweis von mucosalen HSP und anti-HSP 70-Antikörpern

HSP-70 war qualitativ bei fast allen Patienten wie gesunden Kontrollpersonen nachzuweisen (Abb. 1). In der Immunfluoreszenz mit einem monoklonalen HSP-Antikörper fand sich eine kräftige Immunreaktivität in den Epithelzellen und einzelnen mononukleären Zellen in der Lamina propria (Abb. 2). Eine detailliertere Analyse der immunhistochemischen Färbung bestätigte dieses Verteilungsmuster. In einer semiquantitativen Analyse (Zellzählung) konnte bei Morbus Crohn, weniger bei Colitis ulcerosa, ein deutlich erhöhter Anteil

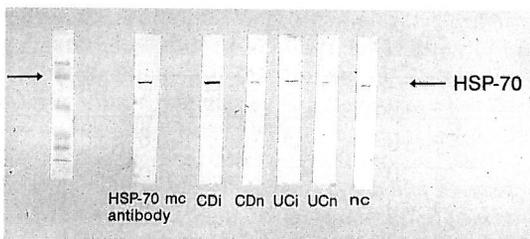


Abbildung 1. Mucosale Expression von HSP-70 bei Patienten mit CED und gesunden Kontrollen. Linker Pfeil: Molekulargewichtsmarker bei 80 kd. HSP-70 mc antibody nur Positivkontrolle mit reinem humanem HSP-70, CDi Crohn-Gewebe entzündet, CDn Crohn-Gewebe nicht entzündet, UCi Colitis ulcerosa-Gewebe entzündet, UCn Colitis ulcerosa-Gewebe nicht entzündet, nc normale Kontrolle.

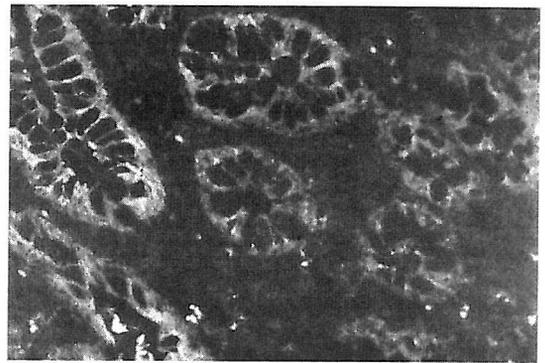


Abbildung 2. Expression von HSP-70 in entzündeter Colonmucosa eines Patienten mit Morbus Crohn (Immunfluoreszenz, Vergrößerung 40x)

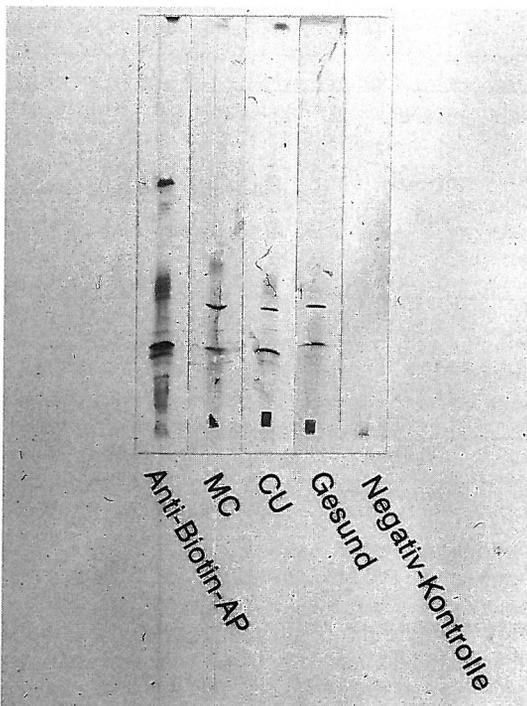


Abbildung 3. HSP-70-Antikörper in gesunder und entzündeter Mucosa bei Patienten mit CED und Kontrollen (Isoelektrische Fokussierung und reverser Immunblot). MC M. Crohn, CU Colitis ulcerosa.

HSP-70-exprimierender mononukleärer Zellen im Bereich der Lamina propria und Submucosa nachgewiesen werden. HSP-70 Antikörper fanden sich signifikant häufiger in entzündeten im Vergleich zu nicht entzündeten Arealen bei beiden Krankheitsbildern. Dagegen unterschieden sich nicht befallene Schleimhautareale bei Patienten mit CED nicht

von denen der Kontrollen (Abb 3). Während sich für HSP-60 ein ähnliches Verteilungsmuster fand, wurde HSP-27 besonders in Nervenzellen, glatten Muskelzellen und Endothelzellen der Submucosa exprimiert. Eine positive HSP-90-Immunfärbung fand sich ausgeprägt in Lymphfollikeln und in Epithelzellen.

Nachweis mucosaler Cytokin- und Adhäsionsmolekülexpression

Traditionelle Methoden erlauben im Verbund mit modernen molekularbiologischen Techniken zuverlässig die Quantifizierung mukosaler Cytokinproduktion auf der Ebene von Genexpression und Proteinbiosynthese. Darüberhinaus ist in diesem Kontext vor allem die Zuordnung pathologischer Cytokinsynthese zu distinkten Zellpopulationen von besonderem Interesse. Im Rahmen dieser Fragestellung ermöglicht die aufwendige *in situ* Hybridisierung das Studium der Cytokinexpression im histologischen Präparat durch Nachweis spezifischer mRNA in einzelnen Zellen. Dabei läßt sich intrazellulär synthetisierte mRNA nach Inkubation mit einer *in vitro* markierten komplementären RNA-Sonde durch Autoradiographie der gebildeten Hybridmoleküle darstellen.

In Gewebeproben von Kontrollpersonen fanden wir mRNA für proinflammatorische Cytokine nur in sehr wenigen Zellen. Biopsien von Patienten mit CED enthielten dagegen regelhaft erhebliche Mengen positiver Zellen. IL-1 β , IL-6 und TNF α mRNA wurde überwiegend in Zellen der Lamina Propria nachgewiesen. An parallelen Schnitten erhobene immunhistochemische Befunde legen nahe, daß es sich dabei um Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems handelt. Ebenso konnte eine vermehrte Präsenz endothelialer Adhäsions-

moleküle als mögliche Folge vermehrter Cytokinexpression in entzündetem Gewebe dargestellt werden. Cytokin-mRNA wurde auch in einzelnen Zellen innerhalb des Epithelverbandes gefunden und kann dort sowohl von Makrophagen als auch von Lymphozyten produziert worden sein. Ferner gelang bei mehreren Patienten mit CED die Darstellung zahlreicher Cytokine exprimierender Zellen auch in Gewebeproben aus makroskopisch nicht befallener Schleimhaut. Schließlich konnte in Biopsien einer Patientin mit M. Crohn IL-1 β und IL-6 mRNA in intestinalen Epithelzellen nachgewiesen werden.

Diskussion

Es besteht heute ein allgemeiner Konsens, daß Störungen der Immunregulation maßgeblich an der Aufrechterhaltung der chronisch-entzündlichen Reaktionen bei CED beteiligt sind. Die Beeinträchtigung der mukosalen Barrierefunktion begünstigt die Passage antigener Substanzen und führt qualitativ und quantitativ zu einer verstärkten Konfrontation des Immunsystems im Bereich der Mukosa bzw. Submukosa mit diesen Agentien. Dies kann zur Auslösung verschiedenartiger immunologischer Reaktionen führen. Daraus ergibt sich jedoch zunächst die Schwierigkeit, zwischen primär krankheitsauslösenden und sekundären Mechanismen zu unterscheiden.

Autoimmunreaktionen sind Reaktionen gegen körpereigene Strukturen. Sie entstehen durch den Bruch der normalerweise bestehenden Immuntoleranz. Von den verschiedenen Möglichkeiten, die zu dieser Störung führen können, steht die Imbalanz zwischen CD4⁺ (Helfer) - und CD8⁺ (Suppressor) - Zellen im Vordergrund. Kreuzreagieren-

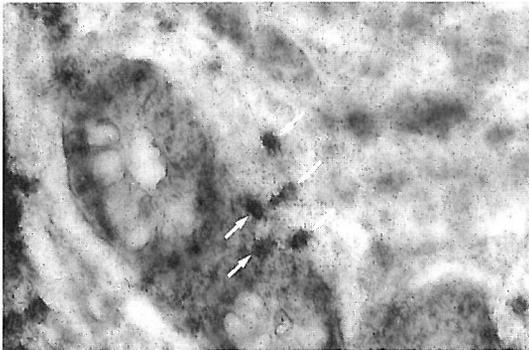


Abbildung 4. Expression von Interleukin-1 β -mRNA in einer Zellgruppe (Pfeile) in unmittelbarer Nähe zweier Krypten im entzündeten Colon einer Patientin mit M. Crohn (in situ Hybridisierung, Gegenfärbung nach Pappenheim, Vergrößerung 400x)

de Antigene, sequestrierte Antigene und die sogenannte *slow virus* Infektion können ebenfalls von Bedeutung sein. Nicht jede Autoimmunreaktion - nachgewiesen an der Existenz von Autoantikörpern - führt zu einer Autoimmunerkrankung, kann aber langfristig zu einer nachhaltigen Störung in der Immunregulation führen (8).

In der Literatur wird für den Morbus Crohn und Colitis ulcerosa immer wieder eine Autoimmungeneese vermutet (4,9); im Gegensatz zu dieser Meinung sind allerdings die bisher publizierten Befunde über Autoantikörper bei CED nicht überzeugend. Bei unseren Untersuchungen waren gegen intestinale Becherzellen 11 von 40 Patienten, bei Pankreas-/Azinus-Zellen nur 3 von 40 positiv. Auffallend war die Überschneidung der serologischen Befunde bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sowie deren Konstanz. Über einen Zeitraum von sechs Monaten änderte sich der Antikörperstatus praktisch nicht, unabhängig vom klinischen Befund und der durchgeführten Medikation. Dieser Umstand läßt vermuten, daß nach erfolgter Induktion die kontinuierliche Bildung der Autoantikörper ein weitgehend autonomer Prozess ist. Damit scheiden diese Parameter allerdings für die Differentialdiagnose und die Beurteilung von Therapieerfolg bzw. Prognose aus.

Antikörper gegen p-ANCA sind gegen zytoplasmatische Strukturen von neutrophilen Granulozyten gerichtet und spielen bei der Klassifikation von Vasculitiden eine entscheidende Rolle. Der Befund von p-ANCA bei Colitis ulcerosa bestätigt entsprechende Voruntersuchungen (10). Dies deutet andererseits auch darauf hin, daß Veränderungen im Bereich der kleinen Mukosagefäße im Sinne einer Vasculitis (11) in das Krankheitsgeschehen eingreifen können. Auch hier ist die Konstanz der Befunde über einen längeren Zeitraum augenfällig. Im gleichen Kontext sind aCL-AK zu sehen (12), die zumindest beim Phospholipidantikörper-Syndrom mit thromboembolischen Ereignissen und Aborten assoziiert sind. Die fehlende Assoziation bei CED mit solchen Komplikationen oder mit der Krankheitsaktivität läßt allerdings eine pathogenetische Rolle als unwahrscheinlich erscheinen.

HSP-70 wird offenbar physiologischerweise in der intestinalen Epithelzelle und in mononukleären LP-Zellen exprimiert. Eine zu erwartende gesteigerte Expression in Biopsien entzündeter Gewebsabschnitte bei CED-Patienten war vor allem immunhistologisch nachweisbar und bestätigt kürzlich vorgestellte Befunde zu HSP-60 auch bezüglich anderer Mitglieder der HSP-Familie (13). Die detaillierte Analyse der chirurgischen Resektate

ergab eine insgesamt vermehrte Synthese besonders in den tieferen Gewebsschichten. Mucosale HSP-70 Antikörper fanden sich vermehrt bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und besonders in entzündeten Darmabschnitten. Es ist jedoch unklar, ob es sich hier um einen spezifischen und pathogenetisch relevanten Befund handelt oder ob dies Ausdruck der bei CED generell gesteigerten Immunglobulinsynthese ist. Die Bedeutung besonders der Hitzeschockproteine der 60 und 70 kD-Familien liegt sicherlich in ihrer möglichen Antigenität als Ausgangspunkt von Kreuzreaktivitäten zwischen luminal bakteriellen und mukosalen Antigen determinanten (13). Die weitere Analyse HSP-produzierender und antigenpräsentierender Zellen erscheint essentiell zur Beurteilung der Rolle von Hitzeschockproteinen in der mukosalen Entzündung bei Patienten mit CED.

Interessanterweise bestätigt sich die generelle Stimulation der lokalen Immunreaktion auch auf Ebene der Cytokinsynthese, und zwar in entzündeten ebenso wie in makroskopisch normalen Arealen (7). Dies läßt vermuten, daß die immunologische Aktivierung der klinisch relevanten Entzündung lange vorausgeht. Die Synthese der verschiedenen Cytokine beschränkt sich allerdings nicht nur auf die Lamina propria (14), sondern läßt sich ebenso wie HSP-70 auch in Epithelzellen nachweisen. Diese können bei CED, nicht aber im normalen Darm, auch Antigene präsentieren und exprimieren HLA-Klasse II Glykoproteine (15). Es muß offen bleiben, inwieweit diese Befunde eine primäre pathogenetische Rolle des Epithels belegen. Zusammenfassend dokumentieren diese immunpathogenetischen Untersuchungen eine Vielzahl von serologischen Phänomenen, deren Rolle auf der Ebene der lokalen Entzündungsreaktion noch unklar ist. Neuentwickelte Methoden lassen jedoch die Definition der Spezifität mukosaler Antikörper zu (16), beispielsweise deren (Kreuz-)reaktion mit humanem HSP-70. Die am ehesten unspezifische Aktivierung des Cytokin- und Adhäsionsmolekülsystems stellt möglicherweise eine Reaktion auf diese autoimmunen Mechanismen dar. Es besteht die Hoffnung, daß dieser Ansatz die therapeutische Wirkung immunsuppressiver Therapie weiter verbessert (17) und gezieltere Interventionen erlaubt.

Literatur:

1. Mac Dermott, R.P., Stenson, W.F.: Alterations of the immune system in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Advances in Immunology* 42, 285-330 (1988)
2. Isaacs, K.L., Sartor, R.B., Haskill, S.: Cytokine messenger RNA profiles in inflammatory bowel disease mucosa detected by polymerase chain reaction amplification. *Gastroenterology* 103, 1587-1595 (1992)
3. Mac Dermott, R.P., Nash, G.S., Bertovich, M.J., Seiden, M.V., Bragdon, M.J., Beale, M.G.: Alterations of IgM, IgG, and IgA synthesis and secretion by peripheral blood and intestinal mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterology* 81, 844-851 (1981)
4. Snook, J.: Are the inflammatory bowel diseases autoimmune disorders? *Gut* 31, 961-963 (1990)
5. Elshagier, A., Prantera, C., Bothamley, G. et al.: Disease association of antibodies to human and mycobacterial hsp70 and hsp60 stress proteins. *Clin Exp Immunol* 89, 305-309 (1992)
6. Minota, S., Cameron, B., Welch, W.J., Winfield, J.B.: Autoantibodies to the constitutive 73-kD member of the hsp70 family of heat shock proteins in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 168, 1475-1480 (1988)
7. Woywodt, A., Neustock, P., Kruse, A., Schwarting, K., Ludwig, D., Stange, E.F., Kirchner, H.: Cytokine expression in intestinal mucosal biopsies. In situ hybridisation of the mRNA for interleukin-1 β , interleukin-6 and tumour necrosis factor- α in inflammatory bowel disease. *Eur Cytokine Netw* 5, 387-395 (1994)
8. Naparstek, Y., Plotz, P.H.: The role of autoantibodies in autoimmune disease. *Annu Rev Immunol* 11, 79-104 (1993).
9. Stöcker, W., Otte, M., Normann, D., Finkbeiner, H., Jantschek, G., Scriba, P.C.: Autoimmunity to pancreatic juice in Crohn's disease. *Scand. J. Gastroenterology* 22 (suppl 139), 41-52 (1987)
10. Oudkerk, P.M., Ellerbroek, P.M., Ridwan, B.U. et al.: Serum antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease are mainly associated with ulcerative colitis. A correlation study between perinuclear antineutrophil cytoplasmic autoantibodies and clinical parameters, medical and surgical treatment. *Gut* 34, 46-50 (1993)
11. Wakefield, A.J., Ekbo, A., Dhillon, A.P., Pittilo, R.M., Pounder, R.E.: Crohn's disease: pathogenesis and persistent measles virus infection. *Gastroenterology* 108, 911-916 (1995)
12. Chamouard, P., Grunbaum, L., Wiesel, M.L., Freyssinet, J.M., Duclos, B., Cazenave, J.P., Baumann, R.: Prevalence and significance of anticardiolipin antibodies in Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* 7, 1501-1504 (1994)
13. Peetermanns, W.E., D'Haens, G.R., Ceuppens, J.L., Rutgeerts, P., Geboes, K.: Mucosal expression by B7-positive cells of the 60-kilodalton heat-shock protein in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 108, 75-82 (1995)
14. Schreiber, S., Mac Dermott, R.P., Raedler, A., Pinnau, R., Bertovich M.J., Nash, G.S.: Increased activation of isolated intestinal lamina propria mononuclear cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 101, 1020-1030 (1991)
15. Hoang, P., Crotty, B., Dalton, H.R., Jewell, D.P.: Epithelial cells bearing Class 2 molecules stimulate allogeneic human colonic intraepithelial lymphocytes. *Gut* 33, 1089-1093 (1992)
16. Ludwig, D., Pfister, C., Drexelius, N., Schwarting, K., Wenzel, B.E., Stange, E.F.: Antigen specificity of mucosal antibodies in chronic inflammatory bowel disease. p. 46-50. *Chronic Inflammatory Bowel Disease*. Edit. E.F. Stange, Kluwer Academic Publishers (1994)
17. Stange, E.F., Modigliani, R., Peña, A.S., Wood, A.J., Feutren, G., Smith, P.R. and the European Study Group: European trial of ciclosporin in chronic active Crohn's disease: A 12 month study. *Gastroenterology*, im Druck

Intravesikale Immuntherapie des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms mit Bacillus Calmette-Guérin (BCG)

A. Böhle

Zusammenfassung

Die intravesikale Immuntherapie mit Bacillus Calmette-Guérin (BCG) ist ein klinisch etabliertes Behandlungsverfahren zur Reduktion der Rezidivhäufigkeit oberflächlicher Harnblasentumoren und zur Therapie des Carcinoma in situ. In mehreren vergleichenden Studien konnte die Überlegenheit dieses Verfahrens gegenüber der lokalen Chemotherapie nachgewiesen werden. Da die intravesikale Therapie mit BCG jedoch auf empirischen Grundlagen beruht, fehlten bisher systematische klinische Untersuchungen zu speziellen Problemsituationen. Hinsichtlich des Wirkmechanismus dieser Behandlungsform lagen nur wenige Informationen aus der Grundlagenforschung vor. Aus diesen Gründen sind in der vorliegenden Arbeit sowohl wichtige klinische Aspekte dieser Behandlung untersucht worden, als auch Beiträge zum immunologischen Wirkmechanismus erarbeitet worden.

Summary

Intravesical immunotherapy with Bacillus Calmette Guérin (BCG) is a clinically established treatment of superficial bladder carcinoma and carcinoma in situ of the bladder. Several comparative clinical studies could show the superiority of this treatment against local intravesical chemotherapy. However, as BCG therapy has been developed empirically, systematic clinical examinations are still lacking. With regard to the mode of action of this therapy, only limited information is available regarding basic research. For this reason, we are focusing on important clinical aspects of intravesical BCG immunotherapy and were able to establish important aspects with regard to the immunologic mode of action.

Klinik des oberflächlichen Urothelkarzinoms der Harnblase

Das Urothelkarzinom der Harnblase hat eine Häufigkeit von ca. 10/100.000 und ist Ursache für etwa 3,5 % aller Krebstodesfälle. Die überwiegende Mehrzahl der Tumoren (70-80 %) ist bei Diagnose-

stellung oberflächlich (Stadien pTa, pT1 und CIS), ca. 70 % der oberflächlichen Tumoren jedoch rezidivieren nach transurethraler Resektion, abhängig vom **Tumorstadium und Differenzierungsgrad**. Etwa 25 % der rezidivierenden Tumoren zeigen eine Verschlechterung von Tumorstadium oder Tumordifferenzierung im Rezidiv. Nach einer Erhebung des Tumorregisters der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen 1986 beträgt die korrigierte 5-Jahres Überlebensrate für das Tumorstadium pTa 95 % und für das Stadium pT1 G1-2 81 %, das Stadium pT1 G3 hat eine 5-Jahres Überlebensrate von 64 %. Eine Tumorprogression bei Rezidiv verschlechterte die Prognose im Stadium pTA auf 77,7 %, im Stadium pT1 G1-2 auf 78,6 % und im Stadium pT1 G3 auf 38,7 % [20]. Es wird somit ersichtlich, daß pT1-Tumoren, welche die lamina propria der Blasenwand überschreiten und somit ein invasives biologisches Potential aufweisen, eine besondere Risikogruppe darstellen. Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Prognose ist der Differenzierungsgrad (G) des Primärtumors: Bis zu 6 % der hoch differenzierten G1-Karzinome zeigen im Verlauf nach transurethraler Resektion eine Invasion in die Muskulatur der Blasenwand, während 22 - 52 % der mittelgradig differenzierten (G2) und 50 - 82 % der niedrig differenzierten G3-Tumoren invasiv werden können [10]. Ebenfalls konnte ein **primär multifokales Tumorwachstum** als ein schlechtes prognostisches Zeichen erkannt werden: Über 90 % selbst hoch differenzierter Tumoren zeigten ein Rezidiv innerhalb von 3 Jahren bei primär multifokalem Wachstum [4]. **Weitere prognostisch ungünstige Faktoren** stellen Tumorgöße > 5 cm, begleitende Urotheldysplasien und begleitendes Carcinoma in situ dar. Aus den oben genannten prognostischen Daten nach alleiniger transurethraler Resektion kann die derzeit anerkannte Indikation für eine intravesikale Rezidivprophylaxe (synonym: Metaphylaxe) oberflächlicher Harnblasentumoren abgeleitet werden (Tab. 1). Monofokale Primärtumoren des Stadiums pTa G1 bedürfen aufgrund des niedrigen Rezidiv- und Progressionsrisikos keiner Metaphylaxe. Wegen der hohen Progressionsneigung und Gefahr der

Stadium	Differenzierung	Rezidiv-Status	Indikation
pTA	G 1	Primär	<u>keine</u> Prophylaxe
	G 1		intraves. Prophylaxe
	G 2	Primär	intraves. Prophylaxe
	G 3	Primär	intraves. Prophylaxe
CIS	(immer G 3)	Primär	intraves. Therapie
pT1	G 1, G 2	Primär	intraves. Prophylaxe
	G 3	(Primär)	radikale Operation

Tabelle 1: Indikationen für eine intravesikale Rezidivprophylaxe

Metastasierung stellen Patienten mit pT1 G3-Tumoren eine Risikogruppe dar, welche am ehesten radikal operativ behandelt werden sollten – allerdings gehen die Meinungen hier, insbesondere beim Primärtumor, noch auseinander. Alle zwischen diesen beiden Extremen liegenden oberflächlichen Blasen Tumoren sollten nach transurethraler Resektion einer intravesikalen Rezidivprophylaxe unterzogen werden.

Klinische Ergebnisse der intravesikalen Instillationstherapie

Nach ausgedehnten tierexperimentellen Vorarbeiten berichten Morales et al. 1976 erstmals über die intravesikale Metaphylaxe des oberflächlichen Blasenkarzinoms mit BCG beim Menschen. Die Ergebnisse folgender Studien zeigten weiterhin den hohen therapeutischen Wert der Rezidivprophylaxe des oberflächlichen Urothelkarzinoms (Tab. 2) und ebenso der Therapie des Carcinoma in situ (CIS) der Harnblase (Tab. 3) mit BCG.

Autor	Anzahl Pat.	rezidivfrei
Brosman et al., 1984:	53	88 %
Morales et al., 1984:	46	50 %
deKernion et al., 1985:	22	64 %
Herr et al., 1985:	86	63 %
Lamm, 1984:	57	80 %
Haaff et al., 1986:	29	90 %
Lamm et al., 1987:	53	72 %
Bocon-Gibod et al., 1989:	47	64 %
Pagano et al., 1991:	133	74 %
Rübben et al., 1990:	67	89 %
Melekos et al., 1993:	94	68 %

Tabelle 2: Klinische Ergebnisse der intravesikalen Rezidivprophylaxe des oberflächlichen Urothelkarzinoms mit BCG

Die **Remissionsdauer** bei kurzer Nachuntersuchungszeit (< 2 Jahren) liegt bei ca. 70 %. Langzeitergebnisse verschiedener Autoren weisen allerdings auch auf eine lang persistierende Wirkung der BCG-Therapie hin: Bereits 1984 konnte Morales über eine anhaltende Rezidivfreiheit bei 48 % der Patienten mit zuvor bereits mehrfach rezidivierenden Tumoren 5 Jahre nach erstmaliger BCG Induktionstherapie berichten. Die Erfolge beim CIS lagen bei einer mittleren Nachbeobachtungszeit von > 4 Jahren bei 59 %. Sarosdy und Lamm erzielten Rezidivfreiheit bei 78 % der Patienten noch 5 Jahre nach nur einem Zyklus BCG. Coplen et al. berichteten 1990 über 64 % Rezidivfreiheit in einer Patientengruppe mit hohem Rezidivrisiko durchschnittlich 4 Jahren nach einem oder zwei Zyklen BCG [3].

Einen optimalen Vergleich der zur Verfügung stehenden Therapeutika untereinander bieten ver-

Autor	Anzahl Pat.	rezidivfrei
Herr et al., 1983:	23	74 %
Morales et al., 1984:	26	77 %
Brosman et al., 1984:	33	94 %
Lamm et al., 1985:	43	81 %
deKernion et al., 1985:	19	79 %
Herr et al., 1986:	47	72 %
Schellhammer et al., 1986:	28	71 %
Haaff et al., 1986:	19	68 %
Lamm et al., 1987:	77	75 %
Badalament et al., 1987:	33	67 %
Reitsma et al., 1989:	119	66 %
Brosman et al., 1989:	48	71 %
Enderli et al., 1989:	55	85 %
DeJager et al., 1991:	123	73 %

Tabelle 3: Klinische Ergebnisse der intravesikalen Therapie des Carcinoma in situ mit BCG

Autor	Therapie	Anzahl Pat.	rezidivfrei	Unterschied
Mori 1986 (SWOG):	BCG	88	81 %	
	ADM	83	46 %	p<0,001
Martinez-Pineiro 1990:	BCG	67	87 %	
	ADM	53	57 %	p<0,002
	Thiotepa	56	64 %	p<0,003
Lamm 1991: (pTa,pT1) (CIS)	BCG	63	37 %	
	ADM	68	17 %	p=0,015
	BCG	64	45 %	
	ADM	67	18 %	p<0,001
v.d. Meijden 1990:	BCG-RIVM	170	67 %	
	MMC	167	71 %	n.s.
Rintala 1989:	BCG	40	97 %	
	MMC	36	91 %	p<0,001
Lamm 1993:	BCG	190	81 %	
	MMC	187	67 %	p=0,0052

Tabelle 4: BCG versus Chemotherapeutika. Vergleichende randomisierte Studien (ADM = Adriamycin, MMC = Mitomycin C, n.s. = nicht signifikant)

gleichende prospektive, randomisierte Studien von BCG gegenüber diversen Chemotherapeutika. Erst in jüngerer Zeit wurden eine Reihe derartiger Untersuchungen ausgewertet und veröffentlicht (Tab. 4): Lamm und Mitarbeiter wiesen in einer multizentrischen randomisierten Studie die lang anhaltende therapeutische Überlegenheit von BCG gegenüber Adriamycin sowohl für oberflächliche papilläre Blasenkarzinome, als auch für das Carcinoma in situ nach. Die mittlere Zeit bis zum Rezidiv nach BCG lag bei 22,5 Monaten für pTa und pT1 Tumoren und bei 39 Monaten für das CIS (nach Adriamycin: 10,4 resp. 5,1 Monate). Eine weitere aktuelle Studie von Lamm und Mitarbeitern der Southwest Oncology Group (SWOG) in den USA wurde bei der Interims-Analyse aus ethischen Gründen abgebrochen, da sich vorzeitig ein eindeutiger Vorteil von BCG gegenüber Mitomycin dargestellt hatte [12].

Die therapeutische Effektivität von BCG zur Rezidivprophylaxe des oberflächlichen Urothelkarzinoms und zur Therapie des Carcinoma in situ der Harnblase sowie der Vorteil gegenüber der intravesikalen Chemotherapie darf somit als hinreichend gesichert angesehen werden.

Praxis der intravesikalen Instillation

150 mg BCG (z. B. Stamm Connaught) entsprechend ca. $7,5 \times 10^8$ lebenden Keimen werden sus-

pendiert in 50 ml physiologischer Kochsalzlösung und über einen 12 Charr. Einmalkatheter vorsichtig in die Blase instilliert. Das Instillat verbleibt 2 Stunden in der Blase. Jeder Patient erhält insgesamt 6 Instillationen in wöchentlichen Abständen. Klinische Kontrolluntersuchungen erfolgen in 3-monatlichen Abständen, in Einzelfällen auch bereits 24 Stunden nach der 6. Instillation. Es werden hierbei eine Zystoskopie mit Entnahme einer Zytologie und Entnahme von Quadrantenbiopsien durchgeführt.

Eigene Untersuchungen zum Wirkmechanismus der intravesikalen Immuntherapie mit BCG

Mit Einführung der intravesikalen Rezidivprophylaxe des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms mit BCG an der Klinik für Urologie im Dezember 1986 erfolgte der Aufbau eines Forschungsprojektes zur Untersuchung des Wirkmechanismus dieser Immuntherapie. Hierzu wurde im Forschungsinstitut Borstel eine Arbeitsgruppe etabliert, welche sich seither intensiv mit den im folgenden genannten immunbiologischen Fragen zur onkologischen BCG-Therapie beim Menschen beschäftigte. Parallel zu diesem immunbiologischen Ansatz wurden klinische Untersuchungen zum therapeutischen Erfolg und zum Nebenwirkungsprofil dieser adjuvanten Behandlung durchgeführt. Die hieraus erhobenen Daten wurden zur Verbesserung der The-

rapie, sowie zur Ausdehnung auf neue Indikationsbereiche angewendet.

Hinsichtlich der Untersuchungen zum Wirkmechanismus wurde zunächst die lokale Immunantwort in der Harnblase durch Analyse infiltrierender zellulärer Subpopulationen und lokal nachweisbarer Zytokine, sowie durch Untersuchung des Patientenurins hinsichtlich der Zytokinsekretion dargestellt. Auf diese Weise wurde eine Charakterisierung sowohl der akuten als auch der langfristig persistierenden lokalen Immunantwort des Patienten auf die intravesikale Immuntherapie möglich. In anschließenden Untersuchungen *in vitro* erfolgte schrittweise die Dissektion dieser komplexen Immunantwort hinsichtlich beteiligter zytotoxischer Effektormechanismen sowie deren detaillierte Charakterisierung.

Immunhistologische Untersuchungen der Harnblase

Nachweis immunkompetenter Zellen in der Blasenwand

Vor Therapie zeigten die Biopsien aus den nicht tumortragenden Anteilen der Blase eine nur geringe Präsenz mononukleärer Zellen. Diese waren überwiegend unmittelbar suburothelial angeordnet, das Urothel war weitgehend frei von Entzündungszellen. Hinsichtlich der T-Zell-Subpopulationen zeigte sich eine etwas geringere Anzahl CD4⁺ (sog. T-Helfer) Zellen (Abb. 1) im Vergleich zu den CD8⁺ (sog. T-Suppressor) Zellen. Das Verteilungsmuster der T-Suppressor-Zellen war gleich. Das lokale T-Helfer/T-Suppressor-Zell Verhältnis in der Blasenwand vor Therapiebeginn betrug etwa 1:2. Makrophagen fanden sich ebenfalls vor Therapiebeginn vereinzelt diffus verteilt im suburothelialen Stroma.

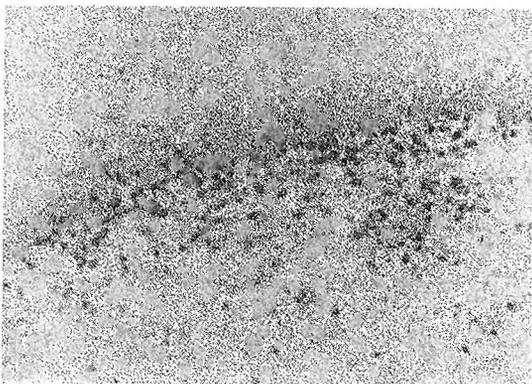


Abb. 1: Blasenbiopsie vor BCG-Therapie. Vereinzelter Nachweis von CD4⁺-T-Helfer Zellen suburothelial (200 x).

Nach der 6. Instillation von BCG zeigte sich eine heftige entzündliche Reaktion der gesamten Blasenwand. Mononukleäre Zellen und segmentkernige Granulozyten infiltrierten überwiegend die Submukosa, waren aber auch im Urothel und in der Muskulatur feststellbar. Das Urothel war abgeflacht, bildete jedoch eine vollständige Schicht mit intakter Basalmembran. In allen Biopsien waren unter der Therapie entstandene Aggregate immunkompetenter Zellen nachweisbar, welche den sogenannten BCG-induzierten Granulomen entsprachen (Abb. 2). Diese follikel-ähnlichen Struk-

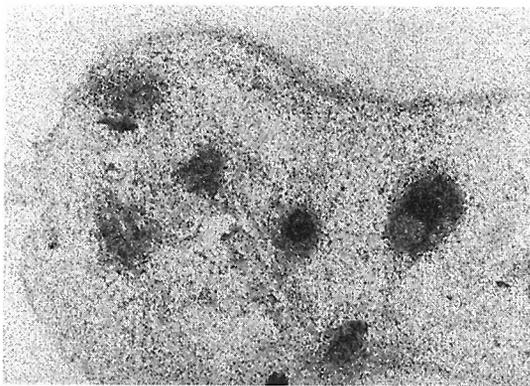


Abb. 2: Granulombildung nach BCG-Therapie: Auftreten multipler atypischer Granulome im Blasenstroma nach BCG-Therapie. Biopsie-Entnahme 24h nach 6. Instillation, Färbung gegen T-Suppressor Zellen (100 x).

turen fanden sich nahezu ausschließlich in der gefäßreichen Submukosa, nur ganz vereinzelt waren lymphozytäre Zellhaufen auch zwischen Muskelfaserbündeln zu sehen. Die Basalmembran sowie das Urothel oberhalb der Granulome waren lichtmikroskopisch unauffällig. Das mononukleär-zellige Infiltrat der Blasenwand bestand nach Beendigung der intravesikalen BCG-Therapie überwiegend aus T-Zellen, mit deutlicher Prädominanz der CD4⁺ (sog. T-Helfer/Inducer) -Zellen gegenüber den CD8⁺ (sog. T-Suppressor/Zytotoxizitäts) -Zellen im Granulom (Abb. 3). Der Quotient submukös nachweisbarer CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen lag bei 2:1, entsprechend einer Umkehrung des ursprünglichen Verhältnisses in der normalen Blase.

Die Expression von Aktivierungsmarkern war in den kurzfristig nach BCG-Therapie gewonnenen Biopsien am ausgeprägtesten: Interleukin-2-Rezeptor (IL-2-R) - positive Zellen waren innerhalb von Granulomen zu finden, während das MHC Klasse-II-Antigen HLA-DR ausgesprochen stark auf nahezu allen mononukleären Zellen innerhalb

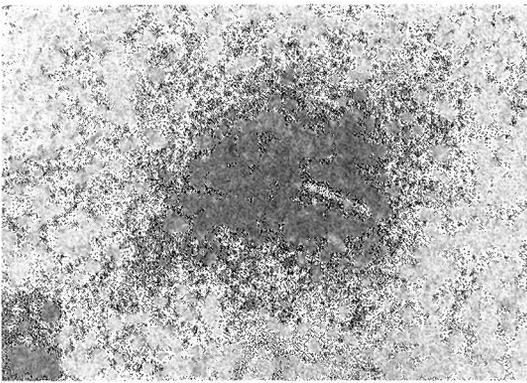


Abb. 3: T-Helfer Zellen im Granulom nach BCG-Therapie. Suburotheliales Granulom in Biopsie 24h nach 6. Instillation, überwiegend bestehend aus T-Helfer Zellen. Serieller Schnitt zum Vergleich in Abb. 9 Färbung gegen T-Suppressor Zellen (200 x).

und außerhalb der Granulome exprimiert wurde. Interessanterweise wurde dieses Antigen in der 6. Woche nach BCG-Therapie ebenfalls vom Urothel exprimiert.

3 Monate nach Therapiebeginn konzentrierte sich das zelluläre Infiltrat aus T- und B-Zellen auf die persistierenden Follikel. Die Expression von Antigenen, welche mit der Aktivierung bestimmter Zellpopulationen assoziiert sind, persistierte überwiegend innerhalb follikulärer Strukturen: HLA-DR wurde weiterhin stark von einem Großteil der hier lokalisierten Zellen exprimiert, das Urothel exprimierte kein Klasse-II-Antigen mehr zu diesem oder einem späteren Zeitpunkt. IL-2-Rezeptor-positive Zellen waren über einen längeren Zeitraum nachweisbar. Die genannten immunhistologischen Charakteristika blieben auch zu den späteren Untersuchungszeitpunkten 6, 9 und 12 Monate nach Therapiebeginn erhalten. Die semi-quantitative Analyse der diversen Zellpopulationen zeigte einen charakteristischen Verlauf (Abb. 4): Aktivierte, HLA-DR exprimierende Zellen waren maximal nach 6 Wochen des BCG-Induktionszyklus vermehrt, anschließend war ein langsamer Rückgang IL-2-R-exprimierender Zellen zu verzeichnen. Die Zahl der HLA-DR-positiven Zellen blieb nach 3 Monaten im wesentlichen konstant. Die absolute Zahl der T-Zellen zeigte ein Maximum nach 3 Monaten, verbunden mit einem Rückgang der T-Suppressor/Zytotoxizitäts-Zellen in der Folgezeit und konstantem Verlauf der T-Helfer-Zellen. Aufgrund dieser Verschiebung war das Verhältnis der lokalen T-Helfer/T-Suppressor-Zellen auch in den Untersuchungen ein Jahr nach

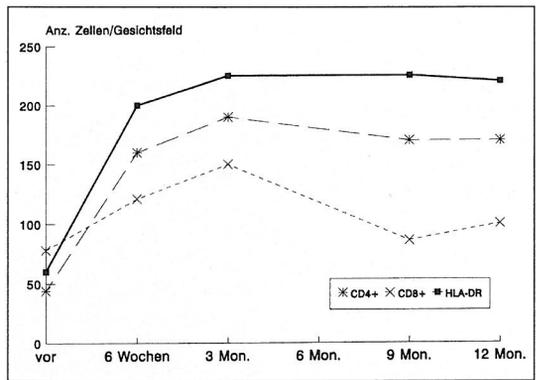


Abb. 4: Zeitlicher Verlauf HLA-DR exprimierender Zellen in der Blasenwand vor und nach BCG Induktionszyklus. Erhebliche Steigerung der Zellzahl pro Gesichtsfeld durch BCG-Induktionszyklus, über 1 Jahr nur geringe Rückbildung dieser Reaktion. Darstellung des Verlaufs der CD4+ und CD8+-T-Zellen im Vergleich.

Therapie noch deutlich zugunsten des T-Helfer-Phänotyps erhöht.

Diese charakteristische Immunantwort zeigte sich überwiegend in Biopsien von Patienten, welche vierteljährliche Auffrischungs-Instillationen erhielten. In Biopsien von Patienten 9 und 12 Monate nach einem alleinigen BCG-Induktionszyklus ohne Auffrischung fand sich ein deutlich geringeres mononukleäres Infiltrat im Vergleich zu Patienten mit Auffrischungsbehandlungen. Nach der sechsten BCG-Instillation ließen sich wieder die ausgeprägten Veränderungen nachweisen: Eine intensive Färbung gegen die untersuchten Zytokine IL-1, IL-2 und TNF konnte in nahezu allen Biopsien dargestellt werden (Abb. 5). Im weiteren Verlauf war eine Rückbildung der initial ausgeprägten Immunreaktion darstellbar: Nur etwa die Hälfte der Biopsien zeigte noch IL-1 bzw. TNF-positive Zellen, während die überwiegende Anzahl der untersuchten Patienten noch eine Reaktion gegen IL-2 aufwies. Auch die Anzahl IL-2-Rezeptor positiver Zellen pro mikroskopischem Gesichtsfeld war rückläufig. Insgesamt zeigte die histologische Untersuchung nach BCG-Therapie eine ausgeprägte Immunreaktion hinsichtlich der untersuchten Zytokine IL-1, IL-2 und TNF sowie hinsichtlich IL-2-Rezeptor-exprimierender Zellen, welche ihr Maximum unmittelbar nach der 6. Instillation von BCG hatte. In weiteren Biopsien konnte eine Rückbildung dieser initial ausgeprägten Reaktivität nachgewiesen werden. Eine gewisse Plateaubildung ist bis zu 12 Monaten nach der Therapie festzustellen, sowohl was die Anzahl pro

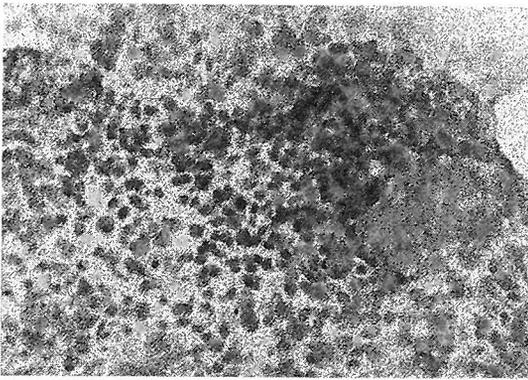


Abb. 5: Nachweis der IL-2 Reaktion. Interleukin-2 positive Zellen in einem Granulom unmittelbar suburothelial in Biopsie 24 Stunden nach 6. BCG Instillation (330 x).

sitiver Biopsien, als auch die Ausprägung der Reaktion auf mikroskopischer Ebene betrifft. Anschließend ist ein weiterer Rückgang der Immunreaktion zu verzeichnen, bis 24 Monate nach der initialen Behandlung nur noch eine sehr gering ausgeprägte Aktivierung bei wenigen Patienten feststellbar ist. Diese „Plateaubildung“ der Immunaktivierung könnte wiederum in Zusammenhang mit der bis zum Ablauf eines Jahres erfolgten Erhaltungstherapie durch einmalige Instillation von BCG stehen, welche die Patienten jeweils nach einem Nachuntersuchungstermin erhielten.

Zytokinbestimmungen im Urin BCG-behandelter Patienten

Innerhalb von 24 Stunden nach BCG-Instillation konnte eine erhebliche Sekretion der Zytokine IL-1, IL-2 und TNF- α in den Urin sowohl in biologischen Assays als auch in ELISAs festgestellt werden. Nach der Instillation von BCG differierten die Zytokinwerte im Urin zwischen einzelnen Patienten erheblich sowohl bezüglich des zeitlichen Maximums als auch bezüglich der Höhe der gesamten 24-Stunden Ausscheidung. Bereits 2 Stunden nach Instillation von BCG konnten signifikant erhöhte Werte mit einem Maximum nach 2-8 Stunden im ELISA nachgewiesen werden, während im Bio-Assay nur ein kurzer Gipfel 4 Stunden nach Instillation feststellbar war. Die erhöhten Titer fielen innerhalb von 24 Stunden auf Normwerte zurück. Der Vergleich der kumulativen 24-Stunden Ausscheidung zeigte einen erheblichen Unterschied zwischen den Ergebnissen des Bio-Assays (5 von 10 Patienten ohne biologische IL-2 Aktivität) und den Ergebnissen aus den ELISAs (hoher Titer bei allen 10 Patienten nachweisbar). In der Kontroll-

gruppe war lediglich bei einem Patienten eine geringe Menge IL-2 im Urin mittels ELISA nachweisbar. Der Vergleich beider Gruppen zeigte einen hochsignifikanten Unterschied zwischen der BCG-behandelten und der Kontroll-Gruppe bezüglich der im ELISA gemessenen IL-2 Werte ($p < 0,005$). Eine ausgeprägte Zytokin-Sekretion konnte für TNF festgestellt werden. Die stark erhöhten Zytokinwerte persistierten allerdings nur kurzfristig für eine Periode von 2 bis 4 Stunden nach Instillation. Geringe Titer von TNF wurden in der Kontrollgruppe lediglich bei 2 Patienten mit unbehandeltem Blasenkarzinom gefunden. Der Unterschied zwischen der BCG- und der Kontroll-Gruppe war für beide Assays statistisch signifikant (jeweils $p < 0,01$).

Dissektion der Immunantwort: In vitro Analyse zytotoxischer Effektormechanismen gegen Urothelkarzinomzellen

Die zuvor beschriebene Reaktion stellt eine komplexe Immunantwort des Körpers auf die lokale BCG-Therapie dar. Die weitere Analyse der hier dargestellten Phänomene als mögliche Effektormechanismen gegen das Blasenkarzinom erforder-

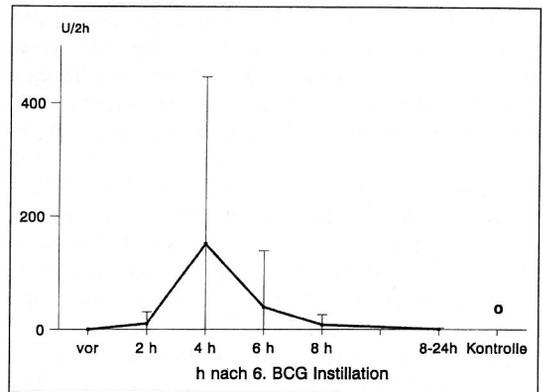


Abb. 6: Urintiter von IL-2 (Bioassay). Die Titer von IL-2 im Urin, gemessen im biologischen Assay, zeigen einen kurzen Anstieg der biologischen Aktivität 4 Stunden nach 6. Instillation. Kein Nachweis von IL-2 in der Kontrollgruppe.

te die Dissektion dieser Immunantwort in mehrere einzelne Ereignisse, welche weitgehend unabhängig voneinander in vitro untersucht werden.

Direkte zytotoxische Aktivität von BCG: Die Inkubation ansteigender Konzentrationen von BCG mit den 4 Zielzelllinien und der Kontrollzelllinie zeigte keine signifikante Zytotoxizität. Nur in hohen Konzentrationen $> 10^7$ cfu/ml konnte ein ge-

ringes Ausmaß einer direkten BCG-Toxizität festgestellt werden (spez. Zell-Lyse <6%). Es konnte somit geschlossen werden, daß unter den bekannten klinischen Bedingungen kein direkter zytotoxischer Effekt von BCG auf Blasenkarzinomzellen vorhanden ist.

Zytotoxizität durch unstimulierte mononukleäre Zellen: Die zytotoxische Aktivität frisch isolierter mononukleärer Zellen wird als Natürliche Killer (NK)-Zell Zytotoxizität bezeichnet. Um die Sensitivität unserer 5 Blasenkarzinom-Zelllinien zu untersuchen, wurden diese mit unstimulierten frisch gewonnenen PBMNZ koinkubiert und mit der Zielzell-Sensitivität von K562-Zellen verglichen, welche bekanntermaßen eine ausgeprägte Empfindlichkeit gegen NK-Zellen aufweisen. Alle Urothelkarzinom-Zelllinien waren gegenüber NK-Zellen nahezu resistent, während K562-Zellen in demselben Experiment eine ausgeprägte Sensitivität aufwiesen (Abb. 7).

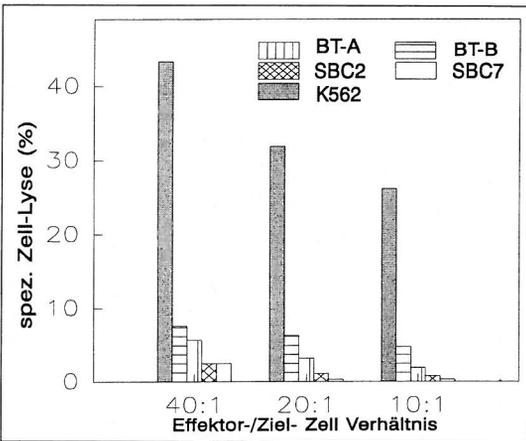


Abb. 7: Natürliche-Killer (NK) Zell Sensitivität von Blasenkarzinomzellen. Resistenz von Blasenkarzinom-Zielzelllinien gegenüber Natürlichen Killer (NK)-Zellen. K562-Zellen zeigen eine erhebliche Sensitivität gegen NK-Zellen.

Zytotoxizität durch Lymphokin-aktivierte Killer (LAK) Zellen: Da IL-2 sowohl im Urin als auch in der Blasenwand nach BCG nachweisbar war, erschien die Möglichkeit einer IL-2 induzierten Lymphokin-aktivierten Killer Zell-Generation gegeben. Im Folgenden wurde deshalb die Zytotoxizität von LAK-Zellen gegen Blasenkarzinomzellen überprüft. Es konnte eine ausgeprägte Zytotoxizität in PBMNZ durch IL-2 und IFN γ , nicht jedoch durch TNF α induziert werden (Abb. 8).

Zytotoxizität durch BCG-aktivierte (BAK) Zellen: Zur Darstellung weiterer BCG-induzierter Ef-

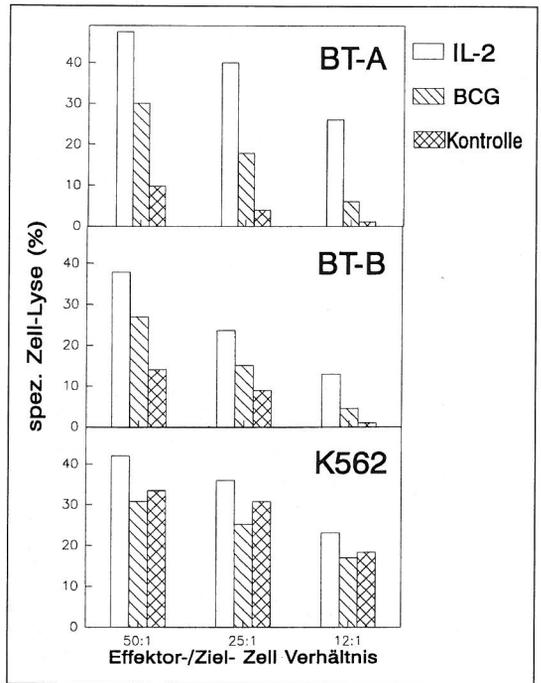


Abb. 8: Zytotoxizität von PBMNZ nach 7-tägiger Stimulation mit BCG. BCG-induzierte Zytotoxizität in PBMNZ gegen Urothelkarzinom- und K562-Zielzellen: Die Zytotoxizität von PBMNZ gegen BT-A- und BT-B-Zellen, nicht jedoch gegen K562-Zellen, kann durch die Stimulation mit BCG gesteigert werden. Die IL-2-induzierte LAK-Zell Zytotoxizität ist hingegen hocheffektiv gegen alle Zielzellen.

fekte auf auch in der Blasenwand nachweisbare immunkompetente Zellen wurde die Aktivierung von mononukleären Zellen durch BCG überprüft: Nach Vorinkubation von PBMNZ mit BCG über mehrere Tage konnte ein erhebliches Ausmaß an Zytotoxizität gegen alle fünf NK-resistenten Transitionalzell-Karzinomlinien induziert werden, während die nicht stimulierten mononukleären Zellen im gleichen Versuch wiederum nur gegen die NK-sensitive Kontrollzelllinie K562 zytotoxisch waren. Diese BCG-induzierte Zytotoxizität wurde mit der LAK-Zell Zytotoxizität verglichen, welche durch Vorinkubation von mononukleären Zellen mit IL-2 induziert werden kann. Die LAK-Zellen zeigten eine höhere Zytotoxizität gegen Blasenkarzinomzellen als BCG-aktivierte PBMNZ. BCG-aktivierte mononukleäre Zellen wiesen jedoch ein deutlich höheres Ausmaß an Zytotoxizität auf als unstimulierte PBMNZ (Kontrolle). Wir nannten dieses offensichtlich eigenständige BCG-aktivierte Killerzellphänomen „BAK“ Aktivität (Abb. 8).

Wie oben dargestellt, konnte die natürliche Zytotoxizität unstimulierter PBMNZ gegen K562-Zellen durch IL-2, nicht jedoch durch BCG gesteigert werden, so daß ein unterschiedliches Zielzellmuster von LAK- und BAK-Zellen wahrscheinlich ist. Weitere Versuche zeigten, daß nur lebendes, nicht jedoch intaktes abgetötetes BCG oder zellfreies Sonifikat in der Lage war, BAK-Zellen zu induzieren.

Diskussion

Die intravesikale Instillation von BCG zur Rezidivprophylaxe des oberflächlichen Blasenkarzinoms ist eine relativ komplikationsarme Behandlungsform, die in der Regel ambulant durchgeführt werden kann. In einer multizentrischen Studie mit 1.278 Patienten war eine Hospitalisation nur bei 2 % der Fälle nötig [14].

Während zur Frage des Wirkmechanismus von BCG einerseits ein eher unspezifischer Effekt im Sinne einer erodierenden Zystitis als therapeutisches Moment der BCG-Wirkung vermutet wurde [5], konnten andere Autoren eine Beteiligung des Immunsystems nachweisen: Ein pathohistologischer Unterschied im zellulären Infiltrat nach lokaler Instillation von Thiotepa und BCG wurde von Guinan et al. festgestellt [8]. Sie postulierten einen T-Zell abhängigen Wirkmechanismus, welcher von Ratliff et al. bewiesen werden konnte: Athymische Nacktmäuse ohne T-Zellbildung waren nicht in der Lage, eine BCG-induzierte Tumrorabwehr aufzubauen, während dies nach Transfer syngener T-Lymphozyten möglich war [18]. In histologischen Studien beim Menschen [6] und im Tierversuch wurden charakteristische Veränderungen durch BCG nachgewiesen: Ansammlungen mononukleärer Zellen traten als Antwort auf die mykobakterielle Infektion auf, welche üblicherweise als Granulome bezeichnet wurden. In der Blasenwand überwogen T-Lymphozyten, vorwiegend vom T-Helfer-Phänotyp, nach einem Therapiezyklus mit BCG. Die genannten Forschungsergebnisse konnten durch die eigenen Untersuchungen bestätigt und erweitert werden, in denen die erhebliche Akkumulation mononukleärer Zellen als Antwort auf die lokale BCG Infektion nachgewiesen wurde. Diese entzündliche Immunantwort unterscheidet sich jedoch erheblich sowohl in ihrer zeitlichen Ausdehnung, als auch in qualitativer Hinsicht von einer unspezifischen Zystitis. Während sich bei der unspezifischen und auch der Zytostatika – induzierten Zystitis eine granulozytäre Infiltration findet [8], sahen wir und andere nach BCG neben der ebenfalls kurzfristig vorhandenen granulozytären Reaktion eine erhebliche lokale Infiltration mit

mononukleären Zellen. Einhergehend mit dieser quantitativen ist auch eine qualitative Veränderung festzustellen: Entsprechend den Untersuchungen von Gardiner et al. in der normalen Blase [7] und auch den eigenen Ergebnissen vor Instillation von BCG zufolge, überwiegen normalerweise T-Suppressor/Zytotoxizitäts-Zellen in der Blasenwand. Nach einem Zyklus BCG jedoch ist die absolute Zahl mononukleärer Zellen erheblich angestiegen und es überwiegen nun T-Helfer Zellen mit einem T-Helfer/T-Suppressor Zell-Verhältnis von 2:1. Dieses charakteristische Infiltrat persistiert vorwiegend in Granulomen über mindestens 12 Monate, was als ein weiterer Hinweis für die Fortdauer der lokalen Immunantwort innerhalb dieser BCG-induzierten Ansammlungen immunkompetenter Zellen zu werten ist. Die persistierende Expression des Klasse-II Antigens HLA-DR auf nahezu allen mononukleären Zellen nach BCG-Behandlung und ebenfalls für eine kurze Zeit auf Urothelzellen ist ein mögliches Zeichen anhaltender zellulärer Aktivierung und Antigenpräsentation.

In Zusammenhang mit der klinischen Anwendung von BCG und der Frage einer Erhaltungstherapie erscheint die Beobachtung interessant, daß die genannten Zeichen einer lang anhaltenden Immunaktivierung sehr viel deutlicher bei Patienten mit regelmäßigen dreimonatlichen Auffrischungsinstitutionen auftraten. Insbesondere bei den immunhistologischen Untersuchungen zur lokalen Zytokinproduktion war ein plateau-artiger Verlauf der nachweisbaren Aktivierung festzustellen. Der klinische Wert von Boosterinstillationen oder einer Erhaltungstherapie konnte jedoch erst in jüngerer Zeit durch oben genannte Untersuchung und eine weitere multizentrische Studie aus den USA geklärt werden [13]. Es deuten somit nicht nur die vorgenannten klinischen Ergebnisse, sondern auch die immunhistologischen Untersuchungen auf einen Vorteil von Auffrischungsbehandlungen hin. Als ein weiteres Merkmal der lokalen Aktivierung wurde die Immunreaktivität gegen die Zytokine IL-1, IL-2 und TNF in der Blasenwand histologisch bewertet. Die untersuchten Zytokine konnte bei allen BCG-behandelten Patienten nachgewiesen werden, während sie nicht in der Kontrollgruppe darstellbar waren.

Zusammenfassend muß eine komplexe lokale Immunantwort mit Beteiligung humoraler und zellulärer Immunmechanismen auf die BCG Infektion festgestellt werden. Die langfristigen Untersuchungen nach BCG zeigen ein Überwiegen der T-Helfer/Inducer-Zellpopulation. Die beschriebene subklinische lokale Entzündung und die beteilig-

ten Immunmechanismen persistieren langfristig im sogenannten BCG-induzierten Granulom, welchem somit eine entscheidende Rolle beim rezidivfreien Status des Patienten zukommen könnte.

In den Untersuchungen zum **Zytokin-Nachweis im Urin nach intravesikaler BCG-Therapie** wurden die zuvor beschriebenen Ergebnisse bezüglich der IL-2 Sekretion bestätigt und weiterhin erstmalig die Sekretion der Zytokine IL-1- β und TNF- α in den Urin von Patienten nach BCG beschrieben. IL-1 wurde bereits im Urin von gesunden und febrilen Probanden nachgewiesen [11]. Die starke Sekretion von IL-2 und TNF- α nach BCG-Behandlung stellt jedoch eine im Vergleich zur unspezifischen Zystitis qualitativ andersartige Reaktion dar. Weder IL-2 [9], noch TNF- α wurden im Urin Gesunder gefunden und nur in wenigen Ausnahmen war IL-2 bei Patienten mit unspezifischer Zystitis nachweisbar [9]. IL-2 wird überwiegend von aktivierten T-Helfer-Zellen produziert. Es wirkt spezifisch bei der Proliferation und Differenzierung von T-Lymphozyten. Ein Effekt auf Tumorzellen wird vorwiegend über die Generation von Lymphokin-aktivierten-Killerzellen (LAK-Zellen) ausgeübt, was in jüngerer Zeit als neue Behandlungsform fortgeschrittener menschlicher Karzinome auch klinisch angewendet worden ist [19]. Ein ausgeprägter Anstieg der Urintiter nach BCG-Therapie ließ sich insbesondere für TNF- α nachweisen. TNF- α wird überwiegend von aktivierten Makrophagen gebildet und besitzt neben anderen Effekten sowohl eine direkte zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen als auch auf die Vaskularisierung von Tumoren, makroskopisch als hämorrhagische Nekrose imponierend [16]. Die durch BCG induzierte lokale Konzentration von TNF im Urin ist prinzipiell hoch genug, um einen zytotoxischen Effekt auf Tumorzellen zu erzielen, ohne daß hierbei systemische Nebenwirkungen auftreten müssen. Ob dieser Mechanismus allerdings tatsächlich zum antitumoralen Effekt von BCG bzw. zur Verlängerung des rezidivfreien Intervalls beiträgt, konnte erst in weiteren *in vitro* Untersuchungen geklärt werden. Zusammengefaßt ließ sich eine außerordentlich starke Produktion der untersuchten Zytokine als Antwort auf die intravesikale BCG-Therapie nachweisen. Die in den Urin ausgeschiedenen Zytokine spiegeln den heftigen lokalen Entzündungsprozeß wider und könnten somit auch für die Vorhersage des klinischen Erfolges der intravesikalen BCG-Immuntherapie herangezogen werden.

Durch vorgenannte Untersuchungen war eine weitgehende qualitative und quantitative Charakterisierung der lokalen Immunantwort auf die in-

travesikale BCG-Therapie beim Menschen, sowie ihre klare Unterscheidung zur unspezifischen Zystitis erfolgt. Zur Beantwortung der hierbei aufgeworfenen Fragen und zur weiteren Erforschung des Wirkmechanismus auf zellulärer Ebene erfolgte die Analyse einzelner immunbiologischer Phänomene *in vitro*. Unsere Ergebnisse zeigen jedoch, daß die Zytokine selbst nicht zu den relevanten Effektormechanismen gegen urotheliale Karzinomzellen gehören. Die Effektivität von IL-2 induzierten LAK-Zellen gegenüber den NK-resistenten Blasenkarzinom-Zelllinien wurde durch die dargestellten Untersuchungen bestätigt. Die LAK-Zell Zytotoxizität kann somit als einer von mehreren möglichen Wirkmechanismen der BCG-Therapie angesehen werden. In den folgenden Untersuchungen konnten wir einen weiteren Effektormechanismus charakterisieren, welchen wir die BCG-aktivierte Killer (BAK) Zelle nannten. Im Gegensatz zu den LAK-Zellen zeigten diese BAK-Effektorzellen keine Verstärkung der NK-Zytotoxizität gegen K562-Zellen und weisen so auf ein unterschiedliches Zielzellmuster hin, da LAK-Zellen höchst effektiv gegen K562-Zellen wirken. Weiterhin weist die Zytotoxizität von LAK-Zellen nach Stimulation mit IL-2 ein bekanntes Maximum nach 2-3 Tagen auf, während die BAK-Zell Zytotoxizität bis zum Tag 7 ansteigt. Im Gegensatz zur BAK-Zelle ließen sich LAK-Zellen auch aus CD4⁺ oder CD8⁺-depletierten Zellpopulationen generieren. Aufgrund dieser Unterschiede kann geschlossen werden, daß BAK-Zellen eine andere Zellpopulation darstellen und über einen anderen Weg als LAK-Zellen aktiviert werden.

Zusammenfassend konnte in unseren *in vitro*-Experimenten gezeigt werden, daß weder Zytokine, noch unstimulierte mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut, noch BCG allein in der Lage sind, eine zytotoxische Aktivität auf Blasenkarzinomzellen auszuüben. Viablen BCG hingegen vermag PBMNZ zu einer ausgeprägten Killerzellaktivität zu stimulieren, welche in ihrem Ausmaß der LAK-Zell Aktivität nahekommt. Die weitere Charakterisierung sowohl der Effektorzellen dieser BAK-Zytotoxizität als auch ihre Induktionsbedingungen und ihr Aktivierungsweg erfolgte konsequenterweise als nächster Schritt unserer Untersuchungen. Wir konnten nachweisen, daß weder Makrophagen noch CD4⁺ T-Zellen als Effektorzellen in Frage kommen, während T-Zellen, welche CD8⁺- und CD56⁺-Antigene auf ihrer Oberfläche exprimieren, verantwortlich für diese BCG-induzierte Zytotoxizität sind. Diese Ergebnisse stehen im Einklang sowohl mit *in vitro* Langzeitkulturen zytotoxischer LAK-Zellen, in welchen genau dieser Phä-

notyp überwiegt und mit *in vivo* Ergebnissen, in welchen nur die auf die Therapie ansprechenden Tumoren IL-2-behandelter Patienten eine deutliche Infiltration mit CD8⁺ Zellen zeigten [2]. Darüber hinaus ist bekannt, daß CD56⁺-Zellen die vorwiegende LAK-Effektor-Zelle aus dem peripheren Blut unter der systematischen Hochdosis-Therapie mit IL-2 bei metastasierten Karzinomen darstellen [21]. Im Gegensatz zum Effektormechanismus sind für die Induktion der BAK-Zytotoxizität offensichtlich alle auch in der Blasenwand nachweisbaren mononukleären Subpopulationen von Bedeutung, da sowohl die Depletion von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen, als auch die Depletion von Makrophagen konzentrationsabhängig eine BAK-Zell-Generation verhinderte.

Diese Versuche wurden durch Ratliff et al. im Tiermodell bestätigt, die mit immunkompetenten Mäusen nachwies, daß die Depletion sowohl von CD4⁺- als auch von CD8⁺-Zellen den BCG-induzierten antitumoralen Effekt auf implantierte Blasenkarzinomzellen vollständig inhibierte [17]. In diesem System schienen CD4⁺-Zellen nötig zur Entstehung der Immunantwort vom verzögerten Typ zu sein.

Es konnte somit *in vivo* eine ausgeprägte lang anhaltende lokale Immunaktivierung durch BCG gezeigt werden, aus der sich *in vitro* mehrere zytotoxische Effektormechanismen darstellen ließen: Neben der durch IL-2 induzierbaren Lymphokinaktivierten Killer-Zell-Zytotoxizität ließ sich gegen die ansonsten erstaunlich widerstandsfähigen Blasenkarzinomzellen ein weiteres zytotoxisches Phänomen darstellen, welches als das BCG-aktivierte Killer (BAK) Zell-Phänomen bezeichnet wurde. Diese BAK-Zytotoxizität konnte eindeutig vom LAK-Zell-Phänomen unterschieden werden. Die weitere Charakterisierung des BAK-Phänomens zeigte eine klar zu isolierende Effektorzell-Population, welche CD8⁺CD56⁺ war. Zur Induktion der BAK-Zytotoxizität waren hingegen alle zuvor in der Blasenwand nachweisbaren mononukleären Zellen nötig.

Insgesamt erscheint ein derartiger Forschungsansatz zur Aufklärung des Wirkmechanismus einer Immuntherapie aus mehreren Gründen sinnvoll:

Durch die initiale Charakterisierung der beim Patienten induzierten Therapieeffekte und die anschließende Dissektion dieser komplexen Immunantwort *in vitro* hinsichtlich relevanter zytotoxischer Mechanismen können begleitende, nicht für die Tumorabwehr entscheidende Reaktionen als Epiphänomene erkannt werden. Hierdurch ist die Möglichkeit gegeben, regulierend einzugreifen.

Durch Inhibition unnötiger Epiphänomene könnten Nebenwirkungen reduziert werden, ohne die Wirkung zu beeinträchtigen. Die Verringerung der überschießenden initialen unspezifischen Entzündungsreaktion wäre eine derartige therapeutische Möglichkeit. Auf der anderen Seite können Ansätze, welche mit der antitumoralen Wirkung interferieren, als solche erkannt werden, bevor sie in die Therapie des Patienten übernommen werden. Als ein Beispiel sei hierzu auf den Einsatz von INH zur Verringerung lokaler Nebenwirkungen verwiesen: Nachgewiesen durch die Bedeutung der Viabilität von BCG bei der BAK-Zell-Generation ist davon auszugehen, daß eine derartige Behandlung die therapeutische Effektivität erheblich reduzieren würde.

Literatur

1. Böhle, A., Nowc, C., Ulmer, A. J., Musehold, J., Gerdes, J., Hofstetter, A. G., Flad, H.-D.: Elevations of cytokines interleukin-1, interleukin-2, and tumor necrosis factor in the urine of patients after intravesical Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy. *J Urol* 144: 59-64 (1990)
2. Cohen, P. J., Lotze, M. T., Roberts, J. R., Rosenberg, S. A., Jaffe, E. S.: The immunopathology of sequential tumor biopsies in patients treated with interleukin-2. *Am J Pathol* 129: 208-216 (1987)
3. Coplen, D. E., Marcus, M. D., Myers, J. A., Ratliff, T. L., Catalona, W. J.: Long-term follow up of patients treated with 1 or 2, 6-week courses of intravesical Bacillus Calmette-Guérin: Analysis of possible predictors of response free of tumor. *J Urol* 144: 652-657 (1990)
4. Cutler, S. J., Heney, N.M. and Friedell, G.W.: Longitudinal study of patients with bladder cancer: Factors associated with disease recurrence and progression. p. 35-46. In: W. Bonney and D. R. Prout (Hrsg.), *Bladder Cancer*. Williams and Wilkins, Baltimore (1982)
5. Droller, M. J.: Editorial: Bacillus Calmette-Guérin in the management of bladder cancer. *J Urol* 135: 331 (1986)
6. El-Demiry, M. I. M., Smith, G., Ritchie, A. W. S., James, K., Cumming, J. A., Hargreave, T. B., Chisholm, G. D.: Local immune responses after intravesical BCG treatment for carcinoma in situ. *Brit J Urol* 60: 543-548 (1987)
7. Gardiner, R. A., Seymour, G. J., Lavin, M. F., Stratton, G. M., Gemmell, E., Hazan, G.: Immunohistochemical analysis of the human bladder. *Brit J Urol* 58: 19-25 (1986)
8. Guinan, P. D., Shaw, M., Ray, V.: Histopathology of BCG and Thiopeta treated bladders. *Urol Res* 14: 211-215 (1986)
9. Haaff, E. O., Catalona, W. J., Ratliff, T. L.: Detection of Interleukin-2 in the urine of patients with superficial bladder tumors after treatment with intravesical Bacillus Calmette-Guérin. *J. Urol* 136: 970-974 (1986)

10. Kaubisch, S., Lum, B. L., Reese, J., Freiha, F., Torti, F. M.: Stage T1 bladder cancer: Grade is the primary determinant for risk of muscle invasion. *J Urol* 146: 28-31 (1991)
11. Kimball, E. S., Pickeral, S. F., Oppenheim, J. J., Rossio, J. L.: Interleukin 1 activity in normal human urine. *J Immunol* 133: 256-260 (1984)
12. Lamm, D. L., Crawford, E. D., Blumenstein, B. A., Crissman, J. D., deVere White, R. W., Wolf, M., Lowe, B. A., Sarosdy, M. F., Schellhammer, P. F., Sagalowsky, A., et al: SWOG 8795: A randomized comparison of Bacillus Calmette-Guérin and mitomycin C prophylaxis in stage Ta and T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 149: 282A (1993) (Abstrakt)
13. Lamm, D. L., Crawford, E. D., Blumenstein, B. A., Crissman, J. D., Montie, J. E., Gottesman, J., Lowe, B. A., Sarosdy, M. F., Bohl, R. D., Weems, W. L., et al: Maintenance BCG immunotherapy of superficial bladder cancer: A randomized prospective Southwest Oncology Group study. *J Urol* 147: A242 (1992) (Abstract)
14. Lamm, D. J., Stogdill, V. D., Stogdill, B. J., Crispin, R. G.: Complications of Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy in 1278 patients with bladder cancer. *J Urol* 135: 1352-1354 (1986)
15. Morales, A., Eiding, D., Bruce, A. W.: Intracavitary Bacillus Calmette-Guérin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol* 116: 180-183 (1976)
16. Old, J., Clarke, D. A., Benacerraf, B.: Effect of bacillus Calmette-Guérin infection on transplanted tumors in the mouse. *Nature* 184: 291-292 (1959)
17. Ratliff, T. L.: Role of the immune response in BCG for bladder cancer. *Eur Urol* 21 (Suppl.): 17-21 (1992)
18. Ratliff, T. L., Gillen, D. P., Catalona, W. J.: Requirement of a thymus-dependant immune response for BCG-mediated antitumor activity. *J Urol* 137: 155-158 (1987)
19. Rosenberg, S. A.: Immunotherapy of cancer using interleukin 2: current status and future prospects. *Immunol today* 9: 58-62 (1988)
20. Rübber, H., Graf-Dobberstein, C., Ostwald, R., Stauffenberg, A., Jaeger, N., Deutz, F.J., Steffens, L., and Giani, G.: Prospective randomized study of adjuvant therapy after complete resection of superficial bladder cancer; Mitomycin C vs. BCG Connaught vs. TUR alone. p 27-36. In: J. B. deKernion (Hrsg.), *Immunotherapy of urologic tumors*. Churchill Livingstone, New York (1990)
21. Weidmann, E., Bergmann, L., Hechler, P., Mitrou, P. S.: Cytotoxic activity and phenotypic characteristics of lymphocyte subsets after therapy of cancer with interleukin-2. *Cancer Immunol Immunother* 33: 398-402 (1991)

Interferon-gamma bei schizophrenen Psychosen

V. Arolt¹, I. Wilke^{1,2}, C. Weitzsch, A. Nolte¹, M. Pinnow¹, H. Kirchner²

Zusammenfassung

In jüngster Zeit haben mehrere Studien zum Zytokinsystem bei Schizophrenen zu Ergebnissen geführt, die auf eine mögliche Funktionsstörung von TH1-Zellen hinweisen. Während bisher überwiegend die Produktion von IL-2 nach Mitogenstimulation untersucht wurde, haben die wenigen, bisher vorliegenden Arbeiten zur Produktion von IFN- γ vermutlich auch aufgrund methodischer Schwierigkeiten kaum zu aussagekräftigen Ergebnissen geführt. In 2 Studien wird gezeigt, daß die IFN- γ -Produktion bei Schizophrenen vermindert sein kann und zwar überwiegend bei akut schizophren Erkrankten, nicht jedoch bei Patienten in Remission bzw. im Residualzustand und auch nicht bei Verwandten 1. Grades. Eine defiziente IFN- γ -Produktion kann bei einer Subgruppe schizophrener Psychosen möglicherweise als Zustandsmarker der Erkrankung angesehen werden.

Summary

Studies on the cytokine system in schizophrenics have consistently indicated functional deficits of TH1-cells in these patients. Most of these studies are concerned with the production of IL-2 after mitogen stimulation, whereas studies on the production of IFN- γ , probably due to a number of methodical problems, are rare and often inexpressive. It is demonstrated by two of our own studies that the production of IFN- γ can be impaired in schizophrenics. A deficient production is observed only in acute exacerbation of schizophrenia, but not in remission or residual states. Furthermore, this alteration was not observed in first degree relatives of schizophrenics. An impaired production of IFN- γ may be discussed as a state marker in a subsample of schizophrenic psychoses.

Einleitung

Die Bedeutung neurobiologischer Korrelate schizophrener Psychosen hat in den letzten Jahren zunehmende Bestätigung gefunden. Obwohl hinsichtlich der Ätiologie schizophrener Psychosen der Einfluß genetischer Faktoren unbestritten ist, haben auch Infektions- bzw. Autoimmunhypothese

sen wieder an Bedeutung gewonnen. Neben der Hypothese einer direkten, infektiösen Wirkung eines unbekanntes Virus, kann ebenfalls überlegt werden, ob Autoimmunmechanismen als pathogenetisch wirksame Folge eine Immunantwort auf frühere Infektionen wirksam werden könnten. Sowohl im Falle von Infektionen, wie von Autoimmunreaktionen wäre eine Reaktion des Immunsystems im Sinne von „Kampfspuren“ zu erwarten. Seit der ersten Arbeit von Bruce und Peebles (1903) wurden die relativen Häufigkeiten immunkompetenter Zellen bei Schizophrenen im Vergleich zu Gesunden mehrfach untersucht, allerdings mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen. Es liegen jedoch Hinweise auf eine Verminderung der Aktivität natürlicher Killerzellen bei Schizophrenen vor (Delisi et al., 1983; Schindler et al., 1986). In einer neueren Untersuchung konnte gezeigt werden, daß die Neopterinexkretion, die als Funktionsmarker für zelluläre Immunität gewertet werden kann, bei akut erkrankten schizophrenen Patienten vermindert ist (Sperner-Unterwiesing et al., 1992). Untersuchungen möglicher Autoantikörper gegen Hirngewebe haben bisher eine Vielzahl von Befunden hervorgebracht, die bisher keine zufriedenstellende Interpretation zulassen (vgl. Kirchner, 1993). Demgegenüber haben Forschungsarbeiten, die sich mit einer möglichen Störung der Zytokinproduktion bei Schizophrenen beschäftigen, in jüngster Zeit zu zunehmend konsistenten Ergebnissen geführt. Interferone und Interleukine erfüllen bei der Kommunikation der immunkompetenten Zellen eine Vielzahl von Aufgaben und sind unter anderem wesentlich an der Immunantwort auf virale Infektionen beteiligt. Die Konzentration von Zytokinen im Serum, insbesondere jedoch die Fähigkeit der Lymphozyten zur Zytokinproduktion können als Marker einer Aktivierung des zellulären Immunsystems angesehen werden. Von mehreren Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, daß die Produktion von Interleukin-2 (IL-2) nach Stimulation von Lymphozyten bei Schizophrenen gegenüber gesunden Kontrollprobanden erniedrigt war (Ganguli et al., 1989; Hornberg et al., 1995; Villemain et al., 1989). Es kann vermutet werden, daß ein intrinsischer Defekt der TH1-Zel-

len an der defizienten IL-2-Produktion ursächlich beteiligt ist (Villemain et al., 1989). In diesem Zusammenhang ist ebenfalls von Bedeutung, daß die Serumkonzentration des löslichen Anteils des IL-2-Rezeptors (sIL-2R) bei Schizophrenen im Vergleich zu Gesunden erhöht ist; dieser Befund konnte mehrfach reproduziert werden (Ganguli und Rabin, 1989; Hornberg et al., 1995; Rapaport et al., 1989, 1993, Rapaport u. Lehr, 1994). Die Fähigkeit von T-Zellen zur Produktion von Interferon- γ (IFN- γ) wurde hingegen wenig untersucht. Die Serumspiegel von Interferon- γ differieren vermutlich nicht zwischen schizophrenen und gesunden Kontrollen (Schindler et al., 1986; Becker et al., 1990; Gattaz et al., 1992); lediglich Preble und Torrey (1985) fanden erhöhte Serumspiegel. Einige wenige Arbeiten haben, i.S. von Trends, Hinweise auf eine möglicherweise verminderte Fähigkeit von T-Zellen zur IFN- γ -Produktion ergeben (Moises et al., 1985; Katila et al., 1989, Hornberg et al., 1995).

Kritisch ist hinsichtlich der meisten der genannten Untersuchungsbefunde anzumerken, daß die untersuchten Patienten zu einer Erkrankungsgruppe gehören, die sowohl hinsichtlich ihrer psychopathologischen Ausdrucksvielfalt als auch hinsichtlich der Krankheitsverläufe als ausgesprochen inhomogen gelten muß. Die Bedeutung dieser Varianzquelle für die Interpretation psychoimmunologischer Befunde ist derzeit nicht mit hinreichender Sicherheit einzuschätzen. Es erscheint daher geboten, ihren Einfluß zu reduzieren. Im Hinblick auf diese Überlegungen sowie eingedenk der bisher noch unklaren Befundlage soll im folgenden untersucht werden, ob eine mögliche Defizienz der IFN- γ -Produktion im Zusammenhang mit dem Verlauf schizophrener Psychosen gesehen werden kann. Hierzu werden im folgenden zunächst Patienten mit akuten schizophrenen Psychosen (paranoider Subtyp) Patienten mit desaktualisierten Residualsyndromen gegenüber gestellt (Studie 1). In einer weiteren Studie wird in Familien mit wahrscheinlicher genetischer Prädisposition für Schizophrenie untersucht, ob die akut schizophren Erkrankten sich hinsichtlich der IFN- γ -Produktion von Patienten mit Residualsyndromen, Verwandten ersten Grades und gesunden Kontrollen unterscheiden (Studie 2).

Methoden

Studie 1

Eingeschlossen wurden 49 schizophrene Patienten (Durchschnittsalter $36,2 \pm 12,7$ Jahre) der Klinik für Psychiatrie der MUL. Sie wurden einer Kontrollgruppe von 39 gesunden Blutspendern

(Durchschnittsalter $34,6 \pm 12,3$ Jahre) gegenübergestellt. Bei Patienten wie Kontrollen lagen keine akuten oder chronischen Infektionen, Krebserkrankungen oder andere chronische Erkrankungen vor. Die Diagnose schizophrener Psychosen erfolgte gemäß der Kriterien des DSM-III-R; jeweils zwei Untersucher mußten hinsichtlich der Diagnose Übereinstimmung erzielen. Bei 20 Patienten lag ein paranoider, bei 25 ein residualer Subtyp vor; bei 4 Patienten wurden andere schizophrene Störungen diagnostiziert. Bei den schizophrenen Patienten wurde eine ausführliche Anamnese erhoben; das gegenwärtige psychopathologische Zustandsbild wurde mit Hilfe der Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS; Kay et al., 1987) erhoben. Alle schizophrenen Patienten waren mit Neuroleptika mediziert.

Studie 2

6 Familien mit mindestens 2 Fällen von Schizophrenie wurden untersucht. Die psychiatrischen Diagnosen wurden, wie in Studie 1, nach DSM-III-R-Kriterien gestellt. Lediglich die Diagnosen der jeweiligen Indexpatienten waren bekannt, die Familienmitglieder wurden blind mit Hilfe eines strukturierten Interviews (Schedule for Affective Disorders in Schizophrenia/Lifetime Version, Endicott und Spitzer, 1978) interviewt. Die Interviewergebnisse wurden von einem weiteren Psychiater kontrolliert; in allen Fällen konnte eine Diagnose in Übereinstimmung ermittelt werden. Von 27 Personen konnten sowohl psychiatrische Interviews als auch Blutproben erhalten werden. Folgende Diagnosen wurden bei den Familienmitgliedern gestellt: Akute Schizophrenie oder schizoaffektive Psychose (8 Fälle), stabiles schizophrenes Residualsyndrom (5 Fälle), Lebenszeitdiagnose einer affektiven Störung (4 Patienten mit entaktualisierten Depressionen, die im Zusammenhang mit der vorliegenden Studie als "Nicht-Fälle" gewertet wurden), keine psychiatrische Diagnose (10 Fälle). Den Probanden wurde eine Gruppe von 38 gesunden Blutspendern gegenübergestellt.

Immunologische Methodik

Leukozyten von Schizophrenen und gesunden Blutspendern wurden mit Hilfe der Vollbluttechnik kultiviert (Kirchner et al., 1982). Dabei wurden 50 μ l heparinisiertes Blut mit 400 μ l Kulturmedium (RPMI 1640, Biochrom Berlin, ergänzt mit 1% 10000 U/ml Penicillin / 10 mg/ml Streptomycin und 1% 200 mM L-Glutamin) vermischt und anschließend mit 5 μ g/ml Phytohaemagglutinin (Boroughs-Wellcome) stimuliert. Alle Assays wurden 4fach angesetzt, 2 unstimulierte Assays dienten hierbei

als Kontrollen. Die Blutsuspension wurde bei 37°C/5% CO₂ für 96 Stunden inkubiert. Die Überstände wurden bei -80°C gefroren aufbewahrt. Die Zytokin-konzentrationen wurden mit Hilfe von ELISA-Techniken (Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen) bestimmt. Zur Differen-

	IFN- γ		SD
Schizophrene, gesamt (n=49)	2736*	±	3037
Schizophrene, akut paranoid (n=19)	2241*	±	1943
Schizophrene, residual (n=24)	2987	±	3878
Gesunde Kontrollpersonen (n=39)	5429	±	5398

* = signifikante Differenz ($p \leq 0.05$) gegenüber Kontrollen (Varianzanalyse)

Tabelle: Produktion von Interferon-g (pg/ml) durch Lymphozyten (nach Stimulation mit PHA) bei akut und residual Schizophrenen im Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen (SD = Standardabweichung)

zierung von CD4+- und CD8+-T-Zellen wurden 100 μ l EDTA-Blut mit 10 μ l Fluoresceinisothiocyanat oder Phycoerythrin-konjugierten monoklonalen Antikörpern versetzt. Die Suspension wurde 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert und anschließend präpariert (Coulter-Immunoprep-EPICS; Coulter Q-Prep-EPICS, Immunology Workstation, Coulter, Hialeah, USA). Zur Bestimmung der Häufigkeiten von CD5+-Zellen und CD4+CD45RO+-T-Zellen wurden 50 μ l Blut mit 10 μ l des entsprechenden monoklonalen Antikörpers versetzt und bei Dunkelheit und 2-8°C 30 Minuten lang inkubiert. Anschließend wurde 1ml Hämolysepuffer dazugegeben, gemischt und 5 Minuten inkubiert zur Lyse der Erythrozyten. Danach wurde 5 Minuten lang bei 2000 RPM zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und das Zellpellet in 1 ml PBS (phosphat buffered saline) + 2 ml fetalem Kälberserum resuspendiert und anschließend zum zweiten Mal zentrifugiert. Die Überstände wurden wieder verworfen und das Zellpellet in 300 μ l PBS/fetales Kälberserum resuspendiert. Mit Hilfe zytofluorimetrischer Analyse (EPICS-Profile-II Flow-Zytometer, Coulter-Electronics, Krefeld) wurde die relative Häufigkeit des jeweiligen Zelltypus bestimmt.

Ergebnisse

Studie 1

Hinsichtlich der relativen Häufigkeiten von Lymphozyten und Lymphozytensubpopulationen fanden sich keine Unterschiede zwischen Schizophrenen und Gesunden. Die Produktion von IFN- γ war in der gesamten Gruppe der Schizophrenen gegenüber der Gruppe der gesunden Kontrollen reduziert. Wird die Gruppe der Schizophrenen hinsichtlich des akut paranoiden sowie des stabil residualen Subtypus differenziert, so zeigt sich, daß lediglich zwischen den akut paranoiden Schizophrenen und den Kontrollen ein signifikanter Unterschied besteht. Es ergab sich jedoch keine signifi-

kante Differenz im Hinblick auf Patienten mit Residualsyndromen, obwohl auch in dieser Gruppe eine Tendenz zu einer geringeren Interferon- γ -Produktion vermutet werden kann (Tabelle).

Studie 2

Die relative Häufigkeit von Lymphozyten sowie von Lymphozytensubpopulationen unterschieden sich weder im Vergleich der Subgruppen von Schizophrenen, noch der Subgruppen und ihren Verwandten ersten Grades. Ebenfalls bestanden keine Unterschiede zwischen den Teilstichproben aus den Familien und den gesunden Kontrollen. Die Produktion von IFN- γ war lediglich bei der Gruppe akut kranker Schizophrener im Vergleich zu Gesunden aber auch zu den nicht erkrankten Angehörigen ersten Grades signifikant vermindert. Im Vergleich mit der Gruppe Schizophrener mit Residualsyndromen bildete sich statistisch lediglich ein Trend ab. Keine signifikanten Differenzen waren zu finden zwischen den Gruppen der Residualschizophrenen und gesunden Angehörigen ersten Grades sowie zwischen den Gruppen und den Kontrollen (Abb.).

Diskussion

Die Resultate beider Studien können als Hinweis auf eine mögliche Assoziation einer verminderten Fähigkeit der TH1-Zellen zur Produktion von IFN- γ mit der Akuität schizophrener Psychosen gewertet werden. Im Vergleich zu den wenigen bisher vorliegenden Studien (Moises et al., 1985; Katila et al., 1985; Hornberg et al., 1995) wurde besonderer Wert auf eine Differenzierung von Verlaufsstadien bzw. Subtypen schizophrener Psychosen gelegt. In Studie 1 wird deutlich, daß die Reduktion der IFN- γ -Produktion der Gruppe der Schizophrenen in erster Linie durch die akut Schizophrenen bedingt ist. Allerdings erreichte der Unterschied zwischen paranoiden und residual Schizophrenen keine statistische Signifikanz. Die verminderte IFN- γ -Produktion kann nicht auf eine mögli-

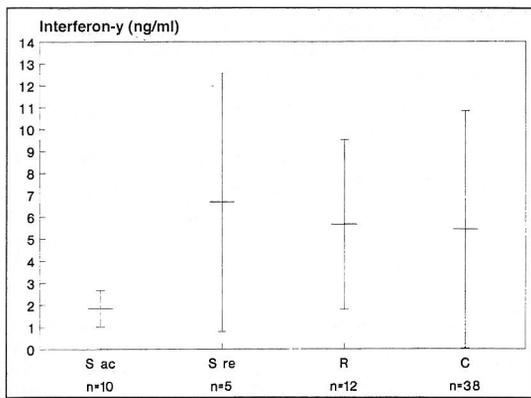


Abbildung: Produktion von IFN-g bei Mitgliedern von 6 Familien mit mehrfachem Vorkommen schizophrener Psychosen (Sac = Familienmitglieder mit akuten schizophrenen Psychosen, Sre = Familienmitglieder mit schizophrenen Residualsyndromen, R = Verwandte 1. Grades ohne aktuelle psychiatrische Diagnose, C = gesunde Kontrollpersonen). Signifikante Unterschiede in der IFN-g-Produktion (Varianzanalyse) bestanden zwischen Sac : R und Sac : C, nicht jedoch zwischen Sre, R, C.

che Reduktion der relativen Häufigkeit von CD4+CD45RO+-T-Zellen (Gedächtniszellen, die als Hauptproduzenten für IFN- γ gelten, Sanders et al., 1988) zurückgeführt werden, da dieser Zelltypus sowohl in beiden Subgruppen von Schizophrenen wie bei Gesunden gleichhäufig vorkam.

Auch in Familien, in denen eine genetische Prädisposition für Schizophrenie angenommen werden muß, ließ sich eine verminderte IFN- γ -Produktion lediglich bei den akut erkrankten Familienmitgliedern nachweisen. Diese Beobachtung bestätigt nicht nur (allerdings auf der Grundlage kleiner Teilstichproben) die Ergebnisse der Studie 1, sondern ermöglicht weiterführende Überlegungen: wäre die verminderte Produktion von IFN- γ mit einer genetischen Prädisposition für Schizophrenie assoziiert, so müßte erwartet werden, daß dieses Merkmal nicht nur bei akut Schizophrenen, sondern auch bei solchen mit Residualsyndromen als auch bei nicht erkrankten Verwandten ersten Grades erkennbar wäre. Die vorliegenden Ergebnisse aus vermutlich genetisch belasteten Familien sprechen also eher für eine „State“-Abhängigkeit der IFN- γ -Produktion und gegen die Annahme eines Indikators für einen, mit Vulnerabilität für Schizophrenie assoziierten genetischen „Trait“. Im Hinblick auf die geringe Stichprobengröße sollte jedoch eine zurückhaltende Bewertung dieser Ergebnisse erfolgen: so ist z.B. die Teilstichprobe der

Residualschizophrenen (n=5) zu klein, als daß statistisch aussagefähige Unterschiede zu anderen Teilstichproben erwartet werden könnten. Hinsichtlich der Anzahl von CD4+CD45RO+-T-Zellen fanden sich auch in der Familienstudie zwischen den einzelnen Teilstichproben keine Unterschiede. Diese Beobachtung stimmt mit der Studie 1 überein. Beide Studien können dahingehend interpretiert werden, daß die Produktion von IFN- γ vermutlich überwiegend in der Akutphase einer schizophrenen Psychose vermindert ist. Diese Defizienz beruht möglicherweise auf einem intrinsischen T-Zelldefekt. Angesichts dieser Beobachtung ergibt sich eine bemerkenswerte Parallele zu den Arbeiten von Villemain et al. (1989), die hinsichtlich der IL-2-Produktion bei Schizophrenen zu ähnlichen Ergebnissen kam. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß eine neuroleptische Behandlung offenbar keinen Einfluß auf die Zytokinproduktion hat (Müller et al., 1991).

Die defiziente Produktion von IFN- γ , von IL-2 sowie die erhöhten Serumspiegel des löslichen IL-2-Rezeptors weisen auf Veränderungen der zellulären Immunität im akuten schizophrenen Schub hin. Diese Beobachtungen sind mit der Autoimmunhypothese schizophrener Psychosen vereinbar, können andererseits aber auch Ausdruck von Begleitphänomenen schizophrener Erkrankungen (z.B. Streßreaktion) oder deren möglicher Ursachen (z.B. Veränderungen von Neurotransmittermetabolismen) sein. Auch wenn die Ursache der beschriebenen Befunde noch unklar bleiben muß, so sollte doch Anlaß zu weiteren Forschungsbemühungen gegeben sein, wobei insbesondere longitudinale Studienpläne vielversprechend erscheinen.

Literatur

1. Becker, D., Kritschmann, E., Floru S., Shlomo-David, Y., Gottlieb-Stematsky, T. (1990) Serum interferon in first psychotic attack. *Br. J. Psychiatry* 157, 136-138
2. Bruce, L.C., Peebles, A.M.S. (1904) Quantitative and qualitative leukocyte counts in various forms of mental disease. *J. Ment. Science* 50, 409-417
3. DeLisi, L.E., Otaldo, J.R., Maluish, A.E., Wyatt, R.J. (1983) Deficient natural killer (NK) cell activity and makrophage functioning in schizophrenic patients. *J. Neur. Trans.* 58, 96-106
4. Endicott, J., Spitzer, R.L. (1978) A diagnostic interview: the schedule for affective disorders and schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 35, 837-844
5. Ganguli, R., Rabin, B.S., Belle, S.H. (1989) Decreased interleukin-2 production in schizophrenic patients. *Biol. Psychiatry* 26, 427-430
6. Ganguli, R., Rabin, B.S. (1989) Increased serum interleukin-2 receptor in schizophrenic and brain damaged subjects (letter). *Arch. Gen. Psychiatry* 46, 291-292

7. Gattaz, W.F., Dalgarrondo, P., Schröder, H.C. (1992) Abnormalities in serum concentrations of interleukin-2, interferon- α and interferon- γ in schizophrenia not detected. *Schizophr. Res.* 6, 237-241
8. Hornberg, M., Arolt, V., Kruse, A., Kirchner, H. (1995) Lymphokine production in leukocyte cultures of patients with schizophrenia. *Schizophr. Res.* 15, 237-242
9. Katila, H., Cantell, K., Hirvonen, S., Rimon, R. (1989) Production of interferon alpha and gamma by lymphocytes from patients with schizophrenia. *Schizophr. Res.* 2, 361-365
10. Kay, S.R., Fiszbein, A., Opler, L.A. (1987) The Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 13, 261-276
11. Kirch, D.G. (1993) Infection and autoimmunity as etiologic factors in schizophrenia: A review and reappraisal. *Schizophr. Bull.* 19, 355-370
12. Kirchner, H., Kleincke, C., Diegel, W. (1984) A whole blood technique for testing production of human interferon by leukocytes. *Immunol. Method.* 48, 213-219
13. Moises, H.W., Schindler, L., Leroux, M., Kirchner, H. (1985) Decreased production of interferon gamma in leucocyte cultures of schizophrenic patients. *A. Psychiat. Scand.* 72, 45-50
14. Müller, N., Ackenheil, M., Hofschuster, E., Mempel, W., Eckstein, R. (1991) Cellular immunity in schizophrenic patients before and during neuroleptic treatment. *Psychiatr. Res.* 37, 147-160
15. Preble, O.T., Torrey, E.F. (1985) Serum interferon in patients with psychosis. *Am. J. Psychiatry* 142: 1184-1186
16. Rapaport, M.H., McAllister, C.G., Pickar, D., Nelson, D.L., Paul, S.M. (1989) Elevated levels of soluble interleukin-2 receptors in schizophrenia (letter). *Arch. Gen. Psychiatry* 46, 291-292
17. Rapaport, M.H., Torrey, E.F., McAllister, C.G., Nelson, D.L., Pickar, D., Paul, S.M. (1993) Increased serum interleukin-2 receptors in schizophrenic monozygotic twins. *Eur. Arch. Psychiatr. Clin. Neurosci.* 242, 7 - 10
18. Rapaport, M.H., Lohr, J.B. (1994) Serum soluble interleukin-2 receptors in neuroleptic naive schizophrenic subjects and in medicated subjects with and without tardive dyskinesia. *A. Psychiatr. Scand.* 90, 311-315.
19. Sanders, M.E., Makoba, M.W., Sharrow, S.O., Stephany, D., Springer, T.A., Young, H.A., Shaw, S. (1988) Human memory T-lymphocytes express increased levels of 3 cell adhesion molecules (LFA-3, CD2 and LFA-1) and 3 other molecules (UCLH-1, Cdw29 and Pgp-1) and have enhanced interferon-gamma production. *J. Immunol.* 140, 1401-1414
20. Schindler, L., Leroux, M., Beck, J., Moises, H.W., Kirchner, H. (1986) Studies of cellular immunity, serum interferon titers, and natural killer cell activity in schizophrenic patients. *A. Psychiat. Scand.* 73, 651-665
21. Sperner-Unterweger, B., Barnas, C., Fuchs, D., Kemmler, G., Wachter, H., Hinterhuber, H., Fleischhacker, W.W. (1992) Neopterin production in acute schizophrenic patients: An indicator of alterations of cell-mediated immunity. *Psychiatry Res.* 42, 121-128
22. Villemain, F., Chatenoud, L., Galinowski, A., Homo-Delarche, F., Ginestet, D., Loo, H., Zarifan, E., Bach, J.F. (1989) Aberrant T-cell mediated immunity in untreated schizophrenic patients: deficient interleukin-2 production. *Am. J. Psychiatry* 146, 609-616

Aus der Klinik für Neurologie der Medizinischen Universität zu Lübeck (Direktor Prof. Dr. med. D. Kömpf):

Aktuelle Therapie der Multiplen Sklerose

K. Wessel, D. Kömpf

Bei der Multiplen Sklerose (MS) kommt es an multiplen und disseminierten Stellen im Gehirn und Rückenmark zu Entzündungsherden (Synonym: Encephalomyelitis disseminata; E. d.); innerhalb der Entzündungsherde (Plaques) entsteht vorwiegend eine Markscheidenschädigung (Demyelinisierung). Im Verlauf können einerseits demyelinisierte Fasern remyelinisiert werden, andererseits kommt es zu Vernarbungen (Sklerose). Dies bedingt, zusammen mit der Tatsache, daß über die Zeit Zahl und Größe der Plaques zunehmen als auch abnehmen können, die typischen Verlaufsformen der MS: 1. Schubförmiger Verlauf mit weitgehend vollständigen Zwischenremissionen, 2. schubförmiger progredienter Verlauf mit unvollständigen Zwischenremissionen und zunehmender Behinderung, 3. primär chronischer Verlauf (siehe u. a. Wessel und Rumpf 1992). Die Ätiologie der MS ist unklar. Die Zusammensetzung der entzündlichen Infiltrate aus Lymphozyten und Monozyten, die Assoziation mit genetischen Faktoren, das teilweise Ansprechen der MS auf Immunsuppressiva sowie die Parallelen zur experimentell-allergischen Encephalomyelitis (EAE) legen nahe, daß es sich um eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung handelt (Hartung und Heininger 1989, Martin et al. 1992). Die Inzidenz beträgt 4 bis 8, die Prävalenz 60 bis 100 pro 100.000. Die Diagnose MS wird nach wie vor überwiegend klinisch gestellt und erfordert erstens Befunde, die sich mindestens zwei örtlich getrennten Läsionen des Zentralnervensystems zuordnen lassen sowie zweitens mindestens zwei zeitlich voneinander abgesetzte Schübe oder einen mindestens ein Jahr anhaltenden, schleichend progredienten Verlauf bei der primär chronischen MS. Aus den diagnostischen Kriterien von Poser et al. (1983) ergibt sich, daß sich die Diagnose häufig erst im Verlauf stellen läßt (s. Tab. 1). Dies und die unbekanntete Individualprognose legen ein differenziertes Vorgehen und nicht zu selten Zurückhaltung bei der Aufklärung über die Diagnose im Frühstadium der Erkrankung nahe. Die Multifokalität der Läsionen kann mit Hilfe der evozierten Potentiale (Michels et al. 1991) und der

Sichere MS

(post mortem)

Klinisch sichere MS

≥ 2 Schübe, multifokaler klinischer Befund
 ≥ 1 Jahr chronische Progredienz, multifokale Befunde

Laborunterstützt sichere MS

≥ 2 Schübe, mono- oder multifokaler klinischer Befund
 positiver Liquorbefund

Klinisch wahrscheinliche MS

≥ 2 Schübe, monofokaler klinischer Befund
 1 Schub, mono- oder multifokaler klinischer Befund mit ergänzenden neuroradiologischen oder neurophysiologischen Zusatzbefunden

Laborunterstützt wahrscheinliche MS

≥ 2 Schübe, positiver Liquorbefund
 1 Schub, monofokaler klinischer oder neuroradiologischer oder elektrophysiologischer Befund und positiver Liquorbefund
 ≥ 1 Jahr primär chronische Progredienz mit monofokalem klinischem Befund und positivem Liquorbefund

Tab. 1 Diagnostische Kriterien

Kernspintomographie nachgewiesen werden. Ein typischer Liquorbefund unterstützt die Diagnose. Ziele der Therapie sind neben der Behandlung des akuten Schubes die Verminderung der Schubfrequenz und die Verlangsamung der Krankheitsprogression. In Therapiestudien zur MS werden kernspintomographische Parameter zunehmend zur sensitiven und objektiven Beurteilung des therapeutischen Erfolges herangezogen und gelten bereits als unverzichtbarer zweiter Zielparame- ter. Zielgrößen in der Kernspintomographie sind die Abnahme von Kontrastmittel (Gadolinium)-aufnehmenden Läsionen und die Verlangsamung der Akkumulation von Läsionen (in T2-gewichteter Untersuchung) über die Zeit. Fußend auf der anzunehmenden autoimmunologi-

Klinisch	Behandlung
Neuritis n. optici	Steroide hochdosiert i. v., evtl. orales Ausschleichen
Schubförmige MS: <2 Schübe/Jahr; rein sensible Symptome; geringe Krankheitsaktivität im MRT	Steroide hochdosiert i.v., evtl. orales Ausschleichen i.v. Therapie bis max. 4x/Jahr
Schubförmige MS: häufige oder schwere Schübe und hohe Aktivität im MRT	Schub s.o., daneben: Azathioprin, IFN- β , Cyclosporin A (3.Wahl) zukünftig: Copolymer 1?
Schubförmige MS mit Übergang in Progression oder chronisch progrediente MS: schwere Erkrankung, Zunahme der Behinderung, hohe Aktivität im MRT	initial Versuch mit Steroiden evtl. Cyclophosphamid zukünftig: 2-Chlorodeoxyadenosin? Mitoxantron? bei chron. progr. MS: Methotrexat?

Tab. 2 Therapeutische Entscheidungen.

sehen Pathogenese, wie oben bereits angesprochen, bestehen die Therapieprinzipien bei MS heute in einer Immunsuppression oder Immunmodulation (s. Tab. 2; Polman und Hartung 1995). Dabei haben sich ganz aktuell neue Therapiemöglichkeiten und Behandlungsstrategien ergeben, von denen die wesentlichen im folgenden beschrieben werden.

Therapie des akuten Schubes mit Glukokortikosteroiden

Glukokortikoide werden seit langem in der Therapie der MS eingesetzt und verfügen über breite antiinflammatorische, antiödematöse und immunsuppressive Wirkungen. Das Therapieprinzip des akuten Schubes einer MS mit Glukokortikoiden ist alt, relativ neu sind neue Behandlungsstrategien mit kurzzeitiger und hochdosierter Gabe der Substanz per infusionem („Cortison-Stoßtherapie“). Studien sprechen dafür, daß durch Glukokortikosteroide die Dauer und Schwere von Schüben vermindert werden kann (Myers 1992). Kernspintomographisch konnte nachgewiesen werden, daß hochdosiert und intravenös verabreichtes Methylprednisolon innerhalb weniger Stunden die durch Gadolinium-Anreicherung in der MRT-darstellbare Blut-Hirn-Schrankenstörung aufhebt (Barkhof et al. 1991, Burnham et al. 1991). Die Therapieerfolge dieser hochdosierten, intravenö-

sen Gabe von Methylprednisolon bei Opticusneuritis (Beck et al. 1992) und der möglicherweise bestehende, vorübergehende prophylaktische Effekt bei Opticusneuritis (Beck et al. 1993) haben dazu beigetragen, daß Glukokortikosteroide sich trotz vieler offener Fragen als Standardtherapie des akuten Schubes und der akuten Opticusneuritis durchgesetzt haben. Es wird empfohlen, bei einem frischen Schub Glukokortikosteroide möglichst frühzeitig und unter stationären Bedingungen hochdosiert intravenös zu geben und eine ambulante, ausschleichende orale Behandlung anzuschließen (s. Tab. 3; Voltz und Hohlfeld 1992, Kupersmith et al. 1994). Eine andere Empfehlung geht dahin, die hochdosierte intravenöse „Cortison-Stoßtherapie“ nach 5 Tagen abrupt abzusetzen, falls bereits am 2. bis 3. Tag eine deutliche Besserung beginnt, oder oral etwa nach dem Schema in Tabelle 3 auszuschleichen, falls erst am 4. bis 5. Tag eine Besserung erkennbar wird (Hohlfeld und Engelhardt 1993). Von der alleinigen oralen Gabe von Glukokortikoiden über längere Zeit ist wegen der hohen Nebenwirkungsrate (Osteoporose, peptische Ulcera, Hyperglykämie, cushingoider Habitus, arterielle Hypertonie, Myopathie, Katarakt, Glaukom) entschieden abzuraten. Diese Nebenwirkungen sind bei der sog. „Cortison-Stoßtherapie“, wie in Tabelle 3 angegeben, nicht zu erwarten, dieses Therapieschema

	Tag
500-1000 mg (Methyl-)Prednisolon i.v. in 250 ml 5%iger Glukose als Kurzinfusion über 30-60 min	1-5
100 mg Prednisolon oral	6
75 mg Prednisolon oral	7-9
50 mg Prednisolon oral	10, 11
25 mg Prednisolon oral	12, 13
12,5 mg Prednisolon oral	14, 15
- Dieses Ausschleichtschemata benötigt	
10 Tabletten Prednisolon a 50 mg	
- Begleitmedikation: ggf. Antazida, H ₂ -Blocker, Kalium, Heparin s. o.	
- Rö-Thorax, wenn Tb in der Vor- geschichte	
- Zumindest die erste Infusion nicht ambulant	

Tab.3 Behandlung des Schubes mit i.v. Verabreichung von Steroiden.

wird meist gut vertragen. Wichtig ist der Ausschluß relevanter Vorerkrankungen (z. B. Thrombosen, Entzündungen, u. a. Tbc). Die „Cortison-Stoßtherapie“ sollte maximal vier mal pro Jahr durchgeführt werden (Steinbrecher et al. 1995).

Prophylaktische Therapie der schubförmig-remittierenden MS mit Immunsuppressiva und Immunmodulatoren

Bei der Entscheidung, ob bei schubförmig remittierender MS neben der Behandlung des akuten Schubes mit Glukokortikosteroiden eine zusätzliche „prophylaktische“ Therapie eingeleitet wird, müssen Häufigkeit und Schwere der Schübe, die bereits bestehende klinische Behinderung, die in der Kernspintomographie nachweisbare Krankheitsaktivität, der Rückhalt im psychosozialen Umfeld (Rumpf und Wessel 1995) sowie der zu erwartende Nutzen der verfügbaren Therapien gegen deren Risiken und Nebenwirkungen abgewogen werden. Die Behandlungskosten insbesondere bei der jetzt neu verfügbaren Therapie mit Beta-Interferon spielen eine nicht zu vernachlässigende Rolle und verpflichten zu präziser Indikationsstellung. Alle Immunsuppressiva sind potentiell teratogen und mutagen, in der MS-Therapie mit diesen Substanzen ist zwar weder das Auftreten von Fruchtschädigungen noch von späteren Neoplasien beschrieben worden, prospektive Studien fehlen jedoch. Eine Antikonception muß daher bei

Patientinnen und Patienten für die Dauer der Therapie mit Immunsuppressiva und Immunmodulatoren und bei Männern mindestens für weitere sechs Monate (2 Spermatogenese-Zyklen) durchgeführt werden.

Beta-Interferon

Ein ganz aktuelles Konzept stellt die prophylaktische Therapie der schubförmig-remittierenden MS mit Beta-Interferon dar. Diese Therapie ist so neu, daß zur Zeit in Deutschland noch kein entsprechendes Präparat arzneimittelrechtlich zugelassen ist. Derzeit werden die Patienten im Sinne eines „Heilversuches im Einzelfall“ mit über das Ausland bezogenen Präparaten behandelt.

Interferone zählen zur großen Familie der sog. Zytokine. Dabei handelt es sich um Botenstoffe, die der intrazellulären Kommunikation im Immunsystem dienen. Interferon-Beta wird wie Interferon-Alpha von Fibroblasten und Leukozyten, Interferon-Gamma überwiegend von T-Lymphozyten produziert (Borden 1992). Eine Reihe von Untersuchungen hat belegt, daß Interferon-Beta und Interferon-Gamma antagonistische Effekte besitzen. Dieser Antagonismus scheint für die beobachteten Wirkungen bei MS grundlegend zu sein. Dem Interferon-Gamma kommt für die Pathogenese der MS wesentliche Bedeutung zu. Interferon-Beta scheint die Synthese von Interferon-Gamma durch T-Zellen zu unterdrücken, die man aus dem Blut von MS-Patienten und gesunden Blutspendern isolieren kann, und einen hemmenden Einfluß auf die T-Zell-Proliferation auszuüben. Eine weitere Wirkung von Interferon-Beta dürfte die Verbesserung der Suppressorfunktion von T-Zellen sein (Weinstock-Guttman et al. 1994, Hartung et al. 1994, Hartung und Hohlfeld 1994).

Eine Reihe von Hinweisen deuten darauf hin, daß im Blut MS-Erkrankter autoreaktive T-Lymphozyten mit Spezifität gegen Bestandteile des zentralnervösen Myelins zirkulieren, die im akuten Schub bei erhöhter Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke ins Hirngewebe einwandern. Hierauf gründete der Versuch, die Wirkung von Beta-Interferon auch nach systemischer Gabe zu untersuchen (Hartung et al. 1994).

Der bislang schlüssigste Wirksamkeitsnachweis bei schubförmig remittierender MS wurde in einer multizentrischen, Plazebo-kontrollierten Studie mit Interferon-Beta-1b (in E. coli produziertes rekombinantes Interferon-Beta; Präparat Betaseron®) in der Dosierung von 8 Mio. Einheiten jeden zweiten Tag subcutan erbracht (The IFMB Multi

ple Sklerosis Study Group, 1993). In dieser Studie kam es zu einer Verminderung der Schubrate um ein Drittel und zur Halbierung der Rate schwerer Schübe. Dieser Effekt war über den gesamten Studienzeitraum von drei Jahren nachweisbar. Die Zahl aktiver Läsionen in der Kernspintomographie wurde um 80 % gesenkt, die Läsionsbelastung (T2-gewichtete Untersuchung) nahm ab. Der klinische Score wurde durch die Therapie nicht signifikant gebessert, es deutete sich lediglich tendenziell eine Besserungstendenz an.

Auch für Interferon-Beta-1a (REBIF®) (in chinesischen Hamster-Ovarzellen produziertes rekombinantes Interferon-Beta; Sequenz identisch zum natürlichen Interferon-Beta) wurden die Ergebnisse einer Plazebo-kontrollierten Doppel-Blind-Studie mit 6 Mio. Einheiten (1 mal wöchentlich intramuskulär) aktuell mitgeteilt (Jacobs et al. 1994). Die Wirkungen auf die Schubhäufigkeit und die MRT-Parameter waren vergleichbar mit denen der Studie mit Interferon-Beta-1b, allerdings ergab sich mit Interferon-Beta-1a zusätzlich eine Wirksamkeit auf den klinischen Score, wobei die klinische Progression mäßig, aber signifikant verzögert wurde. In Deutschland liegt derzeit für keines der beiden genannten Präparate eine Zulassung bei der Indikation MS vor, für Interferon-Beta-1b (Betaseron®) wird sie noch für 1995 erwartet. Interferon-Beta-1b (Betaseron®) kann derzeit über internationale Apotheken aus Belgien importiert werden. Interferon-Beta-1a (REBIF®) besitzt in Italien eine arzneimittelrechtliche Zulassung und kann ebenfalls über internationale Apotheken aus Italien importiert werden. Die Deutsche Multiple Sklerose Gesellschaft hat entsprechend der „American Academy of Neurology“ Richtlinien erarbeitet, für welche Patienten eine Behandlung mit Interferon-Beta empfehlenswert ist: 1. Schubförmig remittierender Krankheitsverlauf, 2. klinisch sichere oder laborunterstützt sichere MS, 3. Alter zwischen 18 und 50 Jahre, 4. ohne Hilfe mindestens 100 Meter gehfähig (keine ein- oder beidseitige Gehhilfe erforderlich), 5. in den letzten zwei Jahren mindestens 2 akute Schübe, bei denen über mindestens 24 Stunden neue Symptome oder eine Verschlechterung alter Symptome auftraten, 6. stabile Phase oder Phase der Besserung von mindestens 30-tägiger Dauer vor Therapiebeginn (kein Therapiebeginn im oder nur wenige Tage nach Abklingen des letzten Schubes). Die Einleitung einer derartigen Therapie mit Beta-Interferon sollte stationär erfolgen, die Behandlungsindikation sowie die Therapie-Überwachung sollten von einem in der MS-Therapie erfahrenen Zentrum in Zusammenarbeit mit nieder-

gelassenen Fachärzten und Allgemeinärzten vorgenommen werden.

Vor allem in den ersten Wochen der Therapie mit Interferon-Beta treten häufig vorübergehende grippale Nebenwirkungen, wie Fieber, Übelkeit, Kopf-, Glieder- und Muskelschmerzen, auf. Häufiger sind leichte entzündliche Reaktionen an den Injektionsstellen.

Daneben wurden eine leichte Anämie, Neutropenie, Thrombopenie und leichte bis mäßige Erhöhungen der Leberenzyme beobachtet. Sehr selten sind Herzrhythmusstörungen und Allergien. Da Psychosen (insbesondere Depressionen) möglicherweise unter Interferon-Beta häufiger auftreten und es in den Studien zu mehreren Suizidversuchen und einem Suizid unter Interferon-Beta kam, stellen Psychosen und Suizidversuche in der Anamnese eine Kontraindikation dar.

Azathioprin

Aufgrund der zwar geringen, jedoch in allen Studien nachgewiesenen Wirksamkeit und seiner meist guten Verträglichkeit wird Azathioprin weiterhin bei schubförmig remittierender MS mit mehr als zwei Schüben innerhalb eines Jahres in einer Dosis von 2-3 mg/kg Körpergewicht pro Tag empfohlen (Yudkin et al. 1991).

Cyclosporin

Cyclosporin besitzt im Vergleich zu den Immunsuppressiva Azathioprin und Cyclophosphamid einen spezifischeren Angriffspunkt und wirkt in erster Linie über die Verminderung der Transkription verschiedener Zytokine. Der Vergleich mit Azathioprin in mehreren kontrollierten Studien belegte nur geringe Unterschiede in der Wirksamkeit beider Substanzen (Hughes 1992). Aufgrund fehlender Vorteile gegenüber Azathioprin und der größeren Häufigkeit schwerer Nebenwirkungen (Nephrotoxizität) kann Cyclosporin nur dann empfohlen werden, wenn Azathioprin und Interferon-Beta nicht wirksam waren oder nicht vertragen wurden (Dosis 5 mg/kg Körpergewicht pro Tag auf zwei orale Dosen verteilt).

Copolymer 1

Copolymer 1 ist ein synthetisches Polypeptid, dessen Wirkungsmechanismus bei MS möglicherweise darin besteht, daß es kompetitiv mit basischem Myelin-Protein, dem für die Pathogenese der MS eine wichtige Rolle zukommt, um Bindungsstellen konkurriert (immunologische Kreuzreaktivität von Copolymer 1 und basischem Myelin-Protein).

Nach einer Reihe klinischer Voruntersuchungen (Bornstein et al. 1991) wurden kürzlich die Ergebnisse einer multizentrischen, Plazebo-kontrollierten Studie bei Patienten mit schubförmig-remittierender MS vorgetragen (K.P. Johnson; Tagung der American Neurological Association, San Francisco, Oktober 1994). Diese sind mit denen des Interferon-Beta vergleichbar, wenn auch etwas weniger deutlich. Copolymer 1 wird täglich subcutan injiziert und gut vertragen. Der Zulassungsantrag für Copolymer 1 ist gestellt, mit einer Zulassung wird im Jahre 1996 gerechnet (Weilbach et al. 1995). Aufgrund des unterschiedlichen Wirkmechanismus von Copolymer 1 im Vergleich zu Beta-Interferon könnte eine Kombinationstherapie mit beiden Medikamenten bei Patienten mit schubförmig remittierender MS sinnvoll sein.

Therapie der schweren und progredienten MS

Cyclophosphamid

Nach widersprüchlichen Studienergebnissen mit Cyclophosphamid als hochdosierte Induktionsbehandlung weist eine kürzlich veröffentlichte kontrollierte Studie bei schwer progredienter MS darauf hin, daß die sonst in der Regel innerhalb von 18 Monaten nach der Induktionsbehandlung auftretende erneute Progression durch eine alle zwei Monate erfolgende Gabe von Cyclophosphamid verhindert werden kann (Weiner et al. 1993). Es ist gegenwärtig nicht klar, ob auf die Induktionstherapie verzichtet werden kann, ob stattdessen von Beginn an monatlich applizierte Cyclophosphamid-Injektionen ebenfalls wirksam sind, welche minimale Dosierung ausreichend ist und ob eine zusätzliche Verabreichung von Glukokortikosteroiden erforderlich ist. Trotz dieser Einschränkungen ist Cyclophosphamid am besten untersucht und gilt derzeit bei einigen Autoren als das Mittel der Wahl bei schwerer und schnell progredienter MS. Dies betrifft z. B. Patienten mit häufigen oder schweren Schüben, die durch andere Immunsuppressiva oder Immunmodulatoren nicht zu beeinflussen sind, so daß kurzfristig ein kritisches Ausmaß der Behinderung zu befürchten wäre.

Mitoxantron

Mitoxantron ist seit ca. 10 Jahren als Zytostatikum in Deutschland zugelassen. Die immunsuppressive Wirkung schließt einen inhibierenden Effekt auf B- und T-Lymphozyten ein.

Mehrere kleine, offene Studien bei Patienten mit schwerer schubförmig-progredienter oder chronisch-progredienter MS weisen auf die mögliche Wirksamkeit von Mitoxantron hin, ohne daß eine

abschließende Bewertung gegenwärtig möglich ist. Nach Abschluß der gerade laufenden belgisch-deutschen, multizentrischen Phase-III-Studie (an der auch die Klinik für Neurologie der Medizinischen Universität zu Lübeck beteiligt ist) sollte man diese Frage beantworten können. Bei Patienten mit rasch progredientem Verlauf, so daß kurzfristig ein kritisches Ausmaß der Behinderung zu befürchten wäre, kommt Mitoxantron als Reserve-Medikament in Frage und sollte dann alle drei Monate als Kurz-Infusion (12 mg/qm² Körperoberfläche) verabreicht werden (Spuler und Hohlfeld 1994).

Cladribin (2-Chlorodesoxyadenosin)

Cladribin ist ein Purinanalogon, klinische Erfahrungen mit dieser Substanz liegen bisher bei Leukämien und Lymphomen vor, in Deutschland ist die Zulassung für die Indikation Haarzelleukämie beantragt.

Cladribin erwies sich in einer Plazebo-kontrollierten Doppel-Blind-Studie bei chronisch progredienter MS (0,7 mg/kg Körpergewicht pro Monat; jeweils Dauerinfusion über eine Woche) als wirksam (Sipe et al. 1994). Auch bei schubförmig remittierender MS deuten vorläufige Ergebnisse einer laufenden Studie mit niedrigerer Dosierung und praktikablerer Anwendung der Substanz auf eine günstige Wirkung hin, müssen jedoch noch in größeren Studien belegt werden (Grieb et al. 1994, Weilbach und Hartung 1995). Denkbar wäre z. B. ein befristeter Einsatz bei rascher Progredienz, um diese zu stoppen. Im Anschluß könnte dann auf andere, auf Dauer weniger potentiell toxische Substanzen umgesetzt werden.

15-Deoxyspergualin

15-Deoxyspergualin wird aufgrund seiner immunsuppressiven Wirkung in der Transplantationsmedizin mit Erfolg eingesetzt. Das Medikament wurde in einem Selbstversuch von Dr. Nils Franke, der viel Publizität gefunden hat, in die Therapie der MS eingeführt (Kappos et al. 1992, Hohlfeld und Angstwurm 1992). Inzwischen wurde diese Substanz an insgesamt 236 MS-Patienten geprüft. Bei einer ersten Zwischenauswertung nach sechs Monaten wiesen Deoxyspergualin-behandelte Patienten eine Verbesserung der neurologischen Störungen auf, nach zwölf Monaten fielen die Ergebnisse für die Verum-Gruppe enttäuschenderweise nicht mehr so eindeutig aus und kernspintomographisch waren keine objektivierbaren Veränderungen erkennbar. Das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte versagte daraufhin die Zulas-

sung von 15-Deoxyspergualin für die Indikation MS (Deutsches Ärzteblatt 92: 1015; 1995). Weitere Studien mit diesem Medikament sind bei MS nicht geplant.

Methotrexat

Ein besonderes therapeutisches Problem stellt die langsam chronisch progrediente MS dar. Nach kürzlich vorgestellten Ergebnissen einer Placebo-kontrollierten Studie reduziert Methotrexat (orale Einmaldosis von 7,5 mg pro Woche über 2 Jahre) die Häufigkeit und die Geschwindigkeit der klinischen Progression bei chronisch progredienter MS (Goodkin et al. 1995). Der Effekt war nur unter Berücksichtigung spezieller klinischer Scalen zur Beurteilung der oberen Extremitäten und nur für die Untergruppe der Patienten mit sekundär chronisch-progredienter MS signifikant. Eine zuvor durchgeführte entsprechende Pilotstudie fand bei gleicher Dosierung eine Verminderung der Häufigkeit von Schüben und von klinischen Befundverschlechterungen bei Patienten mit schubförmig remittierender MS, nicht jedoch bei Patienten mit schubförmig progredientem Verlauf oder mit chronisch progredientem Verlauf (Currier 1993, Weilbach et al. 1995).

Ausblick

Solange die Ursache der MS nicht bekannt ist, ist eine Heilung der Erkrankung nicht möglich. Die Untersuchungen der letzten Jahre haben jedoch erheblich zum Verständnis des vermuteten Autoimmunprozesses beigetragen. Die neuen immun-suppressiven und immunmodulierenden Therapien beenden eine Periode von über 20 Jahren therapeutischen Nihilismus und eröffnen sehr hoffnungsvolle Zukunftsperspektiven. Es besteht die begründete Hoffnung, daß in Zukunft wirksamere und, aufgrund eines spezifischeren Eingriffs in das Immunsystem, zugleich schonendere Behandlungsverfahren entwickelt werden.

Literatur

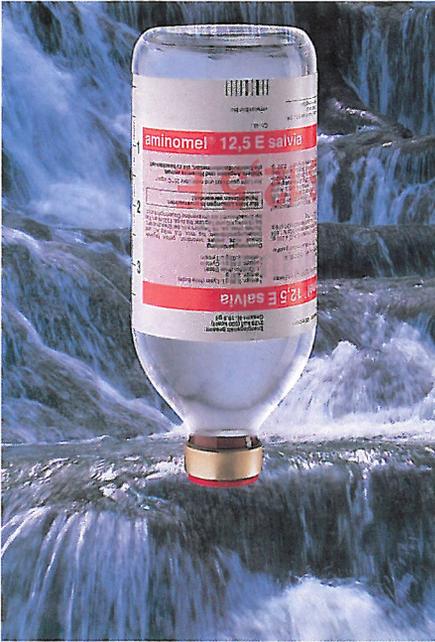
1. Barkhof F, Hommes OR, Scheltens P. Quantitative MRI changes in gadolinium-DTPA enhancement after high-dose methylprednisolone in multiple sclerosis, *Neurology* 1991, 41: 1219-1222
2. Beck RW, Cleary PA, Anderson MM. A randomized controlled trial of corticosteroids in the treatment of acute optic neuritis, *N. Engl. J. Med.* 1992, 326: 581-588
3. Borden EC. Interferons: Pleiotropic cellular mediators, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1992, 62: 18-24
4. Bornstein MB, Miller A, Slagle S, Weitzman M, Drexler E, Keilson M, Spada V, Weiss W, Appel S, Rolak L., A placebo-controlled, double-blind, randomized, two-center, pilot trial of Cop 1 in chronic progressive multiple sclerosis, *Neurology* 1991, 41: 533-539
5. Burnham JA, Wright RR, Dreisbach J. The effect of high-dose steroids on MRI gadolinium enhancement in acute demyelinating lesions, *Neurology* 1991, 41: 1349-1354
6. Currier RD, Haerer AF, Meydrech EF. Low dose oral methotrexate treatment of multiple sclerosis: a pilot study, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 1993, 56: 1217-1218
7. Goodkin DE, Rudick RA, VanderBrug Medendorp S. Low-dose (7,5 mg) oral methotrexate reduces rate of progression in chronic progressive multiple sclerosis, *Ann. Neurol.* 1995, 37: 30-40
8. Grieb P, Ryba M, Stelmasiak Z. Cladribine treatment of multiple sclerosis (Letter), *Lancet* 1994, 344: 538
9. Hartung HP, Heininger K. Non-specific mechanisms of inflammation and tissue in MS, *Res. Immunol.* 1989, 140: 226-233
10. Hartung HP, Toyka KV, Hohlfeld R. Behandlung der Multiplen Sklerose mit IFN-Beta, *Deutsches Ärzteblatt* 1991, 14: 965-970
11. Hartung HP, Hohlfeld R. Interferon-Beta zur Behandlung der schubförmig verlaufenden Multiplen Sklerose, *Nervenarzt* 1994, 65: 139-145
12. Hohlfeld R, Angstwurm H. 15 + Deoxyspergualin, eine Hoffnung für MS-Betroffene? *Nervenarzt* 1992, 63: 772
13. Hohlfeld R, Engelhardt D. Kortikosteroidtherapie bei Multipler Sklerose, *Nervenarzt* 1994, 65: 148
14. Hughes RAC. Treatment of multiple sclerosis with azathioprine. In: *Treatment of Multiple Sclerosis – Trial Design and Future Perspectives*; Rudick RA, Goodkin DE (eds.) London, Springer 1992, 157-172
15. Jacobs L, Cookfair D, Rudick R. Results of a phase III trial of i. m. recombinant Beta Interferon as treatment for MS, *J. Neuroimmunol.* 1994, 54, 170 (Abstract)
16. Kappos L, Theobald K, Hartung HP. 15 + Deoxyspergualin, eine Hoffnung für MS-Betroffene? *Nervenarzt* 1992, 63: 768-771
17. Kupersmith MJ, Kaufman D, Paty DW, Ebers G, McFarland H, Johnson K, Reingold S, Whitaker J. Megadose corticosteroids in multiple sclerosis, *Neurology* 1994, 44: 1-4
18. Martin R, McFarland HF, McFarlin DE. Immunological aspects of demyelinating diseases, *Ann. Rev. Immunol.* 1992, 10: 153-187
19. Michels R, Wessel K, Klöhn S, Kömpf D. Long-latency reflexes, somatosensory evoked potentials and transcranial magnetic stimulation: relation of the three methods in multiple sclerosis, *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 1993, 89: 235-241
20. Myers L. Treatment of multiple sclerosis with ACTH and corticosteroids: In: *Treatment of Multiple Sclerosis - Trial Design and Future Perspectives*; Rudick RA, Goodkin DE (eds.), London, Springer 1992, 135-156
21. Polman CH, Hartung HP. The treatment of multiple sclerosis: current and future *Current Opinion in Neurology* 1995, 8: 200-209
22. Poser CM, Paty DW, Scheinberg I. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines for research protocols, *Ann. Neurol.* 1983, 13: 227-231
23. Rumpf HJ, Wessel K. Copingmuster und Adaptivität bei multipler Sklerose, *Nervenarzt* 1995, 66: 624-629

24. Sipe JC, Romine JS, Koziol JA. Cladribine in the treatment of chronic progressive multiple sclerosis, *Lancet* 1994, 344: 9-13
25. Spuler S, Hohlfeld R. Aktuelle Therapie der multiplen Sklerose: Mitoxantron, *Nervenarzt* 1994, 65: 136-138
26. Steinbrecher A, Dichgans J, Martin R. Diagnostik und Therapie der multiplen Sklerose, *Nervenheilkunde* 1995, 180-188
27. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Neurology* 1993, 43: 655-661
28. Voltz R, Hohlfeld R. Aktuelle Therapie der multiplen Sklerose - Hochdosierte intravenöse Therapie mit Kortikosteroiden, *Nervenarzt* 1992, 63: 773-775
29. Weilbach FX, Hartung HP. Cladribin bei chronisch progredienter multipler Sklerose, *Nervenarzt* 1995, 66, 299-303
30. Weilbach FX, Voltz R, Hohlfeld R, Hartung HP. Copolymer-1 in der Therapie der multiplen Sklerose *Nervenarzt* 1995, 66, 473-477
31. Weilbach FX, Toyka KV, Hartung HP. Orales, niedrig dosiertes Methotrexat bei chronisch-progredienter multipler Sklerose, *Nervenarzt* 1995, 66: 643-647
32. Weiner HL, Mackin GA, Orav EJ. Intermittent cyclophosphamide pulse therapy in progressive multiple sclerosis: Final report of the Northeast Cooperative Multiple Sclerosis Treatment Group, *Neurology* 1993, 43: 910-918
33. Weinstock-Guttman B, Ransohoff RM, Kinkel RP, Rudick RA. The Interferons: Biological effects, mechanisms of action, and use in multiple sclerosis, *Ann. Neurol.* 1995, 37: 7-15
34. Wessel K, Rumpf HJ. Multiple Sklerose, *Bund-Verlag* 1992
35. Yudkin P, Ellison GW, Ghezzi A. Overview of azathioprine treatment in multiple sclerosis *Lancet* 1991, 338: 1051-1055

Redaktioneller Hinweis:

Das Gesamtinhaltsverzeichnis des Jahrgangs 12 (1995) FOCUS MUL erscheint in der Ausgabe 1/1996.

Ihr Vertrauen verpflichtet uns.



In der klinischen Ernährung vertrauen Sie seit Jahren auf Produkte der Salvia.

Eine komplette Palette an Infusionen, eine bedarfsgerechte Auswahl an Diätetika und zuverlässige Anwendungssysteme helfen Ihnen bei Ihrer täglichen Arbeit in der Klinik Erfolg zu haben.

Auch in Zukunft werden Sie sich darauf verlassen können.

Clintec Salvia setzt sich zum Ziel, die bisherige Kompetenz in der Klinik auszubauen und die Partnerschaft mit Ihnen weiter zu festigen.

Clintec Salvia bedeutet aber auch: Teilhabe an den Erkenntnissen der weltweiten Forschung, neue Impulse für eine moderne klinische Ernährung.

Clintec Salvia. Kompetent in der klinischen Ernährung. Ganz in Ihrem Sinne.


Clintec
SALVIA

Clintec Salvia GmbH & Co. OHG
Marketing und Produktinformation
Hertzstraße 10
69469 Weinheim