

Mechanismen der CD40/IL-4- abhängigen IgE-Regulation Produktion und funktionelle Bedeutung von $LT\alpha$

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach

Dermatologie und Venerologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Frau Dr. med. Margitta Worm

geb. am 25.10.64 in Berlin

Präsident: Prof. Dr. Dr. h. c. H. Meyer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Datum der Einreichung: 18.10.99

Datum der Habilitation: 13.06.00

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Ch. Neumann (Göttingen)

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. è.s sci. Th. Bieber (Bonn)

Abstrakt

IgE ist das Schlüsselmolekül Typ-I allergischer Erkrankungen.. Die Produktion von IgE wird durch die Interaktion des Oberflächenmoleküls CD40 auf B-Zellen mit seinem Liganden (CD40L), das von aktivierten T-Zellen exprimiert wird, sowie über Signale durch die Zytokine IL-4 oder IL-13 von B-Zellen produziert. Die CD40/IL-4-abhängige IgE-Produktion in vitro kann einerseits als Modell zum Verständnis der Entstehung allergischer Erkrankungen eingesetzt werden; andererseits können potenziell therapeutisch wirksame Substanzen untersucht werden. Untersuchungen zum Verständnis allergischer Erkrankungen zeigen, dass $LT\alpha$ nach CD40/IL-4-Stimulation von humanen B-Zellen vermehrt produziert wird und dies in autokriner Weise zu einer Steigerung der CD40/IL-4-vermittelten Proliferation und IgE-Produktion führt. Darüberhinaus wurde eine vermehrte Produktion von $LT\alpha$ bei allergischen Patienten nachgewiesen, so dass eine funktionelle Relevanz von $LT\alpha$ in der Pathogenese allergischer Erkrankungen zu vermuten ist. Die Arbeiten zu den intrazellulären Mechanismen der $LT\alpha$ -Induktion nach CD40/IL-4-Stimulation demonstrieren, dass sowohl der Transkriptionsfaktor NF- κ B als auch verschiedene Proteinkinasen hier eine wesentliche Rolle spielen. Untersuchungen mit Hilfe des CD40/IL-4-abhängigen Systems bei humanen B-Zellen, die einen therapeutischen Einsatz zur Behandlung allergischer Erkrankungen haben könnten, zeigen, dass Retinoide aber auch Vitamin D zu einer erheblichen Hemmung der IgE-Produktion in-vitro führen.

IgE-Produktion, B-Zellen, CD40, Lymphotoxin alpha

Abstract

IgE plays a key role for the development of type I related allergic diseases. Production of IgE by B cells is induced by the interaction of the surface molecule CD40 with its natural ligand (CD40L), which is expressed on activated T cells and signals which are provided by the cytokines IL-4 or IL-13. This model can be used for studies either to understand the development of allergic diseases or to investigate novel therapeutic approaches. In the context of the understanding the development of allergic diseases the present work shows that $LT\alpha$ is produced by B cells after CD40+IL-4 stimulation and that increased production of $LT\alpha$ results in enhanced CD40+IL-4 mediated B cell proliferation and IgE synthesis. Furthermore an increased production of $LT\alpha$ was shown in allergic patients indicating the potential role of $LT\alpha$ in allergic diseases. Analysis of the gene regulation of $LT\alpha$ after CD40 stimulation revealed an important role of the transcription factor NF- κ B and showed the role of different protein kinases at the intracellular level. Studies using the CD40+IL-4 system in vitro which may have a therapeutical impact revealed that vitamin A and vitamin D are potent inhibitors of IgE production in vitro. Taken together the present work shows new mechanisms of CD40+IL-4 mediated IgE synthesis and also offers new potential therapeutical approaches of allergic diseases.

IgE-production, B cells, CD40, lymphotoxin alpha

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von IgE bei atopischen Erkrankungen

1.1.1 Definition und klinische Erscheinungsbilder atopischer Erkrankungen

Der Begriff Atopie kommt aus dem Griechischen und bedeutet falscher Ort (a-topos). Eingeführt in die medizinische Terminologie wurde er 1923 von Coca und Cooke. Sie verwendeten den Begriff zur Beschreibung einer Überreaktion auf Einflüsse aus der Umgebung, die nur beim Menschen beobachtet wurde und häufiger innerhalb von Familien auftrat (Coca et al., 1923). Die familiäre Komponente atopischer Erkrankungen wurde bereits vorher von Besnier 1902 beschrieben, der das atopische Ekzem als 'prurigo diathesique' sowie Asthma bronchiale, Heuschnupfen und gastrointestinale Symptome innerhalb von Familien beobachtete.

Zu Erkrankungen des atopischen Formenkreises gehören die allergische Rhinitis, das allergische Asthma und die atopische Dermatitis (Leung et al., 1993a). Zu Kriterien für die Diagnose einer Atopie gehören u. a. der klinische Status, die genetische Disposition und die Erhöhung des Immunglobulins der Klasse E im Serum bei Betroffenen (Leung et al., 1993b). Insbesondere Patienten mit einer atopischen Dermatitis weisen häufig ausgesprochen hohe Serum-IgE-Spiegel auf.

1.1.2 Rolle des IgE-Moleküls bei atopischen Erkrankungen

Prausnitz und Küstner demonstrierten erstmals, daß es im Blut sensibilisierter Individuen einen Faktor gibt, der nach Übertragung auf nicht-allergische Spender zu einer Sensibilisierung führt (Prausnitz et al., 1921). 1966 wurde Immunglobulin E als verantwortlicher Faktor für diese reagine Aktivität von Seren allergischer Patienten identifiziert (Ishizaka et al., 1966). Es handelte sich um die Beschreibung eines zytophilen Antikörpers. Dieser konnte aufgrund der geringen Serumkonzentrationen mit den zur damaligen Zeit zur Verfügung stehenden Meßmethoden nicht genauer bestimmt werden. IgE wurde nach dem Erythem benannt, das Allergene in der Haut provozieren. In den folgenden Jahren gelang es mit verbesserten analytischen Techniken und der Verfügbarkeit durch einen Patienten mit einem IgE-Myelom das Protein detaillierter zu untersuchen (Johansson et al., 1968).

Der Aufbau des IgE-Moleküls unterscheidet sich von den anderen Immunglobulinen wie IgA, IgD oder IgG durch eine zusätzliche konstante Domäne (Cε1-Cε4). Es setzt sich aus einer schweren und leichten Kette zusammen (s. 1.2.2.) und kann über seinen Fc-Anteil (Cε3) an spezifische Rezeptoren binden (Abb. 1). Das Molekulargewicht von IgE beträgt 190.000 kD.

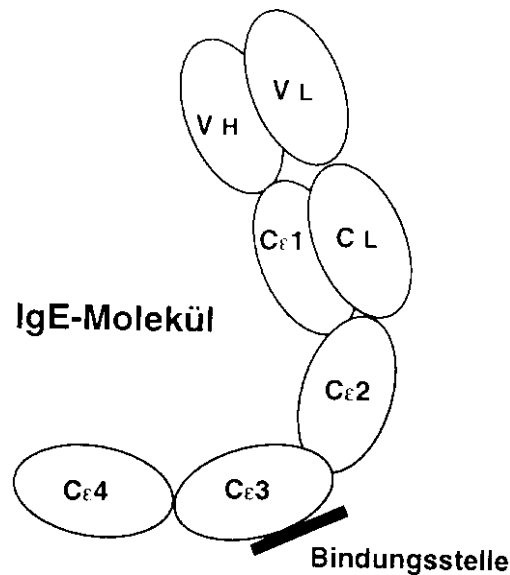


Abb. 1: Das IgE-Molekül bindet über Cε3-Bindungsstelle an seine Rezeptoren und wird aus vier konstanten Domänen der schweren Kette gebildet.

Die IgE-abhängige Stimulation gewebeständiger Mastzellen und im Blut zirkulierender basophiler Leukozyten vermittelt die Antwort des Immunsystems auf allergene Reize. Durch Bindung eines bestimmten Allergens an sein spezifisches IgE wird die Freisetzung einer Vielfalt von Mediatoren wie Histamin, Leukotrienen, Prostaglandinen und Proteasen induziert, die wiederum für die Symptome der Überempfindlichkeitsreaktionen vom Soforttyp verantwortlich sind (Abbas et al., 1994). Daneben werden zahlreiche Zytokine (IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, GM-CSF, CSF, TNF α , IFN γ) freigesetzt, die wiederum eine wichtige Rolle bei der Entstehung der allergischen Entzündungsreaktion spielen (Galli et al., 1993). Die IgE-abhängige Typ-I-Reaktion erfolgt über eine Aktivierung des hochaffinen IgE-Rezeptors, der von Mastzellen und basophilen Leukozyten exprimiert wird. Einzelne Ketten des hochaffinen IgE-Rezeptors wurden zuletzt auch auf anderen Zellen nachgewiesen. Hierzu gehören Langerhans-Zellen, bei denen funktionell aktive alpha- und gamma-Ketten des hochaffinen IgE-Rezeptors nachgewiesen wurden (Bieber et al., 1997). Auch eosinophile Granulozyten scheinen die alpha-Kette des hochaffinen IgE-Rezeptors zu exprimieren, wobei hier die funktionelle Bedeutung nicht endgültig geklärt ist (Capron et al., 1997). Die Überlegungen zur Pathogenese der atopischen Dermatitis wurden durch den Nachweis des hochaffinen IgE-Rezeptors auf Langerhans-Zellen erweitert (Bruynzeel-Koomen et al., 1986; Mudde et al., 1992; Grabbe et al., 1993). Nach dem derzeitigen Modell kommt es nach Allergenkontakt zu einer Zytokinfreisetzung durch Langerhans-Zellen, die lokal zu dem allergischen Entzündungsgeschehen beiträgt und andererseits über die Allergenpräsentation zu einer verstärkten Rekrutierung einer T-Zellantwort führt (Maurer et al., 1995).

Die unterschiedliche Reaktivität der Organe führt zu den verschiedenen Krankheitsbildern einer IgE-abhängigen Immunantwort: die allergische Rhinokonjunktivitis, das allergische Asthma, die Urtikaria und der anaphylaktische Schock sind klassische Manifestationen dieser Reaktionen (Abb. 2) (Abbas et al., 1994). Das Verständnis der Mechanismen der IgE-Synthese und ihrer Regulation trägt daher neben Untersuchungen zur T-Zellantwort zur Aufdeckung der Pathogenese allergischer Erkrankungen bei.

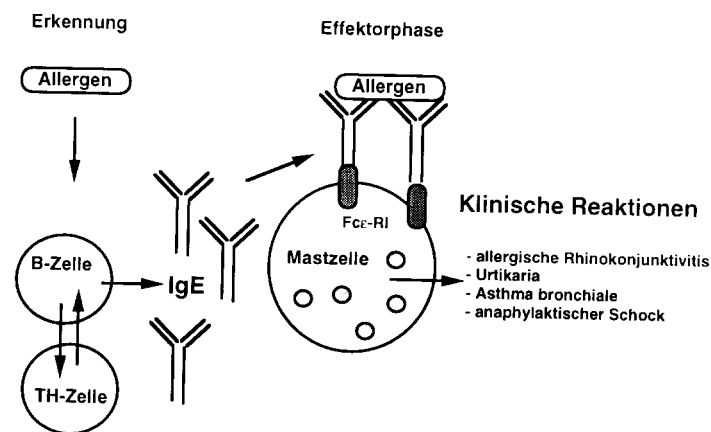


Abb. 2: Mechanismen der allergischen Reaktion vom Soforttyp.

1.2 Regulation der IgE-Produktion

1.2.1 Die 2-Signalthypothese der IgE-Produktion

Für die Induktion der IgE-Synthese bei humanen B-Zellen wird ein sogenanntes 2-Signal-Modell angenommen (Abb. 3) (Vercelli et al., 1989). Das erste Signal wird über die Zytokine IL-4 oder IL-13 vermittelt (s. 1.2.4.). Sie werden vornehmlich von T-Zellen, aber auch von Mastzellen und Basophilen produziert (Burd et al., 1995). Das zweite Signal für die Induktion der IgE-Synthese erfordert die zelluläre Interaktion zwischen T- und B-Zellen. CD40-Ligand (CD40L), der vor allem von T-Zellen exprimiert wird (s. 1.2.3.), bindet seinen Rezeptor, das B-Zell-Antigen CD40, und führt zur Umschaltung der Immunglobulinklassen, z. B. von IgM zu IgE oder zu IgG, in der Gegenwart von IL-4 (Vercelli et al., 1992). Die Schlüsselrolle der CD40-CD40L-Wechselwirkung für die Klassen-Umschaltung ist gesichert, während die Bedeutung anderer Zell-Zell-Interaktionen, z. B. durch Adhäsionsmoleküle, Gegenstand derzeitiger Forschung ist.

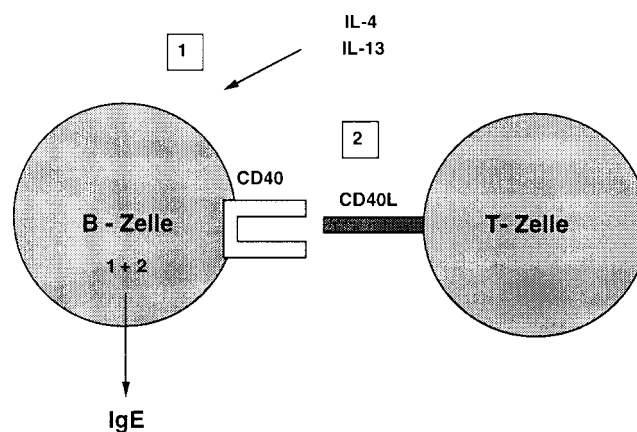


Abb. 3: Die IgE-Produktion wird über 2-Signale vermittelt.

1.2.2 Epsilon-Keimbahnprodukte und Klassenumschaltung

Alle Immunglobuline sind gleichartig aufgebaut. Sie setzen sich aus einer leichten und schweren Kette zusammen, die über eine Disulfid-Bindung miteinander verbunden sind. Das C-terminale Ende der schweren Kette besitzt eine konstante Aminosäuresequenz und bestimmt somit die Effektorfunktionen des Immunglobulin-Moleküls. Hierzu gehört die Bindung an Fc-Rezeptoren auf verschiedenen Zelltypen. Die Spezifität der Antigenbindung eines Immunglobulin-Moleküls wird durch die hochvariablen NH₂-Enden der leichten und schweren Kette bestimmt. Die variable Region des Ig-Moleküls wird durch Segmente (VDJ) der Keimbahn kodiert, die während der B-Zell-Differenzierung durch eine gemeinsame enzymatische Aktivität (Rekombinase) zu kompletten variablen V(D)J-Regionen zusammengesetzt werden (Oettinger et al., 1990).

Ein B-Lymphozyt ist während der Immunantwort in der Lage, verschiedene schwere Ketten (Isotypen) zu exprimieren, die dennoch dieselbe VDJ-Region besitzen. Dieser Prozess der schweren Kettenumschaltung ermöglicht es einem B-Zellklon, Antikörper mit der gleichen Spezifität der variablen Region zu produzieren, die aber mit verschiedenen schweren Ketten (CH)-Genen verknüpft sind. Somit werden Antikörper mit unterschiedlichen Effektorfunktionen erzeugt.

Vor der Isotypen-Umschaltung exprimieren B-Zellen IgM oder IgD auf ihrer Oberfläche. Die Umschaltung zu IgA, IgE oder IgG resultiert aus Rekombinationsprozessen, die ein schweres Ketten-Gen (CH) direkt hinter die V(D)J-Gene plaziert (Schatz et al., 1992). Die dazwischenliegenden Sequenzen, zu denen auch das vorher exprimierte schwere Ketten-Gen gehört, werden deletiert (Abb. 4).

Wenn B-Zellen die Umschaltung zu einer Immunglobulinklasse vollziehen, wird der dazugehörige CH-Genlocus zusammen mit einer spezifischen Umschaltsequenz (S) überschrieben. Die resultierende mRNA enthält nicht nur die für schwere Ketten kodierenden Exons, sondern auch ein 5' gelegenes, 100-500 bp langes Exon (Severinson et al., 1990). Dieses Exon (I-Exon) enthält Stopkodons im Leserahmen; somit wird die resultierende mRNA, das sogenannte Keimbahntranskript, nicht in ein Protein translatiert. Das Keimbahntranskript wird daher auch als steriles Transkript bezeichnet. Obwohl die sterilen Transkripte nicht in Proteine translatiert werden, spielen sie eine wichtige Rolle bei der Induktion der Klassenumschaltung. Die Deletion der I-Exon-Region von CH-epsilon, führte beispielsweise zu einer signifikanten Behinderung der Klassen-Umschaltung zu IgE (Bottaro et al., 1994). Die Regulation der Klassenumschaltung wird heute zahlreichen Molekülen, darunter Mitogenen und Zytokinen, zugeschrieben. Diese Moleküle kontrollieren die Umschaltung zu den einzelnen Immunglobulinklassen, indem sie die Zugänglichkeit einzelner Umschalt-Regionen (S) für die Rekombinase beeinflussen.

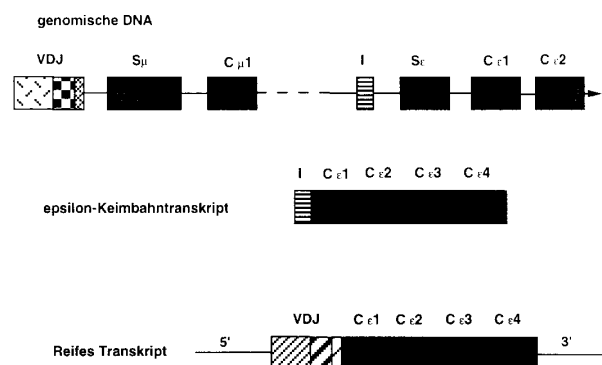


Abb. 4: Der Prozess der Klassenumschaltung zu IgE.

1.2.3 Bedeutung von CD40 für die Immunglobulinproduktion

CD40 ist ein 50 kD-Glykoprotein und wird auf B-Zellen, aber auch auf anderen Zelltypen wie endothelialen, epithelialen, dendritischen, monozytären oder auch malignen Zellen exprimiert (Alderson et al., 1993; Hess et al., 1995; Karmann et al., 1995). Es ist ein Typ-II transmembranes Protein und gehört zur NGF-TNF-Rezeptor-Familie. Die Aktivierung von CD40 spielt nicht nur eine wichtige Rolle für die Klassenumschaltung von B-Zellen, sondern fördert ihre Proliferation und Adhäsion in-vitro (Banchereau et al., 1991; Armittage et al., 1993; Barrett et al., 1991) und schützt die Zellen vor Apoptose in den Germinalzentren lymphatischer Organe (Liu et al., 1989; Han et al., 1995).

Der CD40-Ligand (CD40L oder CD154) ist ein 39 kD Glykoprotein und wird vornehmlich auf aktivierten T-Zellen und Mastzellen exprimiert (Gauchat et al., 1993; Lane et al., 1992). CD40L ist der natürliche Bindungspartner von CD40. Die entscheidende Rolle der intakten CD40-CD40L Interaktion für die B-Zellfunktion wurde durch Patienten mit x-chromosomal-erblichem Hyper-IgM-Syndrom demonstriert, bei denen aufgrund einer Mutation im CD40L-Gen kein funktionsfähiger CD40L exprimiert wird (Fuleihan et al., 1993; Korthäuer et al., 1993). Die B-Zellen dieser Patienten schalten nicht von IgM zu anderen Immunglobulin-Klassen. Klinisch leiden solche Patienten an rekurrenten bakteriellen Infektionen. Neuere Fallbeschreibungen berichten von Patienten mit Hyper-IgM-Syndrom, die zwar funktionsfähigen CD40L exprimieren, aber Defekte im CD40-Signalübertragungsweg aufweisen (Weiss et al., 1996). Es wurden vier Moleküle identifiziert, die zur Familie der TNF-assoziierten Faktoren (TRAF-2, TRAF-3, TRAF-5 und TRAF-6) gehören, die mit der intrazytoplasmatischen Domäne von CD40 assoziieren (Cheng et al., 1995; Ishida et al., 1996). Über diese Moleküle kommt es zur einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der nach CD40-Stimulation induziert wird (Berberich et al., 1994). Im epsilon-Keimbahntranskript-Promotor befindet sich eine Bindungssequenz für NF- κ B, dieser Transkriptionsfaktor scheint eine wichtige Rolle für die Isotypen-Umschaltung zu spielen. Arbeiten im Mausmodell bestätigen diese These, da NF- κ B (p50)-defiziente Mäuse nicht zur IgE-Produktion befähigt sind (Snapper et al., 1996). Zu anderen Signaltransduktionswegen, die nach CD40-Stimulation aktiviert werden, gehören die Phosphorylierung der Proteintyrosinkinasen lyn und syk (Faris et al., 1993). Sie spielen ebenfalls eine wichtige Rolle für die CD40-abhängige Induktion der IgE-Produktion; eine Hemmung dieses Signaltransduktionsweges resultiert in einer Reduktion der IgE-Synthese (Loh et al., 1995).

1.2.4 Rolle von IL-4 und IL-13 für die IgE-Produktion

IL-4 ist ein 18-20 kD Glykoprotein und spielt eine herausragende Bedeutung für die Klassen-Umschaltung zu IgE (Punnonen et al., 1993; Pene et al., 1988; Gauchat et al., 1991). Es wird von TH2-Zellen, NK1.1.-Zellen, Mastzellen und Basophilen produziert (Burd et al., 1995). Zuerst wurde im Mausmodell demonstriert, daß rekombinantes IL-4 die IgE-Produktion bei aktivierten B-Zellen induziert (Coffman et al., 1986). Weitere Studien zeigten, daß IL-4 auch beim Menschen für die Induktion der IgE-Synthese das entscheidene Zytokin darstellt.

Mit IL-13 wurde ein weiteres Zytokin identifiziert, das beim Menschen die Umschaltung zu IgE auslöst (Punnonen et al., 1993). Beide Faktoren können bei humanen B-Zellen epsilon-Keimbahn-transkripte induzieren und vermitteln das erste Signal für die Induktion der IgE-Synthese (Punnonen et al., 1994). Durch den Einsatz von Antagonisten gegen IL-4 und IL-13 wurde versucht, die IgE-Produktion zu hemmen. Ein genetisch verändertes IL-4-Protein, das mit hoher Affinität den IL-4-Rezeptor bindet, ohne ihn jedoch zu aktivieren,

hemmt nicht nur die IL-4-vermittelte, sondern auch die durch IL-13 induzierte IgE-Synthese in-vitro und in-vivo (Aversa et al., 1993; Carballido et al., 1995). Diese Daten weisen auf eine gemeinsame Rezeptorkomponente von IL-4 und IL-13 hin, und dies wurde in späteren Arbeiten bestätigt. So wurde gezeigt, daß die α -Kette des IL-4-Rezeptors die gemeinsame funktionelle Komponente der IL-4- und IL-13-Rezeptoren darstellt (Caput et al., 1996; Hilton et al., 1996, Gauchat et al., 1997).

Sowohl IL-4 als auch IL-13 führen zur Aktivierung von STAT6, einem Molekül aus der Familie der 'Signal-Transducer and Activator of Transcription' (Linehan et al., 1998; Kuperman et al., 1998). Der Transkriptionsfaktor STAT6 bildet Homodimere, die nach Aktivierung in den Kern translozieren, wo sie spezifische DNA-Sequenzen binden (TTCNNN(N)GAA), (Schindler et al., 1995). Auch der epsilon-Keimbahntranskript-Promotor besitzt neben Bindungsstellen für NF-kB und BSAP einen weiteren Transkriptionsfaktor (deMonte et al., 1997), eine Bindungsstelle für STAT6. Die besondere Bedeutung der STAT6-Aktivierung für die IgE-Produktion wurde durch die Tatsache deutlich, daß STAT6-defiziente Mäuse kein IgE mehr produzieren können (Shimoda et al., 1996). Ob eine pharmakologische Intervention über eine Hemmung von STAT6 eine neue Option zur Behandlung IgE-vermittelter Erkrankungen darstellt, werden zukünftige Untersuchungen klären.

1.2.5 Einfluss weiterer Moleküle auf die IgE-Produktion

Eine Beteiligung weiterer Mitglieder der NGF-TNF-Rezeptor-Familie, hierzu gehören neben CD40, TNF-RI/II und den NGF-Rezeptoren Tyk1 und Tyk2 auch FAS, OX-40 und CD27 bei der Induktion der IgE-Synthese, ist vermutlich auf Ähnlichkeiten dieser Moleküle im intrazellulären Anteil der Rezeptoren und über sogenannte gemeinsame TNF-Rezeptor-assoziierte Faktoren (TRAF's) zurückzuführen. Dies kann zur Aktivierung ähnlicher Signalübertragungswege und der Mobilisierung gemeinsamer Transkriptionsfaktoren führen, wie z. B. NF-kB.

So konnte eine Beteiligung von TNF α und dessen Rezeptoren CD120a und CD120b für die Induktion der IgE-Synthese durch Untersuchungen gezeigt werden, bei denen von T-Zellen exprimiertes membrangebundenes TNF α die IgE-Synthese in-vitro förderte (Aversa et al., 1993).

Kürzlich konnte gezeigt werden, daß auch die Interaktion von CD70 mit CD27, einem weiteren Molekül der NGF-TNF-Rezeptor-Familie, zu einer Steigerung der CD40+IL-4 abhängigen IgE-Synthese führt (Nagumo et al., 1998). Diese war allerdings nicht über eine Steigerung der epsilon-Keimbahntranskripte induziert, sondern über eine Hochregulation eines DNA-Bindungsfaktors und einer vermehrten Bildung von Plasmazellen.

Auch CD23, dem niedrigaffinen IgE-Rezeptor, wird eine Rolle bei der Regulation der IgE-Synthese zugeschrieben. CD23 wird auf einer Vielzahl von Zellen einschließlich B-Zellen, T-Zellen, einzelnen epithelialen Zellen des Thymus, folliculären dendritischen Zellen, Langerhans-Zellen, Monozyten, Eosinophilen und Thrombozyten exprimiert (Punnonen et al., 1992). Untersuchungen die gezeigt haben, daß spezifische anti-CD23-Antikörper sowohl die IL-4-vermittelte IgE-Produktion normaler humaner B-Zellen als auch die spontane IgE-Produktion von B-Zellen atopischer Patienten hemmen, heben die Bedeutung von CD23 oder seiner löslichen Fragmente für die IgE-Produktion hervor (Sarfati et al., 1988; Bonnefoy et al., 1990). Darüberhinaus wurde in-vivo nachgewiesen, daß CD23 die antigenspezifische IgE-Antwort in klassenselektiver Art moduliert (Flores-Romo et al., 1993). Die Bindung von anti-CD21 Antikörpern an B-zellständiges CD21 führte zur

Steigerung der IL-4-vermittelten IgE-Produktion in T-zellabhängigen wie T-zellunabhängigen Systemen mit rekombinantem, löslichem CD23 (Aubry et al., 1992). Da sowohl IL-4 als auch Allergene die CD23-Expression auf T-Zellen induzieren, ist es möglich, daß bei allergischen Patienten T-zellassoziertes CD23 mit B-zell-assoziertem CD21 interagiert und dadurch die IgE-Produktion verstärkt. Auch die löslichen Komponenten von CD23 und CD21, sCD23 und sCD21, können in die IgE-Regulation eingreifen. So konnte kürzlich gezeigt werden, daß lösliches CD21 über eine Komplexbildung mit sCD23 die IgE-Produktion hemmt (Fremaux-Bacchi et al., 1998).

Auch andere Zelloberflächenmoleküle wie z. B. die Adhäsionsmoleküle spielen eine Rolle bei der Interaktion zwischen T- und B-Zellen, die wiederum eine Schlüsselrolle für die Induktion der IgE-Synthese darstellt. Blockierende Antikörper gegen CD2, CD4 oder LFA-1 hemmen die IgE-Produktion von B-Zellen, die mit IL-4 und autologen T-Zellen stimuliert wurden (Vercelli et al., 1989). Auch die Bindung von CD58 (LFA-3) auf der B-Zell-Oberfläche konnte mit IL-4 stimulierten B-Zellen in Abwesenheit von T-Zellen oder anti-CD40 ein zweites Signal zur Induktion der IgE-Synthese liefern (Diaz-Sanchez et al., 1994). Diese Ergebnisse zeigen, daß weitere Moleküle neben CD40 für die Interaktion zwischen T- und B-Zellen ausreichen, um die IgE-Synthese in-vitro zu induzieren. Hierbei scheint die homotype B-Zell-Interaktion, wie sie nach CD40+IL-4 Stimulation auftritt, eine wichtige Rolle für die IgE-Produktion zu spielen. So konnte in-vitro gezeigt werden, daß über CD54-LFA-1 die IgE-Produktion von B-Zellen über eine Modulation der epsilon-Keimbahntranskripte beeinflusst wird (Katada et al., 1996). Da jedoch bei Patienten mit defekter CD40L-Expression oder defekter CD40-Signalübertragung, keine Umschaltung zu den Isotypen IgA, IgG oder IgE möglich ist, scheint die Interaktion anderer Moleküle in-vivo für eine Induktion der IgE-Synthese nicht auszureichen.

1.3 Modulation der IgE-Produktion

Zahlreiche Faktoren beeinflussen die IL-4- und IL-13-vermittelte IgE-Synthese (Abb. 5). Hierzu gehören sowohl Zytokine, Zellkontaktmoleküle, Hormone oder andere Mediatoren.

	Zytokine	Kontaktmoleküle
Verstärkung der IgE-Synthese	IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-15	CD23-CD21 CD28-CD86 CD58-CD2
Hemmung der IgE-Synthese	IL-8, IL-10, IL-12, IL-18 IFN α , IFN γ , TGF- β	CD54-LFA3

Abb. 5: Modulation der IgE-Produktion durch Zytokine und Kontaktmoleküle.

1.3.1 Modulation der IgE-Produktion durch Zytokine

Zytokine mit hemmender Wirkung auf die IL-4-vermittelte IgE-Synthese in-vitro umfassen IFN α , IFN γ , IL-8, IL-10, IL-12, IL-18 und TGF β (Pene et al., 1988; Kimata et al., 1992; Kiniwa et al., 1992; Punnonen et al., 1993; Wu et al., 1992; Yoshimoto et al., 1997). Die

Zytokine $IFN\alpha$ und $IFN\gamma$ reduzieren IgE-Serumspiegel auch in-vivo. Dies wurde aus einer Studie bei Patienten mit Hyper-IgE-Syndrom deutlich, bei der die Gabe von $IFN\alpha$ oder $IFN\gamma$ zu einer signifikanten, aber nur vorübergehenden Senkung des IgE-Serumspiegels geführt hat (Souillet et al., 1989). Dagegen konnte bei Patienten mit atopischer Dermatitis durch die Gabe von $IFN\alpha$ oder $IFN\gamma$ keine Hemmung der IgE-Produktion in-vivo bewirkt werden (MacKie et al., 1990; Reinhold et al., 1990). Die Zytokine IL-12 und IL-18 werden derzeit in Bezug auf ihre antiallergische Wirksamkeit experimentell weiter untersucht. So konnte kürzlich in einem Mausmodell gezeigt werden, daß die Applikation beider Zytokine in-vivo zu einer wesentlichen Verminderung der allergischen Entzündungsreaktion und der Serum-IgE-Spiegel führte (Hofstra et al., 1998). Untersuchungen beim Menschen liegen hier bislang nicht vor, sind aber Gegenstand derzeitiger Forschung.

Zu Zytokinen, die die IgE-Produktion in-vitro fördern, gehören $TNF\alpha$, IL-2, IL-5, IL-6, IL-7 und IL-15 (Aversa et al., 1993; Jeannin et al., 1998; Pene et al., 1988; Vercelli et al., 1989). Ihre Wirkung auf die IgE-Produktion beruht teilweise auf einer direkten Aktivierung der epsilon-Keimbahntranskripte, und teilweise auf indirekten Wirkungen wie z. B. der Hochregulation von CD23.

1.3.2 Modulation der IgE-Produktion über Zell-Kontaktmoleküle

Neben den Zytokinen gibt es weitere Moleküle, die einen spezifischen Einfluss auf die IgE-Produktion haben können. Dies weist auf ein komplexes System im Rahmen der Homeostase des Organismus hin.

So können die Rezeptoren der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, CD28 und CTLA-4, am Prozeß der Klassen-Umschaltung indirekt beteiligt sein. Die Daten einer ersten Arbeit bezüglich dieser Fragestellung ergaben, daß anti-CD28 Antikörper bei B-Zellen, die durch allergenspezifische humane T-Zellen stimuliert wurden, die IgE-Produktion dosisabhängig hemmen, nicht aber die Produktion von IgG (Life et al., 1995). Eine spätere Arbeit konnte zeigen, daß CD86 bei allergischen Individuen nicht nur verstärkt exprimiert wird, sondern dass diese CD86 positiven B-Zellen auch vermehrt IgE produzieren (Jirapongsananuruk et al., 1998). Auch die Ergebnisse einer eigenen Untersuchung demonstrieren, daß in Gegenwart sowohl von anti-CD28 als auch anti-CTLA-4 die CD40+IL-4 abhängige Induktion der IgE-Produktion signifikant moduliert wird (Oberwalleney et al., 1999).

1.3.3 Modulation der IgE-Synthese über weitere Moleküle

Auch Hormone können eine Rolle für die IgE-Antwort spielen. So wurde gezeigt, daß Hydrokortison in Kombination mit IL-4 die IgE-Synthese bei humanen B-Zellen aus dem peripheren Blut induziert (Jabara et al., 1991). Dies wurde auch in-vivo beobachtet. So konnte bei Patienten mit allergischem Asthma durch eine systemische Steroidbehandlung ein Anstieg der Serum-IgE-Spiegel nachgewiesen werden (Zieg et al., 1994). Der Effekt von Steroiden auf die IgE-Synthese scheint selektiv zu sein, da andere Hormone, darunter Testosteron, Progesteron, Östradiol, Aldosteron, Gonadotropin und Prolaktin, die spontane IgE-Synthese bei atopischen Patienten nicht beeinflussen konnten (Kimata et al., 1995). Jedoch wurde in einer kürzlich erschienenen Arbeit gezeigt, daß β -Östradiol- und Progesteron in Konzentrationen, wie sie während Schwangerschaft auftreten, zu einer Steigerung der IgE-Produktion führten (Hamano et al., 1998).

Auch Neuropeptide sind in der Lage, die IgE-Synthese zu modulieren. Durch die Zugabe von ACTH zu humanen Leukozyten kann die IgE-Synthese in-vitro dosisabhängig sowohl gefördert als auch gehemmt werden (Kimata et al., 1993). Ähnliche Wirkungen zeigten der Corticotropin-releasing-factor (CRF), der ACTH induziert, sowie α -MSH, ein Spaltprodukt von ACTH. Auch die Neuropeptide vasointestinales Peptid, Somatostatin und Substanz P hemmen in Gegenwart von T-Zellen oder Monozyten die IgE-Synthese spezifisch (Kimata et al., 1993). Da diese Studien nicht mit aufgereinigten B-Zellen durchgeführt wurden, können indirekte Effekte auf die Zytokin-Produktion anderer Leukozyten z. B. T-Zellen oder Monozyten, nicht ausgeschlossen werden. Die Effekte der Neuropeptide auf die IgE-Produktion sind letztlich nicht eindeutig geklärt. In einer weiteren Arbeit wurde eine Steigerung der IgE-Produktion, aber auch anderer Immunglobuline durch Substanz P nachgewiesen (Aebischer et al., 1996). In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, daß NGF, das auch zur TNF-Rezeptor Familie gehört und Homologien zu CD40 besitzt, die B-Zellfunktion beeinflussen kann. Allerdings wurde hier ein negativer Einfluss auf die IgE-Produktion gefunden, während die Proliferation der B-Zellen gesteigert wurde (Brodie et al., 1996).

Weitere immunregulatorische Moleküle wie Prostaglandine und Ganglioside können ebenfalls die IgE-Synthese beeinflussen. Ganglioside werden ubiquitär auf Membranen gefunden, und Kimata et al. (1995) haben demonstriert, daß die Ganglioside GM2 und GM3 die IgE-Produktion in-vitro hemmen, indem sie die endogene $\text{TNF}\alpha$ -Bildung unterdrücken. In einer Studie über die Effekte von Prostaglandin E2 auf die B-Zell-Proliferation und -Differenzierung wurde gezeigt, daß Prostaglandin E2 zwar die IL-4-abhängige B-Zell-Proliferation fördert, die IL-4-induzierte IgE-Synthese jedoch hemmt (Garrone et al., 1994). Dagegen scheint im Mausmodell die IgE-Produktion über eine Steigerung der epsilon-Keimbahntranskripte durch Prostaglandin E gesteigert zu werden (Roper et al., 1995).

Kürzlich wurde gezeigt, daß auch Protease-Inhibitoren wie alpha-1-Antitrypsin die IgE-Produktion in-vitro steigern können (Jeannin et al., 1998). Dieser Effekt ist möglicherweise über eine veränderte Abspaltung von CD23 vermittelt, da sCD23 die IgE-Produktion wesentlich fördert. Diese Befunde sind von wesentlichem Interesse, da bekannt ist, daß typische Allergene, wie z. B. das Majorallergen der Hausstaubmilben (Der p I), proteolytische Aktivitäten besitzen.

Zusammenfassend demonstrieren diese Arbeiten, daß die Produktion von IgE in humanen B-Zellen durch zahlreiche Faktoren moduliert wird und somit einer Vielzahl immunologischer, aber auch hormoneller und neuronaler Wechselwirkungen unterliegt.

1.4 Lymphotoxin alpha ($\text{LT}\alpha$) und allergische Erkrankungen

$\text{LT}\alpha$ existiert in verschiedenen Formen, einerseits als lösliches trimerisches Protein, das wie $\text{TNF}\alpha$ die TNF-Rezeptoren CD120a und CD120b bindet, andererseits als membrangebundene Form, die einen kürzlich identifizierten Rezeptor, den $\text{LT}\beta$ -R, bindet (Browning et al., 1993). Die membrangebundene Form von $\text{LT}\alpha$ ist immer mit einem weiteren membranständigem Glykoprotein assoziiert, dem $\text{LT}\beta$. Es werden verschiedene Formen membrangebundener $\text{LT}\alpha/\beta$ -Komplexe unterschieden: $\text{LT}\alpha_2/\beta_1$, das nicht nur $\text{LT}\beta$ -R, sondern auch die TNF-Rezeptoren RI und RII bindet und $\text{LT}\alpha_1/\beta_2$, das wie $\text{LT}\beta_3$ nur an den $\text{LT}\beta$ -R bindet (Abb. 6). Ein intaktes System der $\text{LT}\alpha$ - $\text{LT}\beta$ -Rezeptor-Interaktion ist Voraussetzung für die regelrechte Ausbildung lymphatischer Organe, wie mittels $\text{LT}\alpha$ und $\text{LT}\beta$ bzw. $\text{LT}\beta$ -Rezeptor-defizienter Mäuse demonstriert werden konnte (de Togni et

al., 1993; Alimshanov et al., 1997). Darüberhinaus wurden bei $\text{TNF}\alpha$ - und $\text{LT}\alpha$ -doppeldefizienten Mäusen eine deutliche Verminderung der Klassenumschaltung nachgewiesen, mit folgender verminderter Immunantwort (Ryffel et al., 1997). Ob lösliches oder membranständiges $\text{LT}\alpha$ eine Bedeutung für allergische Erkrankungen hat, ist nicht bekannt. Da jedoch in vorhergehenden Arbeiten gezeigt wurde, daß $\text{TNF}\alpha$ mit IL-4 die Produktion von $\text{C}\epsilon$ -Keimbahntranskripten sowie die IgE-Synthese selbst in einem $\text{CD40}+\text{IL-4}$ abhängigem System steigern kann (Aversa et al., 1993; Gauchat et al., 1991), ist auch eine Bedeutung von zumindest $\text{sLT}\alpha$ zu vermuten, da dieses Zytokin wie $\text{TNF}\alpha$ auch die TNF -Rezeptoren CD120a und CD120b bindet. Die Bedeutung von $\text{LT}\beta$ und $\text{LT}\beta$ -Rezeptor-Interaktionen für die IgE-Produktion oder allergische Erkrankungen ist nicht bekannt.

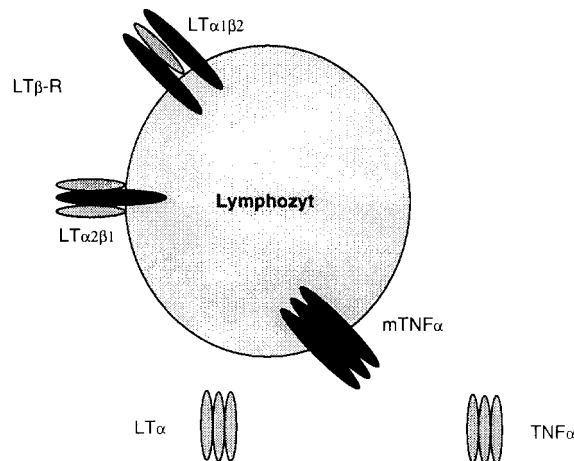


Abb. 6: Verschiedene Formen von löslichem und membrangebundenem $\text{TNF}\alpha$ und $\text{LT}\alpha$.

1.4.1 Produktion von Lymphotoxin alpha

Nach mitogener Stimulation produzieren Lymphozyten, einschließlich B-Zellen, die Zytokine $\text{TNF}\alpha$ und $\text{LT}\alpha$ (Sung et al., 1988; Sung et al., 1989). Kürzlich wurde gezeigt, daß offensichtlich insbesondere naive T-Zellen, auch im Vergleich zu B-Zellen, sehr große $\text{LT}\alpha$ Mengen bilden können, obgleich die physiologische Bedeutung dieser Befunde bislang nicht geklärt ist (Oshima et al., 1999).

1.4.2 Wirkungen von $\text{LT}\alpha$ auf Lymphozyten

In mehreren anderen Arbeiten wurde demonstriert, dass $\text{TNF}\alpha$ und $\text{LT}\alpha$ als autokrine Faktoren für die B-Zellproliferation eine wichtige Rolle spielen (Kehrl et al., 1987; Kehrl et al., 1987). Dies wird durch Befunde unterstrichen die zeigen, dass $\text{LT}\alpha$ eine wichtige Rolle für autonom proliferierende B-Zellen bei der chronischen lymphatischen Leukämie und anderen B-Zell-Malignomen spielt (Kulmburg et al., 1998).

Neben der Bedeutung von $\text{LT}\alpha$ für die Proliferation von Lymphozyten spielt die Interaktion zwischen membrangebundenen $\text{LT}\alpha/\beta$ -Komplexen und $\text{LT}\beta$ -R eine wichtige Rolle bei der lymphatischen Neogenese und der Ausbildung germinaler Zentren (s.o.). Darüberhinaus konnte kürzlich gezeigt werden, dass $\text{sLT}\alpha$ Chemokine und Adhäsionsmoleküle induzieren kann (Cuff et al., 1998) und somit im Rahmen von Entzündungsgeschehen erheblich potenzierend wirken kann.

1.5 Ansätze der Allergiebehandlung über Hemmung der IgE-Produktion

Die Behandlung allergischer Erkrankungen stützt sich neben der Allergenkenz auf symptomatische, medikamentöse Maßnahmen sowie die spezifische Immuntherapie, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.

Die medikamentösen Maßnahmen zielen z. B. auf eine Hemmung der Mastzellmediatorfreisetzung mit Dinatriumcromoglycinsäure (DNCG). Mit dieser Substanz konnte in-vitro darüberhinaus eine Hemmung der IgE-Produktion nachgewiesen werden (Loh et al., 1994). Ob diese Wirkung im Rahmen einer Lokalbehandlung mit DNCG zum Tragen kommt, ist jedoch nicht bekannt.

Zu anderen symptomatischen, medikamentösen Maßnahmen gehören die Blockade von Entzündungsmediatoren z. B. mit Antihistaminika oder Leukotrienantagonisten, während Glukokortikoide (GK) die Entzündungsreaktion unspezifisch unterdrücken. GK binden ihren zytoplasmatisch gelegenen Glukokortikoidrezeptor, der in den Nukleus transloziert und durch Bindung an bestimmte Sequenzen die Transkription von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und diversen anderen Proteinen hemmt. Aktuelle Untersuchungen haben gezeigt, daß GK einen Faktor (IkB) hochregulieren, der wiederum den Transkriptionsfaktor NF-kB in der Zelle bindet. Da dieser Transkriptionsfaktor bei der molekularen Regulation einer Reihe von Zytokinen wie IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IFN γ und TNF α eine wichtige Rolle spielt, ist die Hemmung von NF-kB als ein wichtiger Mechanismus zur anti-inflammatorischen Wirkung der GK zu sehen (Scheinman et al., 1995). Daneben induzieren GK Apoptose bei Lymphozyten und reduzieren Eosinophile im peripheren Blut. (Barnes et al., 1993). Bei Patienten, die systemisch mit GK über einen längeren Zeitraum behandelt wurden, findet man jedoch einen Anstieg der IgE-Spiegel (Zieg et al., 1994), so daß die Wirkung der GK bei der Behandlung allergischer Erkrankungen nicht auf eine Modulation der IgE-Produktion zurückzuführen ist.

1.5.1 Einsatz von anti-IgE Antikörpern

Da IgE über Bindung der Fc-epsilon-Rezeptoren das Verbindungsglied zwischen Allergenexposition und Freisetzung von Mediatoren aus den Effektorzellen darstellt, war es ein möglicher Ansatz, einen IgE-blockierenden Antikörper herzustellen. Anforderungen an solch einen Antikörper sind, trotz Bindung an die Fc-epsilon-Rezeptoren keine Mastzelldegranulation zu bewirken oder eine Immunantwort auszulösen. Dies wurde durch die Herstellung eines humanisierten chimerischen Antikörpers bewerkstelligt (Jardieu et al., 1995). Die klinische Anwendung dieses Antikörpers befindet sich derzeit noch in der Studienphase. Bislang wurden in einer Phase II-Studie Patienten mit allergischem Asthma über einen Zeitraum von 12 Wochen behandelt. Die Gabe dieser Antikörper senkte nicht nur die Serum-IgE-Spiegel, sondern erhöhte auch statistisch signifikant die Schwelle für die Auslösung einer asthmatischen Frühreaktion auf Allergene (Cockcroft et al., 1996). Derzeit werden weitere Studien mit höheren Fallzahlen und über einen längeren Zeitraum durchgeführt, um die Effizienz der anti-IgE Antikörper zur Behandlung des allergischen Asthma zu beweisen.

1.5.2 Einsatz von Retinoiden und Vitamin D

Retinoide und Vitamin D sind wie Glukokortikoide Substanzen mit einem breiten Spektrum an Wirkungsmechanismen, die über verschiedene Zelltypen vermittelt werden und auch T- und B-Zellen einschließt (Blomhoff et al., 1994).

In früheren Arbeiten am Mausmodell wurde gezeigt, daß Retinoide Einfluß auf die IgE-Spiegel im Serum haben können (Barrett et al., 1982). Die Bedeutung dieser Substanzklasse sowie des Vitamin D für die IgE-Synthese beim Menschen ist weder in-vitro noch in-vivo bekannt.

1.6 Fragestellung

Da die Stimulation von B-Zellen via CD40 neben der Induktion der IgE-Synthese auch die B-Zellproliferation steigert (Rousset et al., 1991), war es Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen, den Einfluss von CD40 auf die Transkription und die Proteinsynthese von $\text{TNF}\alpha$, $\text{LT}\alpha$ und $\text{LT}\beta$ zu studieren. Nachdem diese Arbeiten zeigten, dass $\text{TNF}\alpha$ schwach und $\text{LT}\alpha$ stark nach CD40 Stimulation humaner B-Zellen induziert wurde (Worm et al., 1994), wurden in den folgenden Untersuchungen die Mechanismen dieser Induktion näher analysiert. Hierzu gehörte sowohl die Untersuchung der beteiligten Signaltransduktionswege (Worm et al., 1995), als auch die Untersuchung der Genregulation von $\text{LT}\alpha$ (Worm et al. 1998). Schließlich wurde die funktionelle Bedeutung von $\text{LT}\alpha$ für die B-Zellproliferation und Immunglobulinproduktion im Vergleich zu $\text{TNF}\alpha$ sowohl bei Normalpersonen als auch bei Allergikern untersucht (Worm et al., 1998).

Darüberhinaus wurde mit Hilfe der anti-CD40+IL-4 Stimulation, die in einer Induktion der IgE-Synthese resultiert, in-vitro untersucht, ob Retinoide oder Vitamin D die IgE-Produktion hemmen können (Worm et al., 1998). Beide Substanzen gehören zur Steroidhormongruppe, und ihre breite immunmodulatorische Wirkung legte die Frage nahe, ob sie zur Behandlung allergischer Erkrankungen, bei denen eine Störung der Immunantwort eine wichtige pathogenetische Rolle spielt, nützlich sein könnten. Somit würde die Grundlage für neue Therapieoptionen zur Behandlung allergischer Erkrankungen entstehen.

2 Materialien und Methoden

Der monoklonale Antikörper gegen das B-Zellantigen CD40 wurde durch Aufreinigung von Aszites von BALB C 626.1 Hybridoma-transfizierten Mäusen gewonnen (RS Geha, Children's Hospital, Boston, USA). IL-4, TNF α und LT α sowie anti-TNF α und anti-LT α waren von R&D (Minneapolis, USA); PMA, Calcium-Ionophor (Calbiochem), Actinomycin und Cycloheximid, all-trans und 13-cis Retinsäure (Sigma, Dreieich) waren kommerziell verfügbar. Vitamin D wurde freundlicherweise von der Firma Leo (Dänemark) zur Verfügung gestellt.

Die Isolierung der B-Zellen erfolgte aus Tonsillen oder aus Buffy coats von Blutspenden nicht-allergischer und allergischer Spender.

2.1 Zellaufreinigung

Für die Versuche zur Induktion von LT α und TNF α bei humanen B-Zellen über die Stimulation mit anti-CD40 wurden B-Zellen aus Tonsillen von OP-Präparaten nach einer Ficoll-Hypaque Trennung zur Gewinnung der lymphozytären Fraktion mittels des Schafserythrozyten-Rosetting, das in einer T-Zelldepletion resultiert, durchgeführt. Nach 2-4 h Inkubation können die E-negativen Zellfraktionen durch eine weitere Ficoll-Hypaque Trennung wiedergewonnen werden. Eine Wiederholung dieses Verfahrens ermöglicht eine >95% Aufreinigung der B-Zellen von frisch aufbereiteten Präparaten (Kontrolle über B-Zell-spezifische Färbung mit z.B. anti-CD20).

Die Aufreinigung von peripheren mononukleären Blutzellen erfordert zusätzliche Verfahren. Die Aufreinigung peripherer B-Zellen wurde erfolgreich mittels magnetgekoppelter CD19-Antikörper etabliert. Dies ermöglicht eine Reinheit der aufgereinigten Zellen von über 99%.

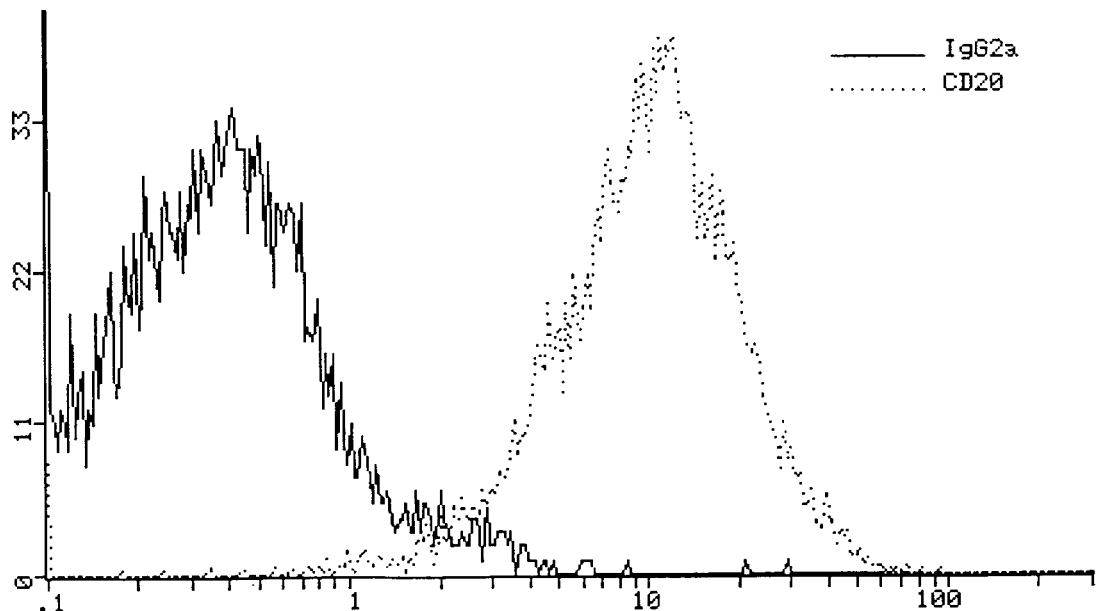


Abb. 7: Durchflußzytometrie aufgereinigter B-Zellen mittels anti-CD20 Markierung.

2.2 Northernblot zur Untersuchung von mRNA

Die Isolation der gesamten RNA erfolgte nach Lyse der Zellen (2×10^7) in hochmolarer Guanidium-Isothiocyanat Lösung durch Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation für 16 h (35.000 rpm). Nach photometrischer Mengenbestimmung wurden je Probe 5 µg RNA auf ein formaldehydhaltiges 1.5% Agarose Gel aufgetragen. Die Gele wurden nach elektrophoretischer Trennung der RNA für 3 h bei 120V durch Kapillarblotting auf eine Nitrozellulose übertragen. Die Nitrozellulose-Membranen wurden zur Hybridisierung mit den entsprechenden cDNA Proben eingesetzt.

Die cDNA für TNF α , LT α (Firma Genentech) und LT β (von J. Browning Cambridge, MA) wurden mit P³² dCTP (NEN, Boston, MA) endständig markiert und mit den Filtern hybridisiert. Anschließend wurden die Nitrozellulose-Membranen unter stringenten Bedingungen gewaschen (2x 30 min mit 2xSSC+ 0.01% SDS, 2x 30 min 0.2xSSC+ 0.01% SDS) und auf Kodak XAR Filmen exponiert.

2.3 Durchflußzytometrie zur Untersuchung membranständiger Proteine

Zur Bestimmung von membrangebundenem TNF α (mTNF α) wurde ein FITC-konjugierter, kommerziell verfügbarer mAK (R&D Systems) eingesetzt; ein Antikörper gleicher Subklasse (IgG1) wurde als Kontrolle mitgeführt.

Zur Markierung des membrangebundenen LT α (mLT α) wurde ein von J. Browning zur Verfügung gestellter monoklonaler Antikörper biotinyliert und mit einem Streptavidin-Komplex konjugiertem-Phycoerythrin (R&D Systems) markiert. Die Titration zur Bestimmung der optimalen Konzentration von biotinyliertem LT α wurde an der mLT α positiven T-Zell-Linie (HUT 78) durchgeführt. Ein biotinylierter Antikörper gleicher Subklasse (IgG2a) diente als Kontrolle.

Die Markierung erfolgte mit 5×10^5 Zellen je Probe durch eine Inkubation (45 min) mit dem Primärantikörper (anti-LT α) in 2% boviner Albuminlösung und 0,01% Natriumazid, gefolgt von einer Inkubation mit dem PE-markiertem Streptavidin Komplex für 45 min. Nach 2 Waschvorgängen mit PBS wurden die Zellen in 2%iger Paraformaldehydlösung fixiert und innerhalb von 72 h analysiert. Zur Analyse wurde ein Becton&Dickinson Durchflußzytometer eingesetzt, die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe eines computergesteuerten Programmes (LYSYS).

2.4 Bestimmung der sezernierten Proteine mittels ELISA

Zur Bestimmung der sezernierten Proteine (sTNF α , sLT α) wurden die Kulturüberstände von nicht-stimulierten und stimulierten B-Zellen (5×10^6 /ml) mit Hilfe kommerziell verfügbarer enzymgekoppelter Immunoassays (ELISA) bestimmt.

2.5 Herstellung der Konstrukte

2.5.1 Präparation von genomischer B-Zell DNA

Nach der Gewinnung der humanen B-Zellen aus Tonsillen wurden die Zellen in einer SDS-haltigen (inaktiviert endogene DNAsen) Lösung lysiert und für 6 h bei 56°C mit Proteinase K behandelt. Die Proteinase K Behandlung führt zu einem Verdau der zellulären Proteine. Nach wiederholter Phenol-Chloroform Extraktion wird der Überstand mit RNase behandelt, um die zelluläre RNA zu entfernen. Nach anschließender Ethanol-

Präzipitation kann die genomische DNA in einem gewünschten Volumen resuspendiert werden. Für die PCR werden zwischen 100 und 500 ng eingesetzt. Der Reinheitsgrad der genomischen DNA ist für den Erfolg der PCR ausschlaggebend.

2.5.2 Gewinnung der 5'-Region von LT α mittels PCR

Genomische DNA enthält im Vergleich zu cDNA als Template nur eine begrenzte Anzahl des gewünschten DNA Abschnittes. Daher wurde die PCR als quadrat-PCR durchgeführt. Hierzu wird eine zweite PCR mit dem Produkt der ersten PCR durchgeführt. Die dafür eingesetzten Primer liegen innerhalb des ersten PCR- Produktes. Neben der Erhöhung der Amplifikation kann dadurch eine Erhöhung der Spezifität erreicht werden. Da die 5'-Region von LT α ca 1,6 kB umfaßt (Nedwin et al., 1985), die PCR aber für Produkte zwischen 100-1000 bp wesentlich einfacher zum Erfolg führt, wurde die gewünschte Region in 2 Abschnitte aufgeteilt (ca. 700 und 900 bp), die separat durch die PCR amplifiziert und anschließend ligiert wurden. Die folgenden Primer wurden hierzu eingesetzt:

	Sense		Antisense
A	-1195--1166	B	515-494
C	-1163--1127	D	488-457
E	-506- -471	F	-434--458
A C		E F	D B
		I	
<hr style="border: 0.5px solid black;"/> AccI			

PCR-Design

- 1- A+F, dann C+F, erwartetes Produkt 737 und 705 bp
- 2- E+B, dann E+D, erwartetes Produkt 1021 und 994 bp

Die erhaltene DNA wurde dann über ein Gel isoliert und anschließend kloniert. Die beiden DNA-Stücke konnten über die gemeinsam vorhandene ACC I Schnittstelle ligiert werden. Das nun vollständige Produkt wurde anschließend in den Expressionsvektor PGL1-basic über die SAC I und Xho I Restriktionsenzym-Stellen eingebracht. Um die Aktivität der 5'-LT α Region näher zu charakterisieren, wurden ausgehend von der 1699 bp umfassenden Region mittels PCR kürzere DNA-Abschnitte generiert. Dies ist eine in der Molekularbiologie weit verbreitete Technik, um die Promotor-Regionen von Genen näher zu charakterisieren. Es wurden die folgenden Konstrukte mittels PCR hergestellt:

1152 bp 922 bp 743bp 363 bp 272 bp
192 bp 157 bp 127 bp und 59 bp

Ein ca. 50 bp kleines DNA Stück mittels PCR herzustellen ist schwierig; daher wurde dieser Abschnitt mittels eines synthetisch hergestellten Oligonukleotids generiert. Das Oligonukleotid wurde mit den Restriktionsenzymseiten von SAC I und Xho I flankiert, so daß das Oligonukleotid nach Phosphorylierung direkt in den Expressionsvektor kloniert werden konnte.

Die 5'-Region von LT α enthält DNA-Abschnitte, deren Sequenzen potentielle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 darstellen. Das Design der Konstrukte wurde entsprechend ausgewählt. Jedes neu hergestellte Produkt wurde in den TA-Vektor kloniert, sequenziert und anschließend in den Luciferase-Vektor subkloniert. Von den entsprechenden Klonen wurden große Mengen Plasmid-Präparationen durchgeführt, und anschließend wurde der DNA-Gehalt photometrisch bestimmt. Die durch die PCR neu generierten Konstrukte der 5'-Region von LT α und ihre anschließende Klonierung in den Expressionsvektor erlauben die in-vitro Analyse der Promotor-Aktivität von LT α .

Die hergestellten Konstrukte wurden in B-Zell-Linien (Daudi und Raji) transient transfiziert (DEAE-Dextran, Pharmacia), und ihre Aktivität wurde nach Stimulation durch ein Reportergen gemessen. Das gewählte Reportergen war Luciferase (Promega). Luciferase ist ein Enzym, daß das Substrat Luciferin oxidiert. Bei dieser Reaktion kommt es zu einer Freisetzung von Photonen, die mit einem entsprechendem Meßgerät (Luminometer) detektiert werden. Die erhaltenen Daten müssen korrigiert werden, da die Proliferation der Zellen (stimuliert versus unstimuliert) während des Untersuchungszeitraumes sowie eine unterschiedliche Transfektionseffizienz pro Zelle die gemessene Aktivität beeinflussen. Hierzu wurde der Proteingehalt jeder Probe photometrisch gemessen. Der resultierende Quotient aus Luminometer-Messung und Proteingehalt wird als Relative-Luminescence-Unit (RLU/ μ g Protein) angegeben.

2.6 Gelshiftanalysen

Zur Bestimmung der Transkriptionsfaktoren, die nach anti-CD40+IL-4 Stimulation aktiviert werden, wurden nukleäre Extrakte humaner B-Zellen nach CD40+IL-4 Stimulation für 2 h hergestellt, die anschließend mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden, die die entsprechenden Transkriptionsfaktoren binden, inkubiert und auf einem Gel aufgetragen. Die Spezifität der Bindungen wurde mit Hilfe nicht markierter Oligonukleotide bzw. mutierter Oligonukleotide oder auch Antikörper gegen den entsprechenden Transkriptionsfaktor überprüft.

2.7 Proliferationsassay

Die Proliferationsassays (3 Tage) wurden mittels radioaktiv markierten Thymidins (0.5 μ Curie pro Loch) durchgeführt, das über 16 h der Inkubation den Zellen zugegeben wurde. Die Zellen wurden auf Filterpapier geerntet und der Thymidineinbau mittels Szintillationsspektroskopie gemessen. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und Mittelwerte \pm SEM berechnet.

2.8 Immunglobulinbestimmung

Zur Messung des in-vitro produzierten IgE wurden die Zellen für 10 Tage kultiviert und das IgE in den Überständen mittels eines ELISA gemessen. Die Antikörper für den IgE-Assay wurden freundlicherweise von Prof. Robert Hamilton, Asthma und Allergiezentrum, Johns Hopkins Universität, Baltimore (USA) zur Verfügung gestellt.

Nach beschichten der Platten mit HP6061 und blocken mit PBS/BSA erfolgte die Zugabe des Standards und der Proben. Nach Zugabe des biotinylierten Sekundärantikörpers HP6029 und anschließendem Waschen erfolgte die Farbreaktion über Streptavidin-konjugierte alkalische Phosphatase. Die Proben wurden photometrisch bei 405 nm bestimmt und die Berechnung der Werte erfolgte über die Standardkurve.

Die Bestimmung der übrigen Immunglobuline erfolgt mit Hilfe von Kaninchen-anti-human anti-IgA, anti-IgG oder anti-IgM als Primärantikörper und alkalische-Phosphatase konjugierte Kaninchen-anti-human IgA, IgG und IgM.

2.9 PCR für epsilon-Keimbahntranskripte

Die ϵ -Keimbahntranskripte wurden semiquantitativ mittels RT-PCR analysiert. Die aufgereinigten B-Zellen wurden in Gegenwart der gewünschten Stimulationen 4 Tage inkubiert, anschließend ihre mRNA isoliert (Quiagen, Hilden) und in cDNA (Boehringer Mannheim) überschrieben. Es wurden epsilon-Keimbahntranskript-spezifische Primer (sense GACGGGCCACACCATCCACAG-GCACCAAATGGACGAC des I- ϵ Exon und antisense CAGGACGACTGTAAGATCTTCACG des ϵ 2 Exon) eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgte semiquantitativ über eine GAPDH-Einstellung (GATGACATCAAGAAGGTGGTG für den sense und GCTGTAGCC-AAATTCGTTGTC für den antisense Primer). Die epsilon-Keimbahntranskript-spezifische Bande liegt bei 409 bp, während die GAPDH-Bande bei 250 bp liegt. Die PCR wurde mit dem folgendem Programm durchgeführt: 30 Zyklen (je 1 Minute bei 94⁰C, 65⁰C und 74⁰C) für die epsilon-Keimbahntranskripte und 25 Zyklen je 1 Minute bei 94⁰C, 57⁰C und 74⁰C für die GAPDH Kontrolle.

3 Ergebnisse

3.1 Produktion und Regulation von $LT\alpha$

3.1.1 Induktion von $TNF\alpha$ und $LT\alpha$ nach anti-CD40/IL-4 Stimulation

3.1.1.1 *CD40 Bindung induziert $TNF\alpha$ und $LT\alpha$ mRNA*

Nicht stimulierte, frisch isolierte B-Zellen weisen keine oder geringe mRNA-Konzentrationen für $TNF\alpha$ und $LT\alpha$ mRNA auf. $LT\beta$ mRNA wird dagegen konstitutiv exprimiert (nicht dargestellt). Zunächst wurden humane B-Zellen nach Stimulation mit anti-CD40 (5 μ g/ml) untersucht (Abb. 8). Die Zeitkinetik zeigt, daß $TNF\alpha$ schwach und biphasisch induziert wird, mit einem frühen Anstieg nach 2h und einem späten Anstieg nach 24h. Nach 72h Stimulation mit anti-CD40 ist die Expression von $TNF\alpha$ mRNA zu Basiswerten zurückgekehrt. $LT\alpha$ mRNA wurde dagegen stark und über den gesamten untersuchten Zeitraum von 72h induziert. Als Negativkontrolle wurde ein IgG1 Mausantikörper in gleicher Konzentration (5 μ g/ml) eingesetzt, und als Positivkontrolle diente eine mitogene Stimulation mit PMA und Ionomycin (20 ng/ml und 0.5 μ mol).

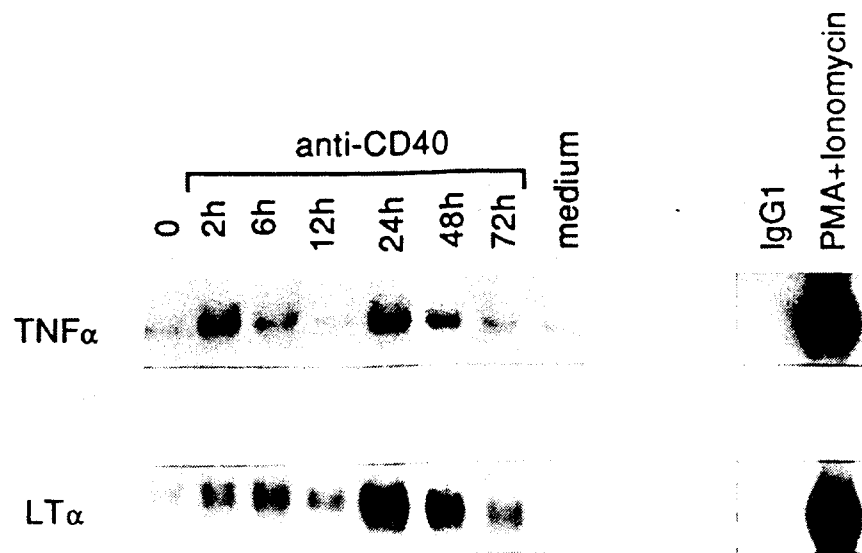


Abb. 8: Zeitkinetik der Induktion von $TNF\alpha$ und $LT\alpha$ mRNA nach Stimulation mit anti-CD40 bei humanen B-Zellen.

3.1.1.2 *$TNF\alpha$ und $LT\alpha$ induzierte mRNA via CD40 beruht auf de-novo Transkription*

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Anstiege der mRNA von $TNF\alpha$ und $LT\alpha$ nach Stimulation mit anti-CD40 durch eine erhöhte Transkriptionsrate und nicht durch Akkumulation der mRNA bedingt waren, wurden anti-CD40 stimulierte B-Zellen gleichzeitig mit Actinomycin D (10 μ g/ml), einem potenten Inhibitor der Transkription koinkubiert. Die Ergebnisse zeigen, daß die anti-CD40 oder anti-CD40/IL-4 ausgelöste Induktion von $TNF\alpha$ und $LT\alpha$ mRNA in Anwesenheit von Actinomycin D komplett unterdrückt wird (Abb. 2). Cycloheximid (1 μ g/ml) ist ein potenter Inhibitor der Proteinsynthese und ermöglicht es, die Rolle von neusynthetisierten Proteinen für die

Induktion der mRNA-Synthese zu analysieren. Indirekt können dadurch Informationen zur Beteiligung bestimmter Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1, das die Neusynthese der Proteine c-fos und c-jun benötigt, gewonnen werden. Die Ergebnisse zeigen, daß die Induktion von TNF α und LT α mRNA durch anti-CD40 oder anti-CD40/IL-4 nicht durch die Anwesenheit von Cycloheximid abgeschwächt oder unterdrückt wird (Abb. 9).

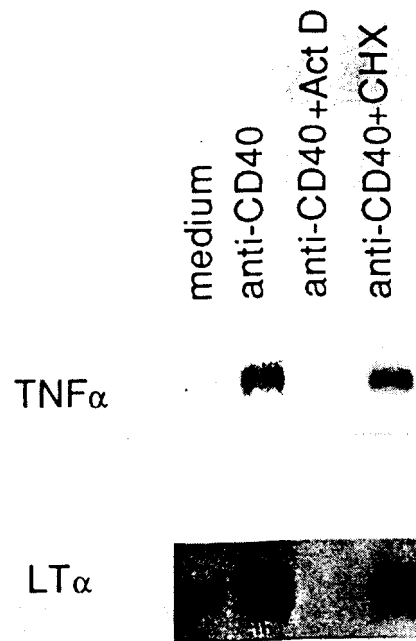


Abb. 9: Einfluß von Actinomycin D und Cycloheximid auf die Induktion von TNF α und LT α mRNA nach Stimulation mit anti-CD40 oder anti-CD40/IL-4 in humanen B-Zellen.

3.1.1.3 TNF α und LT α induzierte mRNA via anti-CD40 ist calcineurinunabhängig

Cyclosporin wirkt immunsuppressiv durch Inaktivierung der calciumabhängigen Phosphatase Calcineurin in T-Zellen (Fruman et al., 1992; Liu et al., 1991). Der inhibitorische Effekt von Cyclosporin ist nach bestimmten Stimuli auch für aktivierte B-Zellen gezeigt worden (Goldfeld et al., 1992). Es wurde daher untersucht, ob Cyclosporin (10^{-6} - 10^{-8} M) die anti-CD40 induzierte TNF α und LT α mRNA Induktion hemmen kann. Die Ergebnisse zeigen, daß die anti-CD40 induzierte Gentranskription von TNF α und LT α in B-Zellen aus Tonsillen und der B-Zell-Linie Daudi nicht durch die Zugabe von Cyclosporin beeinflusst wird (nicht dargestellt).

3.1.1.4 IL-4 wirkt mit anti-CD40 bei der TNF α und LT α mRNA Induktion synergistisch

IL-4 ist ein u.a. von TH₂ Zellen produziertes Zytokin, daß für die B-Zellproliferation und die Induktion der IgE-Synthese in Kombination mit anti-CD40 den entscheidenden Faktor darstellt (Rousseau et al., 1991). Weitere Untersuchungen sollten klären, ob IL-4 eine Wirkung auf die anti-CD40 induzierten mRNA Level von TNF α und LT α hat. Die Ergebnisse zeigen, daß IL-4 mit anti-CD40 synergistisch wirkt (Abb. 10). IL-4 als

alleiniger Stimulus zeigte dagegen keine Wirkung auf die mRNA Level von $TNF\alpha$ und $LT\alpha$. Dieser Synergismus von anti-CD40 und IL-4 konnte auch in der untersuchten B-Zell-Linie Daudi beobachtet werden (nicht dargestellt).

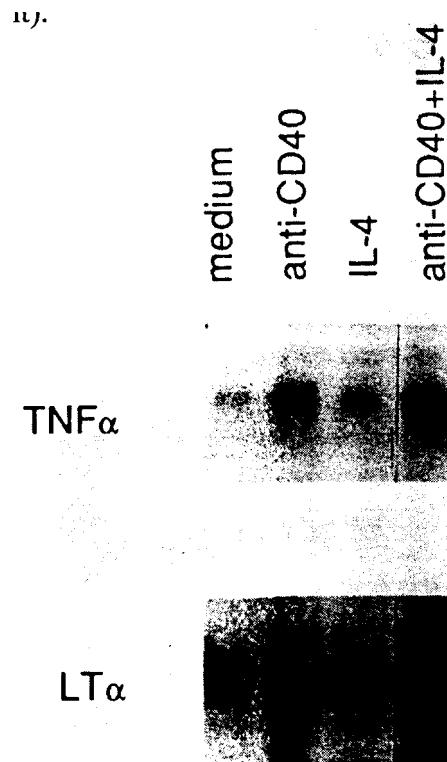


Abb. 10: Synergismus von IL-4 auf die Induktion von $TNF\alpha$ und $LT\alpha$ mRNA nach Stimulation mit anti-CD40 bei humanen B-Zellen.

3.1.1.5 anti-CD40 induziert membrangebundenes $TNF\alpha$ und $LT\alpha$

Nachdem vermehrt mRNA für $TNF\alpha$ und $LT\alpha$ nach anti-CD40 Stimulation nachgewiesen wurde, sollten die folgenden Untersuchungen klären, ob auch die Proteine $TNF\alpha$ und $LT\alpha$ nach CD40 Stimulation verstärkt exprimiert als m $TNF\alpha$ und m $LT\alpha$ bzw. als s $TNF\alpha$ und s $LT\alpha$ sezerniert wurden

Die Bestimmung von m $TNF\alpha$ und m $LT\alpha$ erfolgte durchflußzytometrisch. Auf der Zelloberfläche von frisch isolierten B-Zellen konnte sowohl m $TNF\alpha$ als auch m $LT\alpha$ nicht nachgewiesen werden. Die Inkubation von B-Zellen in Medium ohne Zusätze führte zu einem kontinuierlichem Anstieg von m $TNF\alpha$ um durchschnittlich $30\% \pm 3.2\text{STD}$ (24h-Wert). Dieser Anstieg konnte auch durch die Verwendung von Medien mit geringen Endotoxinkonzentrationen (0.1 Units/ml) nicht unterdrückt werden. Auch durch den Zusatz von Polymyxin B (100 $\mu\text{g/ml}$), das als potente Substanz zur Bindung von freiem LPS eingesetzt wird, ließ sich dieses Ergebnis nicht beeinflussen. Die Inkubation der B-Zellen mit anti-CD40 resultierte in einem geringen, aber reproduzierbaren Anstieg von m $TNF\alpha$ ($37\% \pm 3.7$, 24h Wert) (Abb. 11). Die Inkubation der B-Zellen in Gegenwart von IL-4 führte zu keinem Anstieg der mittleren Fluoreszenzrate ($31\% \pm 2.0$, 24h Wert). PMA und Ionomycin, die als Positivkontrollen eingesetzt wurden, führten zu einem vorübergehenden, aber signifikantem Anstieg von m $TNF\alpha$, wobei das jeweilige Maximum zwischen 12 und 24h lag.

Im Gegensatz zu mTNF α wurde die Expression von mLT α durch Stimulation der B-Zellen mit anti-CD40 und insbesondere nach Stimulation anti-CD40/IL-4 deutlich und andauernd (bis zu 120h) hochreguliert. Diese Induktion von mLT α bei anti-CD40/IL-4 stimulierten B-Zellen war vergleichbar mit der durch PMA+Ionomycin induzierten Expression von mLT α . Die Inkubation mit IL-4 allein führte zu einem vorübergehendem geringen Anstieg von mLT α . Da Tonsillen zum Teil aktivierte B-Zellpopulationen enthalten, wurden bei der Durchführung dieses experimentellen Teiles zusätzliche Trennverfahren (Percoll-Gradiententrennung) eingesetzt, um nicht aktivierte B-Zellen zu gewinnen. Auch periphere B-Zellen, die bei Normalpersonen aus nicht aktivierten B-Zell-Populationen bestehen, wurden analysiert. Hierzu wurden Doppelmarkierungen durchgeführt, da geringste Kontaminationen durch andere Zellen, wie z.B. Monozyten, zu falsch positiven Ergebnissen führen können.

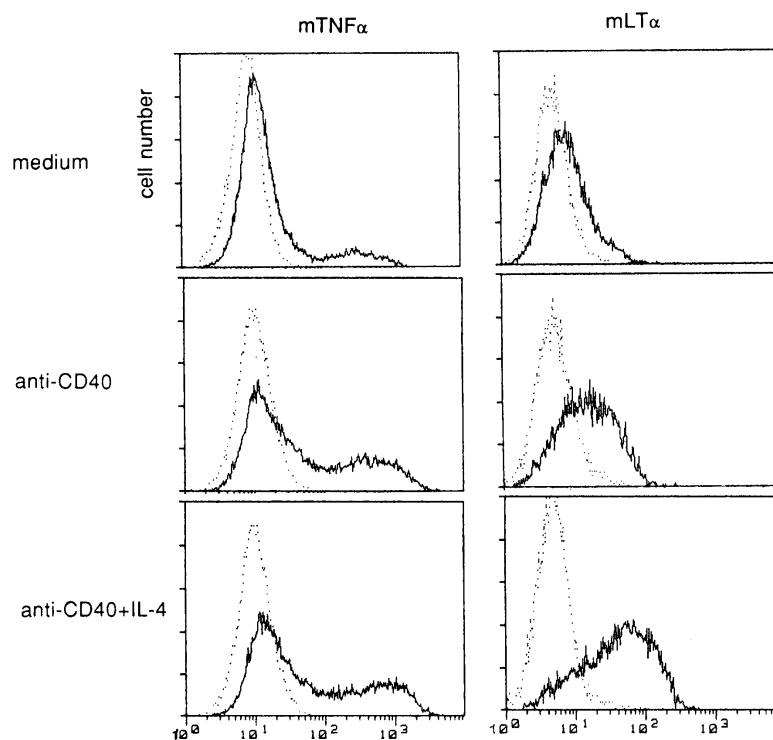


Abb. 11: Expression von mTNF α und von mLT α von humanen B-Zellen nach Stimulation mit anti-CD40 und/oder anti-CD40/IL-4.

3.1.1.6 anti-CD40 induziert lösliches LT α Protein in den Kulturüberständen von Daudi-Zellen

Die folgenden Untersuchungen sollten klären, ob auch die löslichen, sezernierten Proteine sTNF α und sLT α nach Stimulation in den Überständen anti-CD40 stimulierter B-Zellen nachweisbar waren.

Die Analyse der Kulturüberstände stimulierter tonsillärer B-Zellen (5×10^6 /ml) mittels ELISA (12h, 24h, 48h, 72h und 120h) ergab keine signifikante Freisetzung von sTNF α und sLT α nach Stimulation mit anti-CD40, IL-4 oder anti-CD40+IL4 (nicht dargestellt),

während die Stimulation mit PMA+Ionomycin zu einem deutlichen Anstieg der sezernierten Proteine führte (>1000 pg/ml). Da ein Verbrauch von TNF α oder LT α im Sinne eines autokrinen Mechanismus für diese Ergebnisse nicht auszuschließen ist, wurden zusätzliche Versuche durchgeführt, bei denen polyklonale Antikörper gegen den TNF-RI und gegen den TNF-RII (10 μ g/ml) zu den Versuchsansätzen gegeben wurden. Die Ergebnisse wurden nicht durch die Zugabe von anti-TNF-RI oder von anti-TNF-RII beeinflusst (nicht dargestellt).

In der untersuchten B-Zell-Linie Daudi fand sich nach Stimulation sowohl mit anti-CD40 als auch anti-CD40/IL-4 ein Anstieg von LT α in den Kulturüberständen (Tab. 1). TNF α konnte dagegen auch in Kulturüberständen der B-Zell-Linie nach Stimulation mit anti-CD40 und/oder IL-4 nicht nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

Tab. 1: Bestimmung von LT α -Protein in den Kulturüberständen stimulierter Daudi-Zellen mittels ELISA

	LT α in pg/ml	
	24 h	48 h
Kontrolle	<7	<7
anti-CD40	125	90
IL-4	<7	<7
anti-CD40+IL-4	190	120
PMA/Iono	150	70

3.1.2 Charakterisierung des Signaltransduktionsweges für die LT α -Induktion

CD40 vermittelte Signale in B Zellen führen zur Proliferation, Aggregation und Isotypen-Umschaltung (Clark et al., 1987; Gruber et al., 1989). Die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege ist für diese CD40 vermittelten Effekte beschrieben worden (Abb. 12). Die CD40 vermittelte Proliferation von B Zellen ist Proteinkinase A (PKA) abhängig (Kato et al., 1994), die CD40 vermittelte Aggregation benötigt die Aktivierung der Proteintyrosinkinasen- (PTK) und Proteinkinase C- (PKC) (Kansas et al., 1991) und die CD40 vermittelte Induktion der IgE-Synthese in Kombination mit IL-4 erfordert die Aktivierung von Proteintyrosinkinasen (Loh et al., 1994). Um die Bedeutung von PTK und PKC sowie Proteinphosphatasen (PP1 und PP2A) auf die anti-CD40-induzierte LT α mRNA- und Proteinexpression zu überprüfen, wurden verschiedene Inhibitoren dieser Proteinkinasen und -phosphatasen eingesetzt. Darüberhinaus wurde der Einfluß der transmembranen Phosphatase CD45 für die CD40-induzierte LT α -Proteinexpression untersucht.

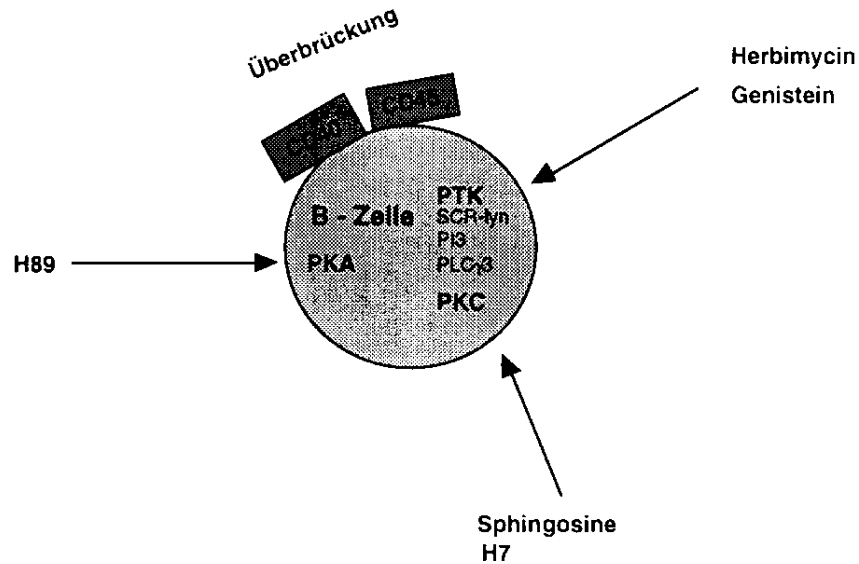


Abb. 12: Signaltransduktionswege der CD40-Aktivierung

3.1.2.1 CD40 induzierte $LT\alpha$ -Expression ist PTK-abhängig

Um die Bedeutung von PTK für die CD40-vermittelte $LT\alpha$ -Induktion zu untersuchen, wurden PTK-selektive Inhibitoren (Herbimycin und Genistein) eingesetzt. Für diese Experimente wurde der 24 Stunden Stimulationszeitpunkt (s.o.) gewählt. Die frisch isolierten B Zellen wurden mit anti-CD40 allein oder in Gegenwart der Inhibitoren (Herbimycin 0.5, 2.5 und 5 μ M sowie Genistein 10, 20 und 30 μ M) für 24 h inkubiert. Die Ergebnisse zeigen, daß beide Inhibitoren zu einer konzentrationsabhängigen vollständigen Hemmung der anti-CD40 induzierten mRNA- (nicht dargestellt) und Proteinexpression führen (Abb.13). Toxische Effekte wurden über eine Viabilitätskontrolle der Zellen nach der 24h Inkubation mit Trypanblau ausgeschlossen.

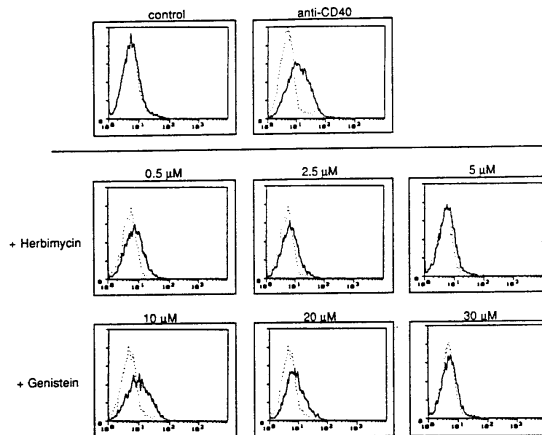


Abb. 13: CD40-induzierte $LT\alpha$ -Proteinexpression ist PTK-abhängig.

3.1.2.2 PKC- und PKA-Aktivierung ist für die CD40-induzierte LT α -Expression nicht notwendig

Vorhergehende Untersuchungen haben gezeigt, daß PKC- und PKA-Aktivierung bei der CD40-vermittelten B-Zell-Proliferation und -Aggregation erforderlich sind (Uckun et al., 1991; Kansas et al., 1991). Um die Bedeutung dieser Proteinkinasen für die CD40 vermittelte LT α Expression zu untersuchen, wurden verschiedene PKC (Sphingosin, H7 und Bisindolylmaleimid) und PKA (HA1004 und H89) selektive Inhibitoren eingesetzt. Die frisch isolierten B Zellen wurden mit anti-CD40 allein oder in Gegenwart der entsprechenden Inhibitoren inkubiert.

Die PKC-selektiven Inhibitoren Sphingosin (1 und 2 μ M) and H7 (5 und 10 μ M) hatten keinen Einfluß auf die anti-CD40 vermittelte LT α mRNA- und Proteinexpression (nicht dargestellt) bei den untersuchten humanen B Zellen. Höhere Konzentrationen von H7 (30 μ M) führten zu einer vollständigen Hemmung der LT α mRNA- und Protein-Induktion durch anti-CD40 (nicht dargestellt). Da H7 neben der PKC auch andere Signaltransduktionswege, insbesondere bei höheren Konzentrationen, unspezifisch beeinflussen kann, sind diese Effekte möglicherweise nicht auf eine Hemmung der PKC zurückzuführen. Um die Bedeutung der PKC für die anti-CD40 vermittelte LT α -Expression auszuschließen, wurde ein weiterer Inhibitor (Bisindolylmaleimid) untersucht, der ebenfalls keinen Einfluß auf die CD40-vermittelte Induktion von LT α -mRNA und Proteinexpression (nicht dargestellt) hatte.

Auch die cAMP and cGMP-abhängigen Proteinkinase Inhibitoren H89 (0.5, 5, 10 μ M) und HA1004 (5, 10 and 25 μ M) hatten keinen Einfluß auf die CD40-vermittelte Induktion von LT α mRNA- oder Proteinexpression (nicht dargestellt) bei humanen B-Zellen.

3.1.2.3 Bedeutung der Aktivität der Proteintyrosin-Phosphatase CD45 für die CD40-vermittelte LT α -Induktion

Die transmembrane Tyrosinphosphatase CD45 ist auf Zellen der hämatopoetischen Reihe exprimiert (Charbonneau et al., 1988). Untersuchungen in T- und B-Zellsystemen haben gezeigt, daß die Aktivität von CD45 eine Rolle für die Signaltransduktion spielt. Die Aktivität von CD45 ist auch für die CD40-vermittelte Induktion der Isotypenumschaltung bedeutsam. Die Quervernetzung von CD45 und CD40 führt nämlich zu einer Hemmung der IgE-Synthese und des Umschaltprozesses zu IgE bei IL-4 behandelten B-Zellen (Loh et al., 1994). Daher wurde die Rolle von CD45 für die anti-CD40 induzierte LT α -Proteinexpression untersucht. Hierzu wurden die B-Zellen mit anti-CD40 allein oder mit anti-CD45 mAb (4B2) kombiniert stimuliert. Quervernetzung wurde durch die Zugabe Ziege-anti-Maus F(ab)'₂-Fragmenten erreicht. Nach 24 h wurde die Proteinexpression von LT α auf der Zelloberfläche analysiert. Die Anwesenheit von anti-CD45 ohne Quervernetzung hatte keinen Einfluß auf die anti-CD40 induzierte LT α -Expression. Dagegen führte die Quervernetzung von CD40 und CD45 zu einer vollständigen Hemmung der mLT α -Expression. Der Effekt war spezifisch für CD45, da die Quervernetzung von CD40 zu CD19 keinen Einfluß auf die CD40-vermittelte Induktion von LT α -Proteinexpression hatte (Abb. 14).

In weiteren Untersuchungen wurden die Protein-Tyrosin-Phosphatase Inhibitoren Ortho- und Pervanadat eingesetzt. Humane B-Zellen von Tonsillen wurden mit anti-CD40 allein oder in der Gegenwart von Ortho- (0.1, 0.5 und 1 μ M) bzw Pervanadat (5, 25, 50 μ M) für

24h stimuliert. Beide Inhibitoren führten zu einer dosisabhängigen Hemmung der CD40 induzierten mLT α Expression (nicht dargestellt). Diese Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse der obengenannten Untersuchungen und weisen auf die Bedeutung der Aktivität von Protein-Tyrosin-Phosphatasen für die anti-CD40-vermittelte LT α -Expression hin.

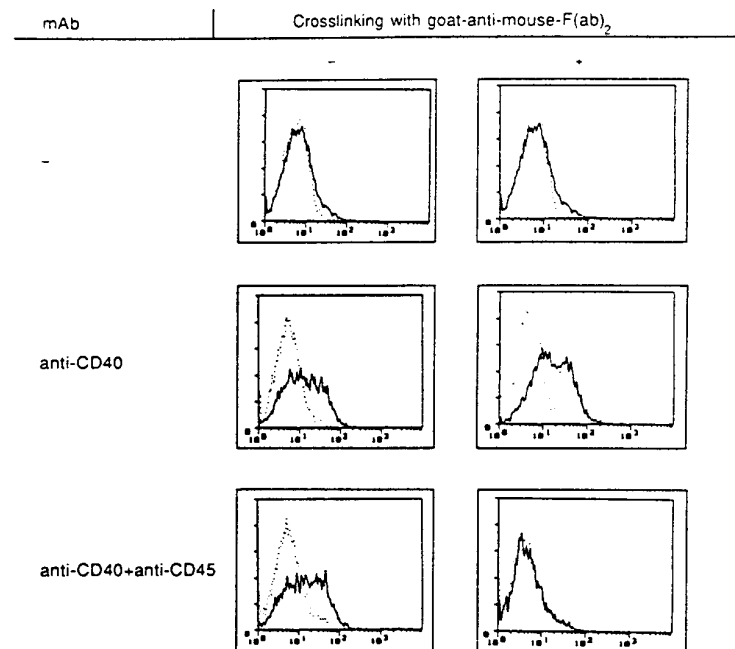


Abb. 14: Quervernetzung der transmembranen Proteintyrosin-Phosphatase CD45 und CD40 resultiert in einer Hemmung der LT α -Proteinexpression.

3.1.2.4 Serin/Threonin-Protein-Phosphatasen PP1 und PP2A kontrollieren LT α mRNA-Expression

Um die Bedeutung von Serin/Threonin-Phosphatasen (PP1 und PP2A) für die anti-CD40-vermittelte Induktion von LT α zu untersuchen, wurden die PP1 und PP2A selektiven Inhibitoren Okadansäure und Calyculin A verwendet. Beide Substanzen sind potentiell toxisch für die Zellen und können nur über kürzere Inkubationszeiten eingesetzt werden. Daher wurden die Experimente in einem Zeitraum von 4 und 8 h durchgeführt und auf die Analyse der mRNA beschränkt. Sowohl Okadansäure (10-100 ng/ml) als auch Calyculin A (10-100 ng/ml) allein, führten zu einer Erhöhung der LT α mRNA-Expression. In Kombination mit anti-CD40 kam es zu einem mit anti-CD40 additiven Effekt der LT α mRNA-Expression (Abb. 15). Diese Ergebnisse weisen daraufhin, daß die Serin/Threonin-Phosphatasen PP1 und PP2A eine Rolle für die Kontrolle der LT α mRNA spielen. Die anti-CD40-induzierte LT α mRNA scheint jedoch unabhängig von der Aktivität dieser Phosphatasen zu sein.

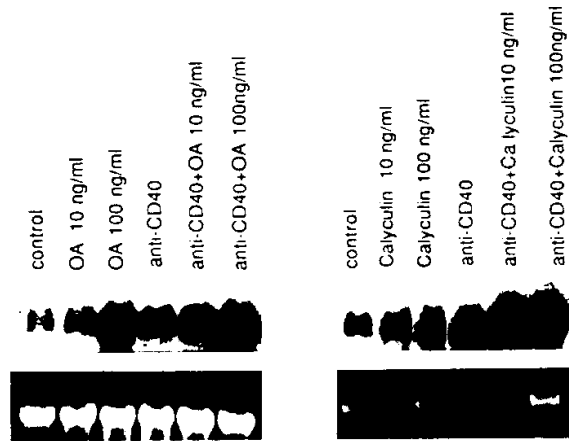


Abb. 15: Einfluß der Serin-Threonin-Phosphatasen PP1 und PP2A auf die LT α mRNA-Expression.

3.1.3 Charakterisierung der Genregulation von Lymphotoxin α

Um die Mechanismen der transkriptionalen Aktivierung von LT α nach Stimulation mit anti-CD40 zu untersuchen, wurden die hergestellten Konstrukte der 5'-Region (-1145 bis +7) von LT α in B-Zellen transfiziert. Anschließend wurden diese stimuliert und die Luciferase Aktivität gemessen. Es wurde vermutet, daß bestimmte Transkriptionsfaktoren, wie z. B. NF- κ B (Messer et al., 1991) einen Einfluß auf die Genregulation von LT α haben. Diese wurden in Kernextrakten stimulierter B-Zellen mit Hilfe des Gel-Shift-Assays untersucht. In Abb. 16 ist die 5'-Promotorregion von LT α schematisch dargestellt.



Abb. 16: Schematische Darstellung der Promotorregion von LT α .

3.1.3.1 Charakterisierung der LT α -Promotorregion

Konstrukte, die LT α -1145/-908/-737 und -356 bis +7 bp enthalten, zeigen eine 2-3-fache Induktion der Promotoraktivität nach Stimulation mit anti-CD40 oder mit PMA und Ionomycin (Abb. 17). Dagegen führten Konstrukte, die LT α -120 und -52 bis +7 bp enthalten, nicht zu einer Induktion der Promotoraktivität nach Stimulation mit anti-CD40. Diese Ergebnisse haben es ermöglicht, den auf die anti-CD40 Stimulation ansprechenden Promotorabschnitt von LT α auf die Region von -356 bis + 7 bp einzuengen und legen nahe, daß diese Region Faktoren bindet, die für die CD40 vermittelte Induktion von LT α eine relevante Rolle spielen.

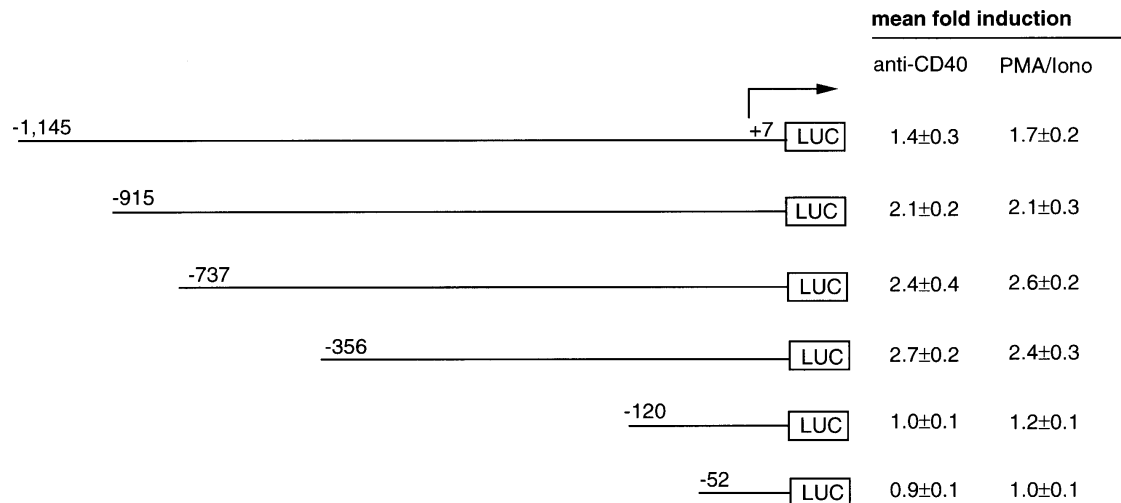


Abb. 17: Charakterisierung der LT α -Promotorregion nach Stimulation mit anti-CD40 oder PMA.

3.1.3.2 NF-kB ist für die LT α -Promotoraktivität notwendig

Die 5'-Region von LT α von -356 bis +7 bp besitzt eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor NF-kB (-99 bis -89). Um zu zeigen, daß der Transkriptionsfaktor NF-kB diese Region bindet, wurde ein markiertes Oligonukleotid, das die Region von -102 bis -85 bp umfaßt, in Gelshift-Assays eingesetzt. Kernextrakte von unstimulierten und stimulierten B-Zellen wurden untersucht. Die Ergebnisse zeigen, daß NF-kB nach Stimulation mit anti-CD40 in den Nukleus freigesetzt wird. Supershift-Experimente mit Antikörpern gegen die Untereinheiten p50 und p65 von NF-kB zeigen, daß dieses Protein die NF-kB Bindungsstelle von LT α bindet und die Untereinheiten p50 und p65 von NF-kB enthält (Abb. 18).

Um die NF-kB Bindung für die CD40-vermittelte Induktion der Expression von LT α weiter zu charakterisieren, wurde die NF-kB Bindungsstelle innerhalb des Konstruktes -356 bis 7 bp mutiert und in weiteren Transfektionsassays untersucht. Die Ergebnisse zeigen, daß die Mutation der NF-kB Bindungsstelle zu einem vollständigen Verlust der transkriptionalen Aktivität anti-CD40 oder PMA plus Ionomycin stimulierter B-Zellen führt (Abb. 19). Die Daten demonstrieren, daß NF-kB eine bedeutende Rolle für die transkriptionale Aktivierung von LT α nach Stimulation mit anti-CD40 oder PMA plus Ionomycin spielt. Da jedoch das LT α Konstrukt -120 bis +7 bp die NF-kB Bindungsstelle noch umfaßt, aber zu keiner Induktion der Promotoraktivität nach Stimulation mit anti-CD40 führte (siehe Abb. 17), wird deutlich, daß die Bindung von NF-kB für die Induktion von LT α erforderlich, aber für die transkriptionale Aktivierung allein nicht ausreichend ist.

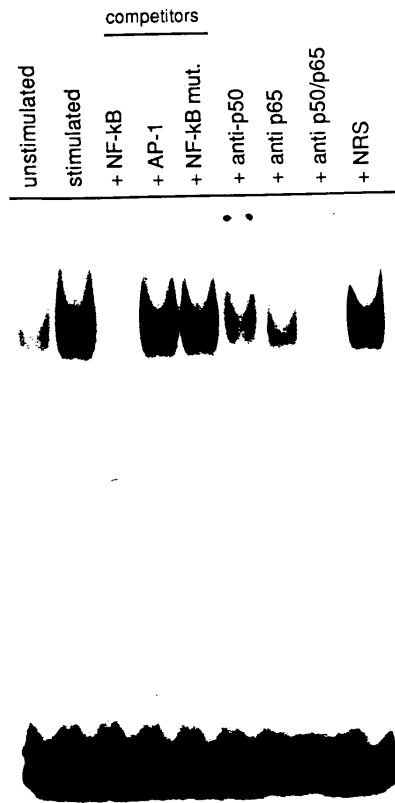


Abb. 18: CD40 induziert Nukleoproteine, die die NF-kB Bindungsstelle von LT α (-89 bis -99) erkennen und die Untereinheiten p50 und p65 von NF-kB enthalten.

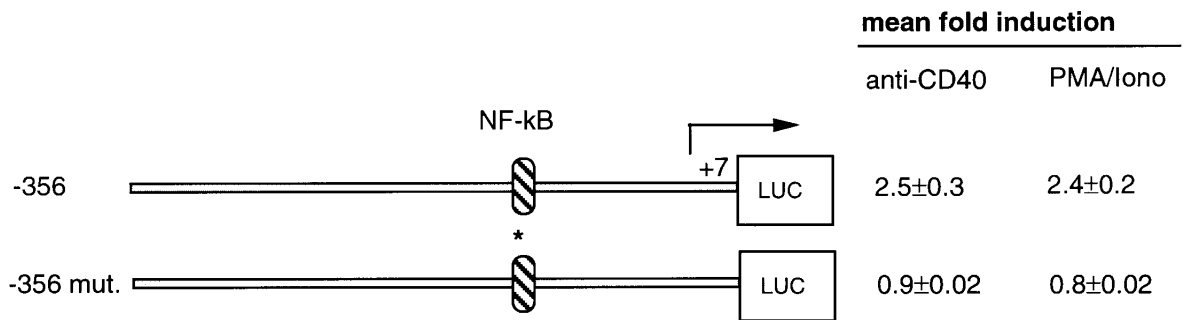


Abb. 19: Die Bindung des Transkriptionsfaktors NF-kB ist für die LT α -Promotoraktivität notwendig, Analyse des LT α -Promotors nach Mutation der NF-kB Bindungsstelle.

3.1.3.3 Ein AP-1-ähnlicher Faktor ist für die LT α -Promotoraktivität notwendig

Aus den vorangegangenen Ergebnissen der Transfektionsassays der 5'-Region von LT α wird deutlich, daß die Region von -356 bis -120 bp Elemente bindet (Abb. 17), die eine entscheidene Rolle für die Aktivierung der Expression von LT α spielen. In anderen

Arbeiten konnte gezeigt werden, daß die Region von -128 bis -122 bp Homologien zu einer Bindungsstelle für AP-1 besitzt (Messer et al., 1991). Darüberhinaus ist berichtet worden, daß die Stimulation humaner B-Zellen in einer Aktivierung von AP-1 resultiert (Francis et al., 1995). Daher wurde ein Oligonukleotid, das die Region von -133 bis -116 umfaßt und das die AP-1 ähnliche Bindungsstelle der LT α -Region enthält, mittels Gelshift-Analysen weiter untersucht.

Die Ergebnisse zeigen (Abb. 20), daß B-Zellen konstitutiv einen Faktor exprimieren, der diese Sequenz bindet. Der Faktor wird nicht nach Stimulation mit CD40 oder PMA und Ionomycin hochreguliert. Durch Supershifts mit Antikörpern gegenüber Faktoren der AP-1 Familie (anti-fos und anti-jun) wurde ausgeschlossen, daß dieses Protein aus der AP-1 Familie stammt (nicht dargestellt).

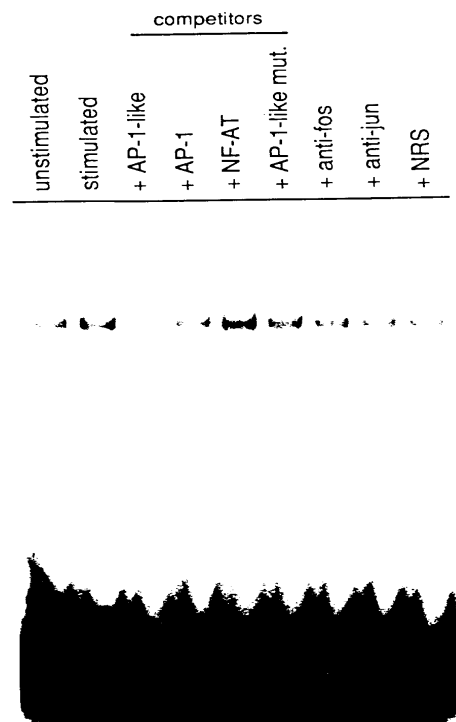


Abb. 20: Ein AP-1 ähnlicher Faktor bindet LT α (-128 -122bp) und wird in B-Zellen konstitutiv exprimiert.

3.1.3.4 IL-4 verstärkt die transkriptionale Aktivierung von LT α über STAT6

Die Zugabe von IL-4 zu mit anti-CD40 stimulierten B-Zellen führt zu einer verstärkten LT α Expression. Die 5'-Region (-1145 bis +7 bp) von LT α enthält mehrere Bindungsstellen für den IL-4-induzierbaren Transkriptionsfaktor STAT6. Die Untersuchung von Kernextrakten IL-4-stimulierter B-Zellen erfolgte mittels Gelshift-Analysen und zeigen, daß nach Stimulation mit IL-4 ein STAT-bindender Komplex auftrat. Durch Supershift-Experimente mit spezifischen Antikörpern konnte dieses nukleäre Protein als STAT6 identifiziert werden (Abb. 21). Darüberhinaus wurde nach Mutation der proximalen Bindungsstelle für STAT6 die IL-4-vermittelte, verstärkte transkriptionale Aktivierung von LT α nach Stimulation mit anti-CD40 aufgehoben (Abb.

22). Die Ergebnisse zeigen, daß der Transkriptionsfaktor STAT6 für die IL-4-vermittelte, transkriptionale Aktivierung von $LT\alpha$ in anti-CD40/IL-4 stimulierten B-Zellen verantwortlich ist.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen, daß die transkriptionale Aktivierung von $LT\alpha$ durch anti-CD40 als Promotor die Region von -356 bis +7 bp umfaßt und die Freisetzung und Bindung des Transkriptionsfaktors NF- κ B benötigt. Darüberhinaus ist das Vorhandensein eines weiteren, möglicherweise lymphozytären Faktors erforderlich, der die AP-1 ähnliche Bindungsstelle bindet, aber nicht als AP-1 identifiziert werden konnte. Der additive Effekt von IL-4 mit anti-CD40 bei der Induktion der $LT\alpha$ Expression konnte auf transkriptionaler Ebene durch die Aktivierung eines STAT-bindenden Proteins, das als STAT6 identifiziert wurde, charakterisiert werden.

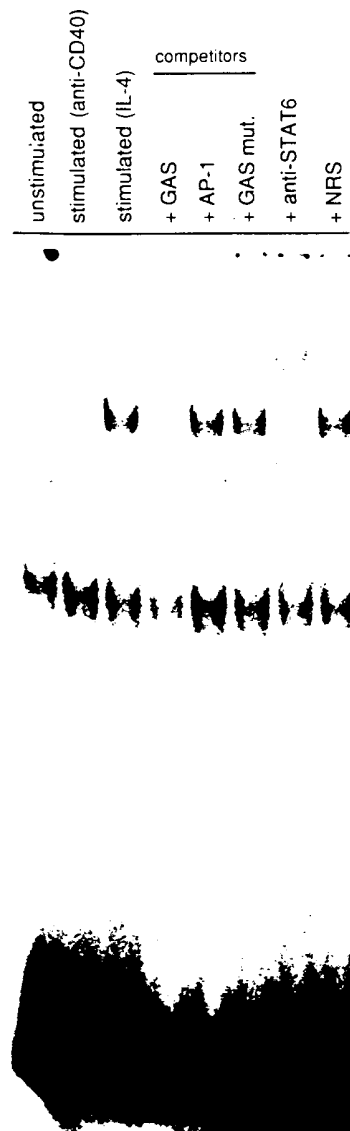


Abb. 21: IL-4 induziert STAT6-Bindung an die STAT-Bindungsstelle des $LT\alpha$ -Promotors.

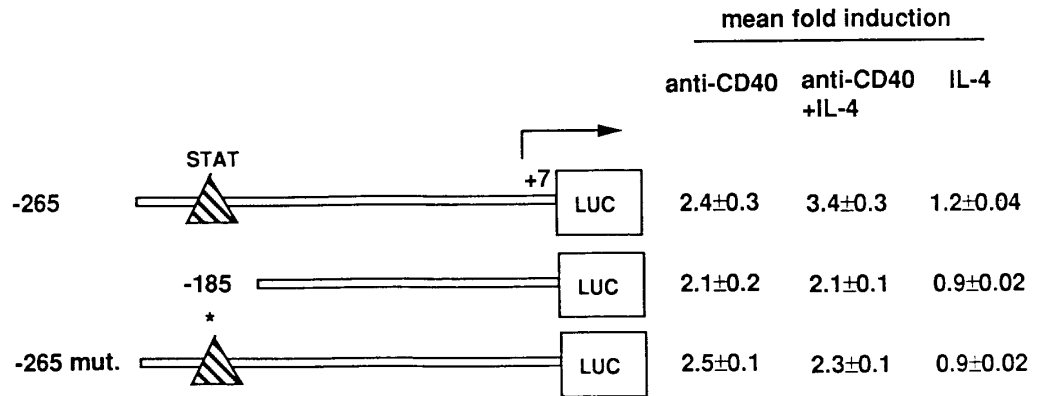


Abb. 22: IL-4 verstärkt die CD40 vermittelte transkriptionale Aktivierung von LT α über STAT6.

3.2 Funktionelle Bedeutung von LT α

3.2.1 Charakterisierung von LT α für die B-Zellproliferation und IgE-Synthese bei B-Zellen von Normalpersonen

Um die Bedeutung von LT α für die B-Zellproliferation und IgE-Synthese zu charakterisieren, wurden die isolierten B-Zellen in Gegenwart von LT α oder in Kombination mit anti-CD40/IL-4 bzw. in Gegenwart neutralisierender Antikörper stimuliert. Alle Untersuchungen schließen als vergleichenden Parameter Versuchsansätze mit TNF α und anti-TNF α ein, deren Bedeutung für die Proliferation und IgE-Synthese in Voruntersuchungen demonstriert wurde.

3.2.1.1 TNF α und LT α induzieren B-Zellproliferation

Der Einfluß von TNF α und LT α auf die Proliferation humaner B-Zellen wurde zunächst durch die Zugabe dieser Zytokine (5-500 pg/ml) zu den isolierten B-Zellen allein und in Kombination mit anti-CD40 (1 μ g/ml) und IL-4 (2.5 ng/ml) überprüft. Die Ergebnisse sind in Abb. 23 dargestellt und zeigen, daß die Zugabe des jeweiligen Zytokins dosisabhängig zu einer signifikanten Induktion der B-Zellproliferation in drei unabhängigen Experimenten führte. Der Vergleich zwischen TNF α und LT α zeigt, daß der proliferative Effekt der beiden Zytokine vergleichbar ist. Darüberhinaus führte die Zugabe von TNF α oder LT α zu anti-CD40/IL4 stimulierten Zellen in beiden Fällen zu einer signifikanten Steigerung der anti-CD40/IL4 induzierten B-Zellproliferation (Abb. 23). Diese Ergebnisse zeigen, daß erstens die Zytokine TNF α und LT α dosisabhängig B-Zellproliferation induzieren und zweitens, daß sie die anti-CD40/IL-4-vermittelte B-Zellproliferation erheblich steigern.

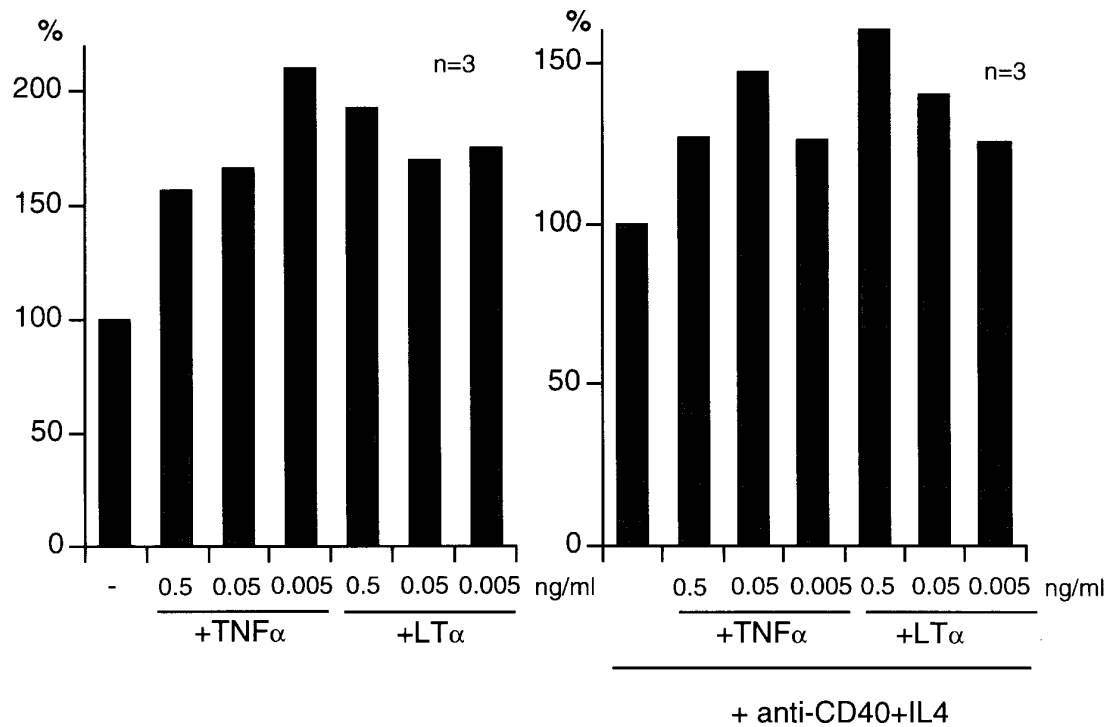


Abb. 23: TNF α und LT α induzieren B-Zellproliferation.

3.2.1.2 Hemmung anti-CD40/IL-4-induzierter B-Zellproliferation durch anti-TNF α und anti-LT α

Die vorangegangenen eigenen Arbeiten haben demonstriert, daß die Stimulation humaner B-Zellen via CD40 sowie CD40/IL-4 zur Produktion von TNF α und LT α führt. Um die Bedeutung der autokrin produzierten Zytokine TNF α und LT α bei anti-CD40/IL-4 stimulierten Zellen zu überprüfen, wurden neutralisierende Antikörper (0.05-5 μ g/ml) gegenüber TNF α und LT α zu den anti-CD40/IL-4 stimulierten B-Zellen gegeben. Die Daten zeigen (Abb. 24), daß sowohl anti-TNF α als auch anti-LT α dosisabhängig und signifikant die anti-CD40+IL4 induzierte Proliferation von B-Zellen hemmen. Um einen unspezifischen Effekt der neutralisierenden Antikörper über Fc- γ Rezeptoren auszuschließen, wurden entsprechende Kontrollantikörper der identischen Isotypklasse in gleicher Konzentration (0.05-5 μ g/ml) in jedem Experiment parallel mitgeführt.

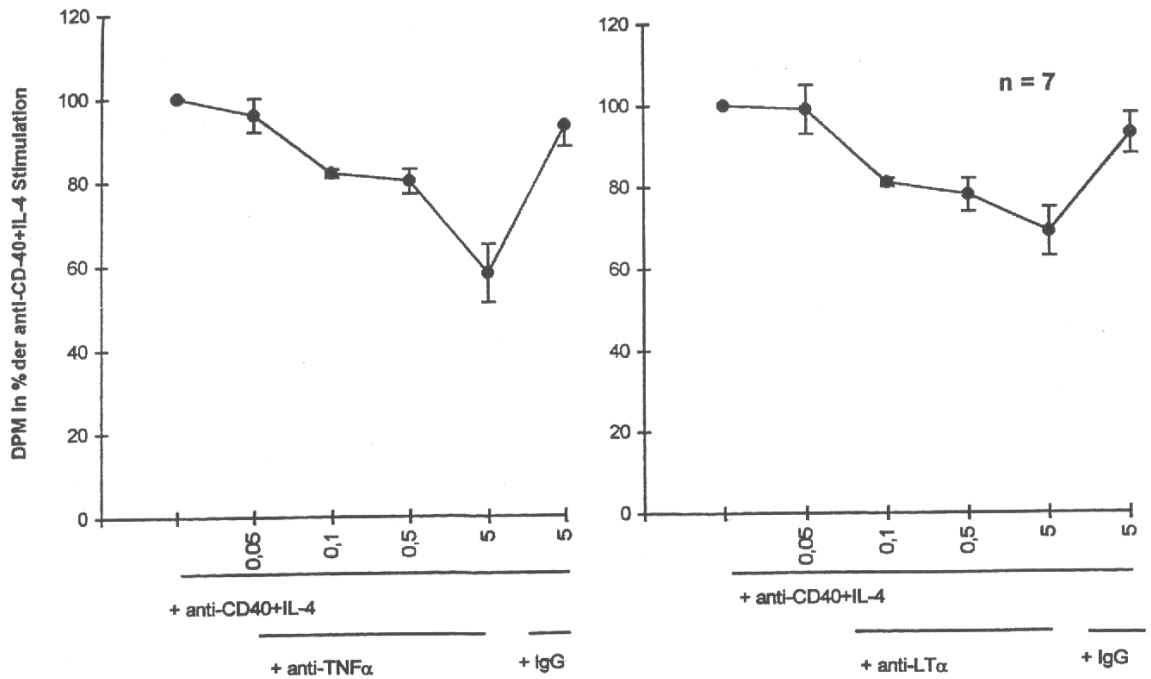


Abb. 24: Hemmung der anti-CD40/IL-4-induzierten B-Zellproliferation durch anti-TNF α und anti-LT α .

3.2.1.3 TNF α und LT α steigern die IgE-Produktion humaner B-Zellen in-vitro

In den folgenden Experimenten wurde der Einfluß von TNF α und LT α auf die IgE-Synthese humaner PBMC untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit TNF α oder LT α allein bzw. in Kombination mit anti-CD40/IL-4 in den obengenannten Konzentrationen für 10 Tage inkubiert und IgE in den Überständen anschließend mittels eines ELISA gemessen.

Die Zugabe von TNF α und LT α zu humanen PBMC allein führte nicht zu einer Induktion der IgE-Synthese in vitro (nicht dargestellt). In einem anti-CD40/IL-4-abhängigen System konnte jedoch eine signifikante Steigerung der IgE-Produktion in vitro durch die Zugabe von rekombinantem TNF α und LT α beobachtet werden (Abb. 25). Darüberhinaus wurde der Effekt neutralisierender Antikörper (anti-TNF α und anti-LT α) auf die IgE-Synthese anti-CD40/IL-4 stimulierter B-Zellen untersucht. Die Daten zeigen, daß sowohl die Zugabe von anti-TNF α als auch anti-LT α zu einer dosisabhängigen, signifikanten Hemmung der IgE-Synthese in vitro führt (Abb. 26).

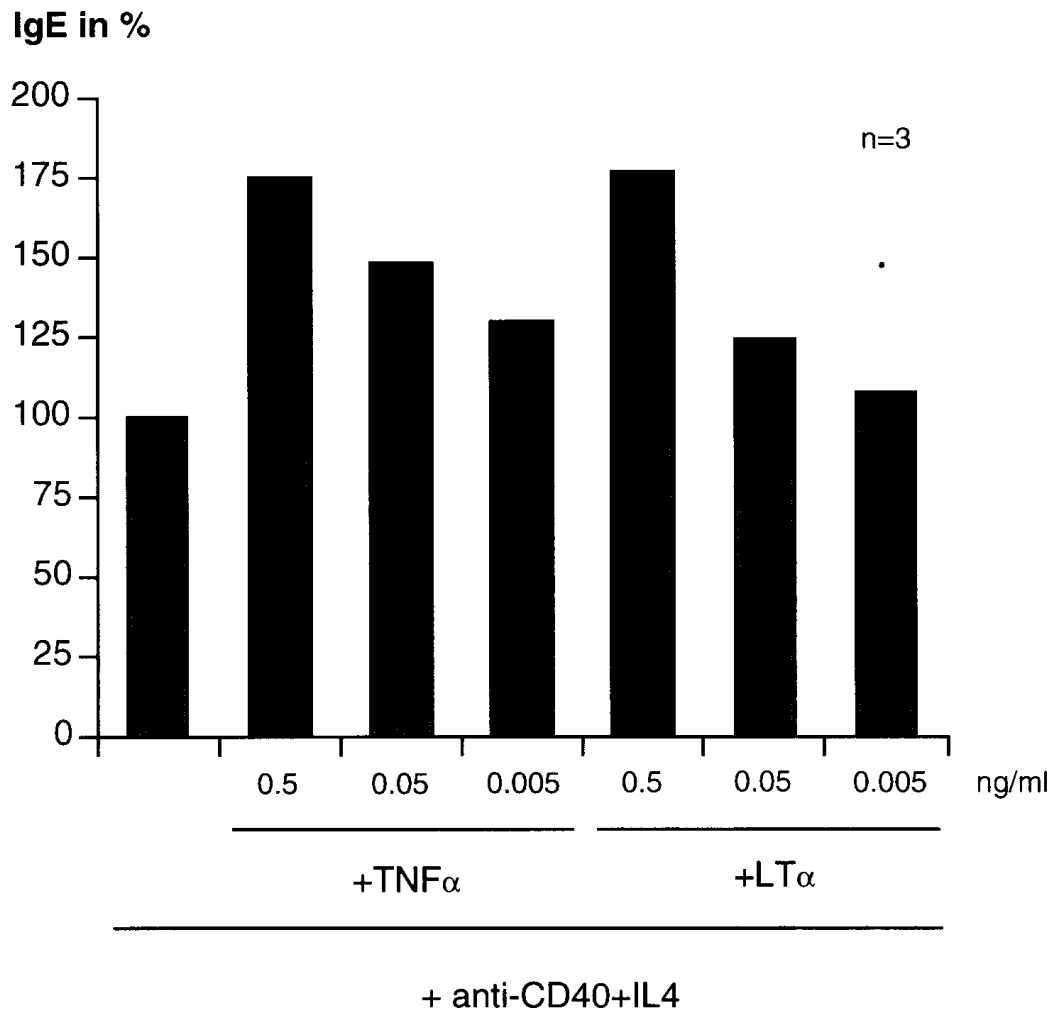


Abb. 25: TNF α und LT α steigern die IgE-Produktion in-vitro.

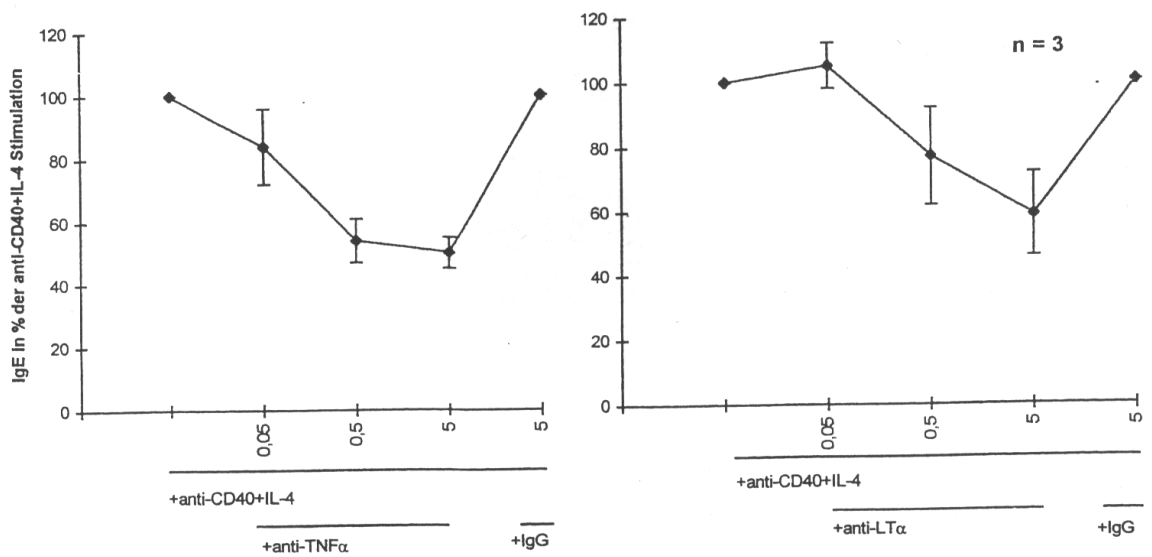


Abb. 26: Anti-CD40/IL-4-induzierte IgE-Produktion wird durch neutralisierende AK gegen TNF α und LT α bei B-Zellen gehemmt.

Zusammenfassend demonstrieren die durchgeführten Untersuchungen, daß $\text{TNF}\alpha$ und $\text{LT}\alpha$ die Proliferation und IgE-Produktion signifikant *in vitro* modulieren. Die Beobachtung, daß $\text{TNF}\alpha$ oder $\text{LT}\alpha$ allein kein ausreichendes Signal zur Induktion der IgE-Synthese vermitteln, stimmt mit der 2-Signalthypothese überein, wonach für die Induktion der IgE-Synthese in humanen B-Zellen zwei Stimuli erforderlich sind. Da $\text{TNF}\alpha$ oder $\text{LT}\alpha$ in Kombination mit anti-CD40 oder IL-4 *in vitro* keine IgE Produktion induzieren, spielen diese Zytokine zwar eine wichtige Rolle bei der Modulation, nicht jedoch bei der Induktion der IgE-Produktion.

3.2.1.4 $\text{LT}\alpha$ induziert die Produktion von epsilon-Keimbahntranskripten

Da die Produktion von epsilon-Keimbahntranskripten eine wichtige Voraussetzung für die Induktion der IgE-Synthese ist, wurde in den folgenden Untersuchungen geprüft, ob die steigernde Wirkung von $\text{LT}\alpha$ auf die IgE-Produktion auf dieser Ebene wirksam ist. Hierzu wurden die entsprechend stimulierten Zellen mittels semiquantitativer PCR untersucht. Als Kontrolle wurde die GAPDH Expression zur Einstellung gleicher cDNA Mengen verwendet. Die Expression der epsilon-Keimbahntranskripte wurde nach anti-CD40/IL-4-Stimulation induziert und ihre Produktion in Gegenwart von 0.1 und 1.0 ng/ml rekombinantem $\text{LT}\alpha$ gesteigert. $\text{LT}\alpha$ allein war nicht in der Lage, die Expression der epsilon-Keimbahntranskripte zu induzieren. Dies unterstützt die Beobachtung, daß $\text{LT}\alpha$ allein nicht ausreichend ist, ein Signal zur Induktion der IgE-Produktion auszulösen.

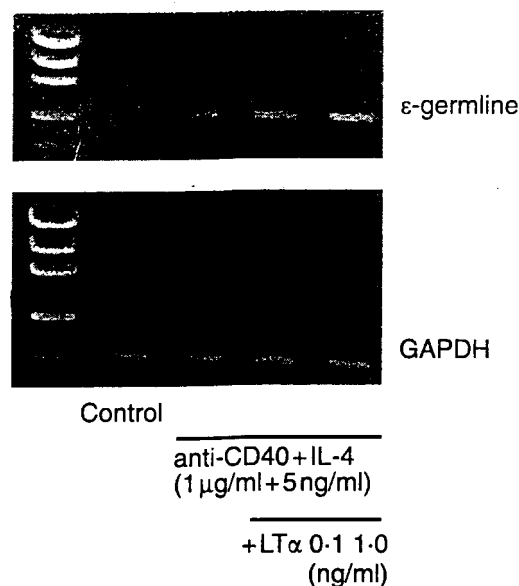


Abb. 27: $\text{LT}\alpha$ steigert die Produktion von epsilon-Keimbahntranskripten bei anti-CD40/IL-4-stimulierten B-Zellen.

3.2.2 Charakterisierung von $\text{LT}\alpha$ für die B-Zellproliferation und IgE-Synthese bei B-Zellen bei atopischen Patienten.

Um den Beitrag von $\text{LT}\alpha$ auf die Aktivierung stimulierter B-Zellen von nicht-allergischen im Vergleich zu atopischen Personen zu untersuchen, wurde der Einfluß von $\text{LT}\alpha$ und anti- $\text{LT}\alpha$ sowie zum Vergleich $\text{TNF}\alpha$ und anti- $\text{TNF}\alpha$ auf die B-Zellproliferation und IgE-

Synthese in einem Kollektiv von Normalpersonen und Atopikern untersucht. Diese Parameter stellen die wichtigsten Effektorfunktionen anti-CD40/IL-4 stimulierter B-Zellen dar. Das Kollektiv von Atopikern war durch eine positive Anamnese, eine nachgewiesene Typ-I-Sensibilisierung und ein erhöhtes Gesamt-IgE charakterisiert.

3.2.2.1 Hemmung der anti-CD40/IL-4-induzierten B-Zellproliferation durch anti-TNF α und anti-LT α

Um die Bedeutung der autokrin produzierten Zytokine TNF α und LT α bei anti-CD40/IL-4-stimulierten B-Zellen von Patienten mit atopischer Dermatitis zu überprüfen, wurden neutralisierende Antikörper (0.5-0.5 μ g/ml) gegen TNF α und LT α zu den mit anti-CD40/IL-4-stimulierten B-Zellen gegeben. Die Daten zeigen (Abb. 28), daß anti-TNF α und anti-LT α die anti-CD40/IL4 induzierte Proliferation von B-Zellen atopischer Personen dosisabhängig hemmen (n=5). Um einen unspezifischen Effekt der neutralisierenden Antikörper über Fc- γ Rezeptoren auszuschließen, wurden entsprechende Kontrollantikörper der identischen Isotypklasse in gleicher Konzentration (0.5 μ g/ml) in jedem Experiment parallel mitgeführt.

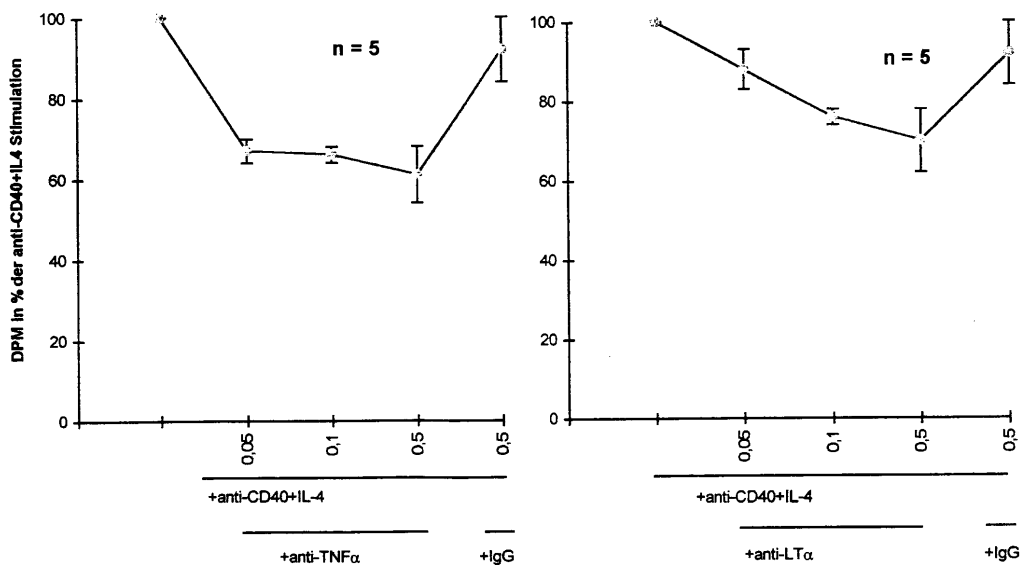


Abb. 28: Hemmung der anti-CD40/IL-4-induzierten Proliferation durch anti-TNF α und anti-LT α bei B-Zellen von Atopikern.

3.2.2.2 Hemmung der IgE-Produktion durch anti-TNF α und anti-LT α bei atopischen Patienten

Es wurden neutralisierende Antikörper (0.05-5 μ g/ml) gegenüber TNF α und LT α zu den mit anti-CD40/IL-4 stimulierten B-Zellen gegeben, und IgE wurde in den Überständen mittels eines ELISA nach 10 Tagen Inkubation gemessen. Die Atopiker wurden in 2 Gruppen unterteilt, einerseits Patienten mit atopischer Dermatitis und hohen IgE-Spiegeln

(>1000 kU/ml), andererseits Patienten mit allergischer Rhinitis und IgE-Spiegeln zwischen 150-400 kU/ml. Sowohl anti-TNF α als auch anti-LT α hemmen dosisabhängig die anti-CD40+IL4 vermittelte IgE-Produktion bei atopischen Personen (Abb. 29). Es zeigt sich jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit sehr hohen und mit vergleichsweise niedrigen IgE-Spiegeln. Während die IgE-Produktion der B-Zellen bei Patienten mit niedrigen IgE-Spiegeln durch die Präsenz neutralisierender Antikörper gegenüber TNF α und LT α wie bei Normalpersonen gehemmt wird, ist der Einfluß auf die IgE-Produktion auf B-Zellen von Patienten mit hohen IgE-Spiegeln deutlich geringer. Zum Ausschluß unspezifischer Effekte der Antikörper auf die IgE-Synthese über Fc- γ Rezeptoren wurden entsprechende Kontrollantikörper (5 μ g/ml) der identischen Isotypklasse in jedem Experiment parallel mitgeführt, und diese hatten keine Wirkung auf die IgE-Produktion in vitro. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, daß neutralisierende Antikörper gegenüber TNF α und LT α die IgE-Produktion von Patienten mit atopischer Dermatitis in vitro hemmen, jedoch bei Patienten mit sehr hohen IgE-Werten geringer wirksam sind. Eine vermehrte endogene Produktion der Zytokine TNF α und LT α oder konzentrationsabhängige pharmakologische Gesetzmäßigkeiten könnten hier ursächlich sein.

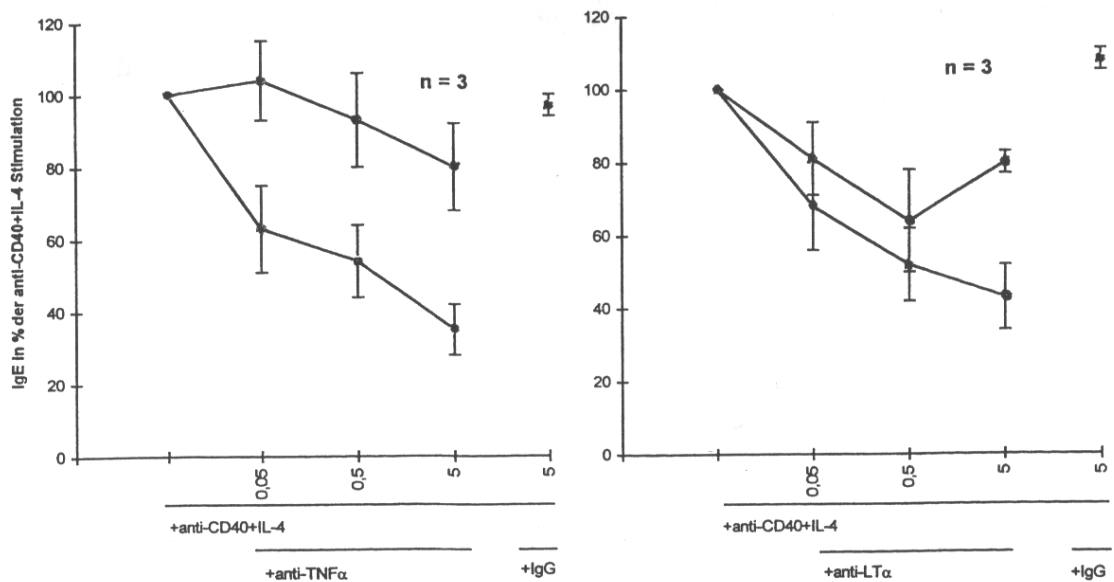


Abb. 29: Hemmung der IgE-Produktion durch anti-TNF α und anti-LT α bei atopischen Patienten in-vitro (flache Kurve Patienten mit einem Gesamt-IgE >2000 KU/ml und steile Kurve Patienten mit einem Gesamt-IgE <300 KU/ml).

3.2.2.3 Expression und Produktion von LT α bei Normalpersonen und Atopikern

Um die basale und nach CD40/IL-4 Stimulation induzierte Produktion von LT α lymphozytärer Zellen zu bestimmen, wurde in weiteren Untersuchungen die Expression von LT α bei Normal Spendern und Atopikern auf B-Zellen untersucht. Darüberhinaus wurde die Sekretion des Zytokins nach mitogener PMA- und spezifischer Stimulation mit anti-CD40/IL-4 in den Überständen stimulierter PBMC bestimmt. Abb. 30 zeigt eine

Auswertung der durchflußzytometrischen Analyse zur Expression von $LT\alpha$ bei Normalpersonen und Atopikern (jeweils $n=10$). Die B-Zellen wurden wie oben beschrieben aufgereinigt und für 48h mit anti-CD40/IL-4 stimuliert. Die Daten zeigen, daß unstimulierte B-Zellen von Atopikern im Vergleich zu Normalpersonen vermehrt $LT\alpha$ exprimieren, die Expression von $LT\alpha$ auf B-Zellen jedoch durch anti-CD40/IL4 Stimulation vergleichbar induziert wird. Insgesamt findet sich jedoch bei Atopikern auf den Membranen der B-Zellen signifikant vermehrt $LT\alpha$. Die Untersuchungen zu der Produktion von $LT\alpha$ in den Überständen stimulierter PBMC zeigen, daß die basale s $LT\alpha$ Produktion unstimulierter Zellen bei Atopikern geringfügig höher lag und nach anti-CD40/IL-4-Stimulation in der Gruppe der Atopiker s $LT\alpha$ deutlich vermehrt von den Zellen produziert wird (Abb. 31).

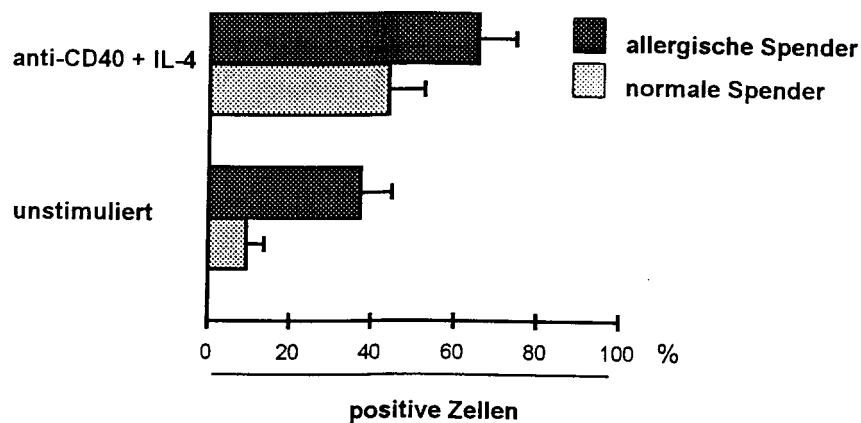


Abb. 30: Expression von $LT\alpha$ durch humane B-Zellen von Normalpersonen im Vergleich zu Atopikern.

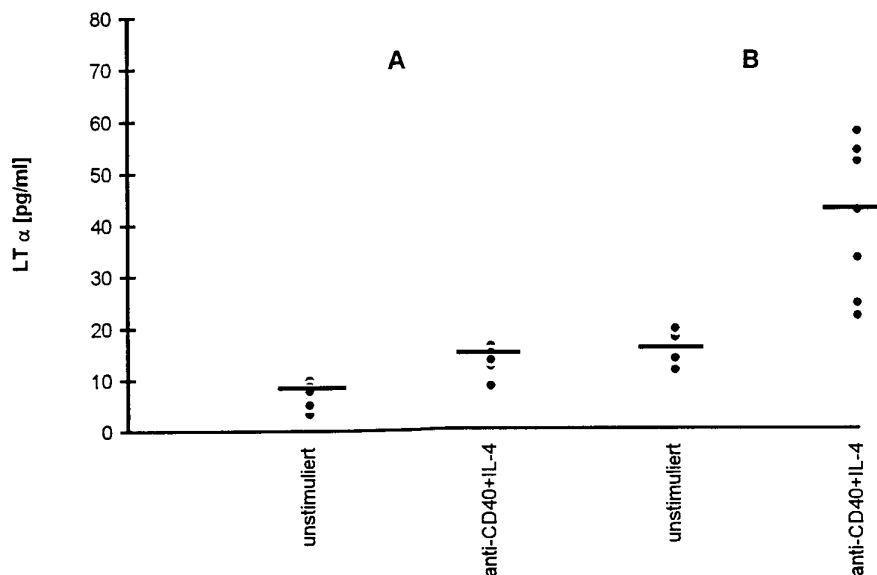


Abb. 31: Sekretion von $LT\alpha$ durch humane PBMC von Atopikern (B) im Vergleich zu Normalpersonen (A) vor und nach Stimulation mit anti-CD40/IL-4 oder PMA.

Zusammenfassend demonstrieren die erhobenen Daten, daß $LT\alpha$ die Proliferation und IgE-Produktion bei Atopikern in einem CD40/IL-4 abhängigen System modulieren kann. Die Untersuchung eines Kollektivs von Atopikern (atopisches Ekzem und hohe IgE-Spiegel sowie allergische Rhinitis und niedrige IgE-Spiegel) ergab signifikante Wirkungen neutralisierender Antikörper gegenüber $TNF\alpha$ und $LT\alpha$ auf die IgE-Produktion. Darüberhinaus zeigen die Daten der Durchflußzytometrie, daß Patienten mit atopischem Ekzem und hohen IgE-Spiegeln vermehrt membrangebundenes $LT\alpha$ auf den B-Zellen exprimieren, während sich sezerniertes $LT\alpha$ in den Überständen in vergleichbaren Konzentrationen in den Kollektiven findet.

3.3 Einfluß von Retinoiden und Vitamin D auf die IgE-Produktion

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war eine mögliche therapeutische Beeinflussung der Substanzen aus der Steroidhormongruppe, Retinsäure und Vitamin D, durch in-vitro Untersuchungen zur IgE-Produktion in einem CD40/IL-4 abhängigen System zu untersuchen.

3.3.1 Retinoide hemmen die Proliferation humaner PBMC und B-Zellen

Der Einfluß von all-trans Retinsäure (RA) und seinem Isomer 13-cis RA auf die Proliferation humaner PBMC und B-Zellen wurde durch die Zugabe der Retinoide (10^{-15} bis 10^{-5} M) zu den Zellen allein und in Kombination mit anti-CD40 (1 μ g/ml) und IL-4 (2.5 ng/ml) untersucht. Die Ergebnisse zeigen, daß die Zugabe des jeweiligen Retinoids allein keinen proliferativen Effekt auf die Zellen induzierte (Daten nicht dargestellt). Die Inkubation der Retinoide bei mit anti-CD40/IL-4 stimulierten PBMC führte zu einer dosisabhängigen Hemmung der Proliferation (siehe Abb. 32). Ein ähnliches Inhibitions muster der anti-CD40 und IL4 induzierten Proliferation durch die Retinoide wurde in aufgereinigten B-Zellen beobachtet (siehe Abb. 33). Dieses Ergebnis legt nahe, daß die Proliferationshemmung auf einen direkten Effekt der Retinoide auf die B-Zellen zurückzuführen ist.

3.3.2 all-trans und 13-cis Retinsäure hemmen selektiv die IgE-Produktion

Die PBMC und B-Zellen wurden mit den Retinoiden in Kombination mit anti-CD40/IL-4 in den obengenannten Konzentrationen für 10 Tage inkubiert und IgE anschließend in den Überständen mittels eines ELISA gemessen. Es wurde eine ausgeprägte Hemmung der anti-CD40/IL-4-vermittelten IgE-Produktion durch beide Retinoide bis zu Konzentrationen von $<10^{-10}$ M (Abb. 32 und 33) beobachtet. Konzentrationen der Retinoide von $<10^{-10}$ M zeigten keinen Effekt auf die anti-CD40/IL-4-vermittelte B-Zellproliferation. Diese Befunde werfen die Frage auf, ob es sich um eine selektive Hemmung der IgE-Produktion in vitro handelt.

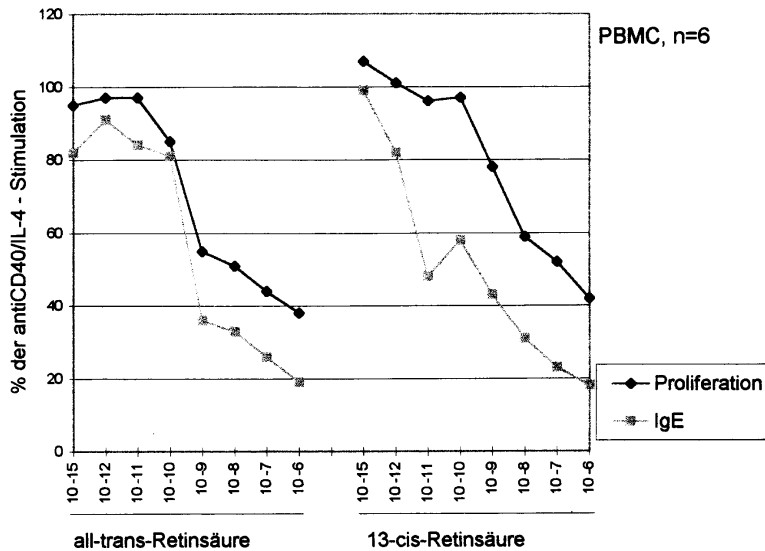


Abb. 32: All-trans und 13-cis Retinsäure hemmen die Proliferation und IgE-Produktion bei PBMC

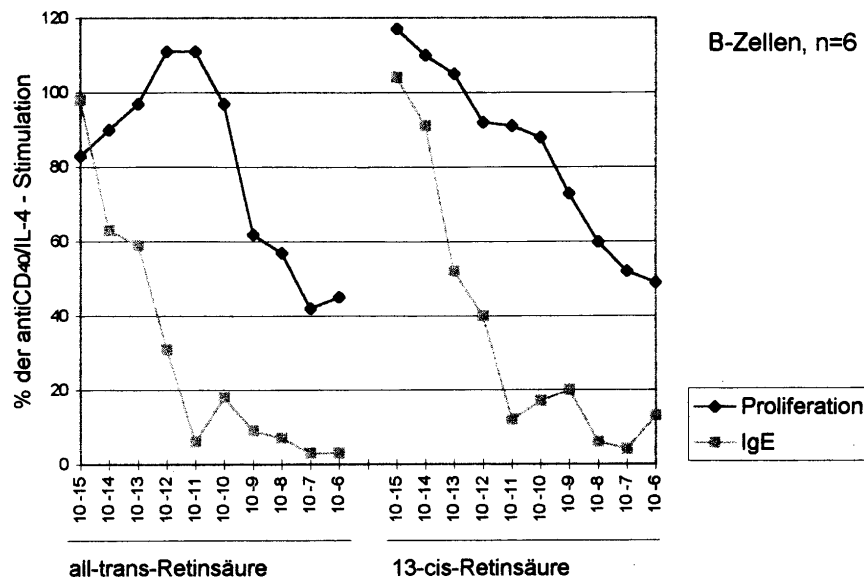


Abb. 33: All-trans und 13-cis Retinsäure hemmen die Proliferation und IgE-Produktion bei B-Zellen.

Um den Einfluß der Retinoide auf die Sekretion der anderen Immunglobulinklassen zu untersuchen, wurde die IgA and IgG Produktion der B-Zellen aus den gleichen Ansätzen bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, daß beide Retinoide die IgA- und IgG-Produktion in vitro nicht beeinflussen (nicht dargestellt). Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse zur Proliferation und IgE-Produktion zeigen bei den Versuchen mit PBMC eine weitgehende Parallelität der Dosiswirkungskurven. Für all-trans Retinsäure beginnt die Hemmung bei Konzentrationen von 10⁻¹⁰ M. Bei 13-cis Retinsäure sind die Unterschiede stärker ausgeprägt. Die Inhibition der IgE-Produktion beginnt hier bei Konzentrationen, die bis zu

drei Zehnerpotenzen niedriger liegen als die für eine Proliferationshemmung nötigen Konzentrationen (10^{-13} bis 10^{-12} bzw. 10^{-9} bis 10^{-10} M). Bei B-Zellen zeigt sich bei all-trans Retinsäure, daß zur Inhibition der IgE-Synthese deutlich niedrigere Konzentrationen notwendig sind, als zur Hemmung der Proliferation. Die Hemmung der IgE-Produktion beginnt mit 10^{-14} bis 10^{-15} M fünf Zehnerpotenzen früher als die Inhibition der Proliferation (10^{-9} bis 10^{-10} M). Bei 13-cis Retinsäure beginnt eine Hemmung sowohl der Proliferation als auch der IgE-Synthese bereits bei einer Konzentration von 10^{-14} M, die Dosiswirkungskurve für die Proliferationshemmung verläuft allerdings deutlich flacher als für die Hemmung der IgE-Produktion.

Um zu untersuchen, ob die Wirkungen der Retinoide über die Freisetzung von Mediatoren, die die IgE-Synthese hemmen, vermittelt werden, wurde die Produktion von $INF\gamma$ in den Überständen unter dem Einfluß der Retinoide bestimmt. Die Daten zeigen (Tab. 2), daß die Retinoide nicht zu einer vermehrten Produktion von $INF\gamma$ bei anti-CD40+IL4 stimulierten Zellen führen. Somit erfolgt die Hemmung der IgE-Produktion durch Retinoide über einen $INF\gamma$ -unabhängigen Mechanismus.

Tab. 2: Der Einfluß von Retinoiden auf die $INF\gamma$ Produktion humaner B-Zellen
Versuch ($INF\gamma$ in pg/ml)

	1	2	3	4
Kontrolle	145	64	10	3.2
CD40+IL-4	123	61	5.6	3.3
CD40+IL-4+all-trans RA	117	44	5.6	4.0
CD40+IL-4+13-cis RA	35	20	5.2	5.3

Da die eigenen vorhergehenden Untersuchungen gezeigt haben, daß $LT\alpha$ die Proliferation und IgE-Produktion CD40/IL-4 stimulierter Zellen fördert, wurde die $LT\alpha$ -Produktion bei CD40/IL-4 stimulierten peripheren B-Zellen in der Gegenwart von all-trans und 13-cis Retinsäure (10^{-7} M) bestimmt. Die Daten zeigen, daß $LT\alpha$ in den Überständen stimulierter B-Zellen in der Gegenwart der Retinoide ($LT\alpha$ Mediane bei n=6, unstimuliert 10 ng/ml, anti-CD40/IL-4 52 pg/ml, + all-trans RA 20 pg/ml und + 13-cis RA 24 pg/ml) vermindert ist. In weiteren derzeit durchgeführten Untersuchungen muß jedoch geklärt werden, ob diese Verminderung mit den durch die Retinoide beobachteten Wirkungen in einem direkten kausalen Zusammenhang steht.

3.3.3 Einfluß von Vitamin D auf die Proliferation und IgE-Produktion humaner B-Zellen

Nachdem eine ausgeprägte Hemmung der IgE-Produktion durch Retinoide beobachtet wurde, die wie Glukokorticoide über eine Bindung ihres im Zytosol gelegenen Rezeptors wirksam sind, wurde anschließend Vitamin D bei anti-CD40/IL-4-stimulierten B-Zellen untersucht. Vitamin D bindet gleichfalls seinen im Zytosol gelegenen Rezeptor und kann mit einzelnen Retinoidrezeptoren Heterodimere bilden, so daß vergleichbare Wirkungen durch Vitamin D wie sie bei Retinoiden beobachtet wurden, zu vermuten waren.

Der Einfluß von Vitamin D (VD) und seinem Derivat EB1089 auf die Proliferation und

IgE-Produktion humaner B-Zellen wurde durch die Zugabe von den Substanzen (10^{-14} bis 10^{-6} M) zu den Zellen allein und in Kombination mit anti-CD40 (1 $\mu\text{g/ml}$) + IL-4 (2.5 ng/ml) untersucht. Die Ergebnisse zeigen, daß die Substanzen allein (nicht dargestellt) oder in Kombination mit anti-CD40/IL-4 keinen Effekt auf die Proliferation der Zellen haben (Abb. 35). Jedoch wurde eine Hemmung der anti-CD40/IL-4-vermittelten IgE-Produktion durch Vitamin D (VD) und seinem Derivat EB1089 bis zu Konzentrationen von $<10^{-10}\text{M}$ (Abb. 36) beobachtet.

Um den Einfluß von Vitamin D und seinem Derivat EB1089 auf die Sekretion der anderen Immunglobulinklassen zu untersuchen, wurde die IgA, IgG und IgM-Produktion der B-Zellen aus den gleichen Ansätzen bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, daß beide Substanzen die IgA- und IgG-Produktion in-vitro nicht beeinflussen (nicht dargestellt).

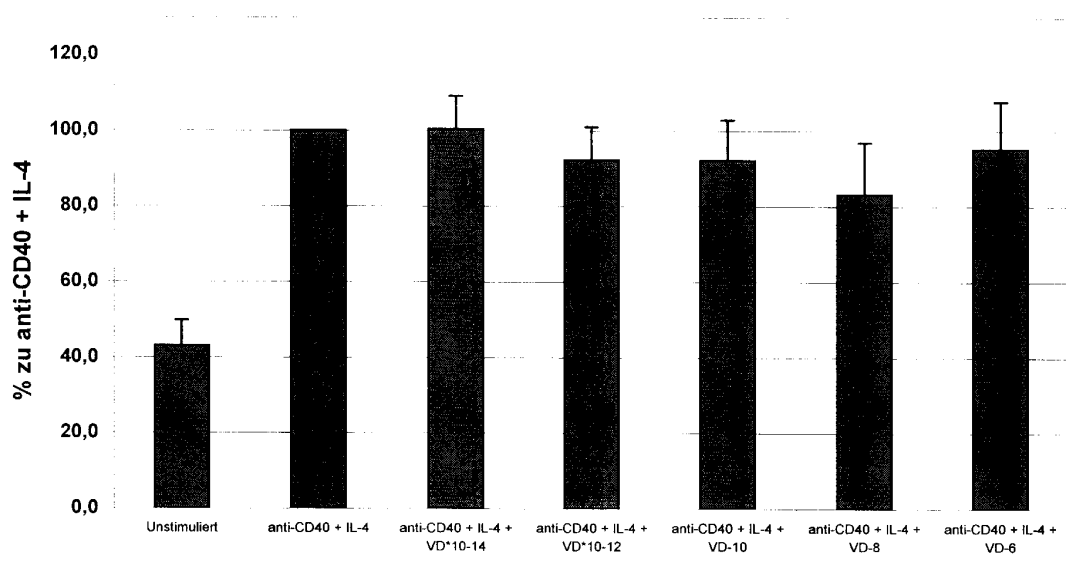


Abb. 34: Einfluß von Vitamin D auf die Proliferation anti-CD40/IL-4 stimulierter humaner B-Zellen.

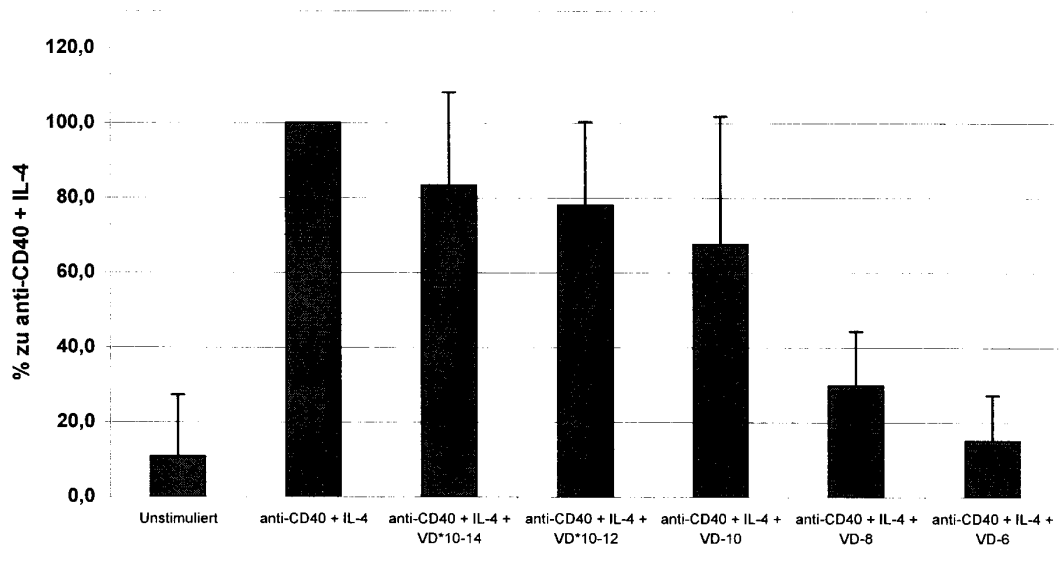


Abb. 35: Vitamin D hemmt die IgE-Produktion anti-CD40/IL-4 stimulierter B-Zellen in-vitro.

4 Diskussion

4.1 Produktion und Regulation von LT α

4.1.1 Induktion von TNF α und LT α nach anti-CD40/IL-4 Stimulation

Die Bindung des B-Zell-Antigens CD40 führt zu einer Hochregulation von LT α mRNA- und dessen Membranform. Dieser Effekt wurde von IL-4 synergistisch verstärkt. Die Zeitkinetik der Induktion von TNF α und LT α mRNA nach Stimulation mit anti-CD40 in B-Zellen entspricht den Ergebnissen anderer Arbeiten (Sung et al., 1989; Sunget al., 1991). Dort wurden als Stimuli für die B-Zellen Mitogene verwendet, so daß die Kinetik der TNF α - und LT α -mRNA-Induktion weniger durch die Art des Stimulus, als durch Eigenschaften der spezifischen mRNA bestimmt wurde. AU-reiche Sequenzen im Bereich der 3'-terminalen nichttranslatierten Regionen können die Halbwertszeit von mRNA bestimmen (Shaw et al., 1986). Innerhalb des TNF α Genes finden sich drei AU-reiche Motive, während sich innerhalb des LT α Genes nur zwei AU-reiche Motive finden. Dies kann eine Ursache für die unterschiedlichen Kinetiken der mRNA Expression sein. LT β , das kein AU-reiches Motiv in der 3'-Region aufweist, wurde konstitutiv exprimiert.

In Gegenwart von Actinomycin D kam es zu einer kompletten Unterdrückung der anti-CD40 induzierten TNF α und LT α mRNA-Synthese. Diese Ergebnisse bestätigen, daß es sich um eine de-novo Induktion der mRNA handelt. Cycloheximid, ein Inhibitor der Proteinsynthese, zeigte dagegen keinen Einfluß. Dies weist auf die Beteiligung von Faktoren für die Induktion der mRNA-Synthese hin, die in der Zelle präformiert vorhanden sein müssen. NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der in der Zelle als präformiertes Protein vorliegt (Leonardo et al., 1989). Daneben besitzen sowohl TNF α als auch LT α innerhalb ihrer 5'-Region Bindungstellen für NF- κ B (Goldfeld et al., 1991; Messer et al., 1991). NF- κ B kommt deshalb als sekundärer Faktor für die anti-CD40 induzierte TNF α und LT α mRNA-Synthese in Betracht und konnte in weiteren Untersuchungen als wesentlicher Transkriptionsfaktor für die CD40-vermittelte Induktion von LT α identifiziert werden.

Cyclosporin A (CsA) ist ein spezifischer Inhibitor der Calcium/Calmodulin-abhängigen Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin (Fruman et al., 1992; Liu et al., 1991). Bindung des CsA-Cyclophilin Komplexes an die Calcineurin B Untereinheit verhindert die Aktivierung von Calcineurin A (Milan et al., 1994). Die Aktivität der Phosphatase Calcineurin ist Voraussetzung zur Translokation der zytosolischen Form des Transkriptionsfaktors NFAT in den Zellkern. Da gezeigt wurde, daß die Bindung von CD40 bei B-Zellen eine schwache Aktivierung von NFAT auslöst (Choi et al., 1994), war nicht auszuschließen, daß CsA die Induktion von LT α über CD40 beeinflussen kann. Jedoch zeigte CsA sowohl bei B-Zellen aus Tonsillen als auch bei der B-Zell-Linie Daudi keinen Einfluß auf die TNF α und LT α -mRNA-Induktion durch anti-CD40. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Beobachtung, daß CsA keinen Einfluß auf die anti-CD40/IL-4 induzierte Proliferation oder IgE-Synthese hat (Fuleihan et al., 1994). Eine Calcineurin-abhängige Aktivierung von Serin/Threonin Kinasen und somit des Transkriptionsfaktors NFAT, kann daher für die Aktivierung des TNF α oder LT α Genes ausgeschlossen werden.

IL-4 konnte mit anti-CD40 die mRNA-Induktion von TNF α und LT α deutlich steigern. Dieser Synergismus kann auf verschiedene Signaltransduktionswege hinweisen, die möglicherweise ein gemeinsames Substrat aktivieren, während die von IL-4 allein ausgelösten Signale für die Induktion von TNF α und LT α Genen nicht ausreichend sind.

Membrangebundenes TNF α wurde auf den B-Zellen allein durch Inkubation in Medium

hochreguliert. Hierfür könnten Zusätze der Kulturmedien wie lipopolysaccharid (LPS)-haltiges fetales Kälberserum eine Rolle spielen. Es wurden zusätzliche Experimente durchgeführt, um LPS als mögliche Ursache auszuschließen, da dieses die Transkription von $\text{TNF}\alpha$ induzieren kann (Trede et al., 1991). Neben der Anwendung von Kulturmedien, die geringe Konzentrationen von LPS enthalten, wurde den Kulturen zusätzlich Polymyxin B zugesetzt. Diese Versuche lieferten gleiche Ergebnisse, so daß LPS als Ursache für den Anstieg von $\text{mTNF}\alpha$ nicht in Frage kommt. Anti-CD40 führte nur zu einem minimalen Anstieg von $\text{mTNF}\alpha$, der nicht durch eine verstärkte Freisetzung des membrangebundenen Protein bewirkt wurde, da die Kulturüberstände kein vermehrtes Protein enthielten. Die Möglichkeit, daß $\text{TNF}\alpha$ durch Bindung an seine Rezeptoren nicht nachzuweisen war, konnte durch die Zugabe von anti-TNF-RI und anti-TNF-RII ausgeschlossen werden.

Stimulation mit anti-CD40 bzw. anti-CD40/IL-4 löste eine starke und anhaltende Expression von mRNA- und membrangebundener Form von $\text{LT}\alpha$ aus. Daß $\text{mLT}\alpha$ bis zu 120 h auf den stimulierten B-Zellen nachgewiesen werden konnte, erklärt warum $\text{LT}\alpha$ als Protein nur gering in den Kulturüberständen bestimmt werden konnte. $\text{LT}\alpha$ ist als membrangebundenes Protein auf der Zelloberfläche, nicht wie $\text{TNF}\alpha$ in der Membran verankert, sondern bildet mit $\text{LT}\beta$ einen trimerischen Komplex (Browning et al., 1993). Es werden 2 Subtypen dieses $\text{LT}\alpha/\beta$ Komplexes unterschieden. Die Majorform setzt sich aus $\text{LT}\alpha 1/\beta 2$ zusammen, während die Minorform von $\text{LT}\alpha 2/\beta 1$ gebildet wird (Crowe et al., 1994). Diese Formen des $\text{LT}\alpha/\beta$ -Komplexes unterscheiden sich nicht nur durch ihr anteilmäßiges Vorkommen, sondern auch in ihrer Affinität zu den TNF-Rezeptoren. Die Minorform des Komplexes kann die TNF-Rezeptoren p55 und p75 binden, während die Majorform an einen kürzlich neu charakterisierten Rezeptor ($\text{LT}\beta$) bindet (Crowe et al., 1994). Dieser Rezeptor wird von vielen Zell-Typen exprimiert; über seine transduzierten Signale oder Wirkungsmechanismen ist bislang nichts bekannt. Die in-vivo Bedeutung von $\text{LT}\alpha$ für B-Zellen wird durch Untersuchungen bei Mäusen unterstrichen, bei denen beide $\text{LT}\alpha$ Gene ausgeschaltet worden sind (DeTogni et al., 1994). Diese Mäuse besitzen keine peripheren Lymphknoten oder Peyer'schen Plaques und weisen eine Zerstörung der Milzarchitektur auf. Ob die Klassenumschalt-Mechanismen der B-Zellen dieser Tiere für die Immunglobulinsynthese intakt sind, ist bisher nicht untersucht worden. Untersuchungen, die die Analyse der IgE-Synthese von B-Zellen nach Stimulation mit anti-CD40, bzw. murinen CD40L/IL-4 umfassen, werden Aufschluß über die in-vivo Relevanz des $\text{LT}\alpha$ oder $\text{LT}\alpha/\beta$ Komplexes geben.

4.1.2 Charakterisierung des Signaltransduktionsweges für die $\text{LT}\alpha$ -Induktion

PTK-, aber nicht PKC- oder PKA-Inhibitoren interferieren mit der CD40-induzierten Expression von $\text{LT}\alpha$. Dies weist darauf hin, daß die Aktivierung von Proteinkinasen für diese Induktion von $\text{LT}\alpha$ eine entscheidene Rolle spielt. Auch frühere Studien haben gezeigt, daß eine Tyrosinphosphorylierung nach CD40-Stimulation bei B-Zellen auftritt (Ren et al., 1994) und für die B-Zellaggregation und Klassenumschaltung eine wichtige Rolle spielt (Loh et al., 1994; Kansas et al., 1991).

Daß die PKC-Inhibitoren keinen signifikanten Effekt auf die CD40-induzierte $\text{LT}\alpha$ -Expression hatten, stimmt mit Befunden anderer Arbeiten überein. So konnte auch kein Effekt der PKC-Inhibitoren auf die Klassenumschaltung gefunden werden (Loh et al., 1994). Dagegen scheint die CD40-abhängige Induktion der Aggregation PKC-abhängig zu sein (Kansas et al., 1991).

Eine Rolle des cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweges für die CD40-induzierte Proliferation wurde im Mausmodell gezeigt (Kato et al., 1994). Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit mit menschlichen B-Zellen kein Effekt der PKA-Inhibitoren bestimmt werden. Zusammenfassend zeigen die Befunde, daß die für die LT α -Induktion erforderlichen Signaltransduktionswege primär PTK-abhängig sind.

Die transmembrane Tyrosin-Phosphatase CD45 wird auf hämatopoetischen Zellen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle für deren Aktivierung (Charbonneau et al., 1988). Die CD45-vermittelte Dephosphorylierung der *src* Tyrosin Kinasen spielt eine wichtige Rolle für die Signaltransduktion des Antigen-Rezeptor-Komplexes, da CD45-defiziente Zell-Linien erheblich in ihrer Signaltransduktionsfähigkeit eingeschränkt sind (Justement et al., 1994). Darüberhinaus wurde gezeigt, daß CD40 und IL-4-induzierte IgE-Produktion durch Quervernetzung von CD45 und CD40 gehemmt wird (Loh et al., 1994). Auch in den vorliegenden Untersuchungen wurde die CD40-induzierte LT α -Expression durch Quervernetzung mit CD45 gehemmt. Aktivierung von CD45 allein, ohne Quervernetzung zu CD40, war dagegen ohne Einfluß. Die Daten bestätigen somit die Rolle von PTK für die CD40 induzierte Expression von LT α und legen nahe, daß der hemmende Effekt von CD45 von der molekularen Nähe der beiden Moleküle CD40 und CD45 abhängig ist. Ein ähnlicher Befund ist für die anti-Ig vermittelte B-Zellproliferation beschrieben worden (Charbonneau et al., 1988).

Da in früheren Arbeiten gezeigt wurde, daß Serin-Threonin-Kinasen nach CD40-Stimulation in B-Zellen aktiviert werden (Uckun et al., 1991), wurde ihre Bedeutung für die CD40-vermittelte LT α -Expression durch den Einsatz von Serin-Threonin-Phosphatase-Inhibitoren untersucht. Beide untersuchten Substanzen, sowohl Okadansäure als auch Calyculin, führten zu einem Anstieg der LT α mRNA. Dies läßt vermuten, daß Serin-Threonin-Kinasen wie PP1 und PP2 eine Rolle bei der Expression von LT α spielen. Vermehrte mRNA nach Hemmung von PP1 mittels Okadansäure wurde auch für TNF α in Monozyten gezeigt, so daß die Aktivität dieser Phosphatase möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Genregulation spielt (Sung et al., 1992). Es handelt sich jedoch wahrscheinlich nicht um einen für die LT α -mRNA-Expression selektiven Mechanismus, sondern vielmehr um ein universelles System zur Kontrolle der Gentranskription.

4.1.3 Charakterisierung der Genregulation von LT α

Mit Hilfe der Deletionen des 5'-Promotors von LT α zwischen -1145-+7bp konnte das minimal auf anti-CD40-ansprechende Element des LT α Promotors auf -152 bis +7 bp eingegrenzt werden. Insgesamt wurde mit Konstrukten unstimulierter Zellen bereits eine ausgeprägte Basisaktivität bis -152 bp beobachtet. Diese Basisaktivität verlor sich abrupt mit den -120 und -52 bp Konstrukten. Diese konstitutive Basispromotoraktivität des LT α Gens ist in Übereinstimmung mit der konstitutiven Oberflächenexpression von LT α in den untersuchten B-Zellen. Die starke Basisaktivität des LT α -Promotors erklärt auch den nur mäßigen Anstieg der Reportergenaktivität nach anti-CD40 Stimulation. Der Anstieg war dennoch signifikant und reproduzierbar und mit dem durch PMA und Ionomycin induziertem Effekt vergleichbar.

Die beiden Konstrukte ohne Basispromotoraktivität (-120 bp und -52 bp) waren nach anti-CD40 Stimulation nicht induzierbar. Dies legt nahe, daß die gleichen Faktoren, die für die Basisaktivität verantwortlich sind, auch für die Stimulation mit CD40 benötigt werden. Unstimulierte B-Zellen weisen geringe Mengen der Transkriptionsfaktoren NF- κ B and

AP-1 in der Zelle auf. Das konstitutiv exprimierte Nukleoprotein, daß die AP-1-ähnliche Sequenz bindet (-128 bis -122 bp), kommt als wesentlicher Faktor für die LT α Promotoraktivität in Betracht. Dagegen scheinen negativ regulatorische Elemente (NRE), die bis -265 bp an den LT α Promotor binden und die z.B. bei der IL-3-Regulation beteiligt sind, hier keine Rolle zu spielen (Mathey-Prevot et al., 1990).

Das minimale auf anti-CD40-Stimulation ansprechende Element des LT α Promoters von -152 bis +7 bp besitzt eine AP-1-ähnliche Bindungsstelle (-128 bis -122 bp) und eine NF-kB Bindungsstelle von -99 bis -89 bp (Messer, 1990). Wir konnten zeigen, daß CD40-Bindung die Aktivierung der Untereinheiten von NF-kB p50 and p65 auslöst. Dies ist in Übereinstimmung mit vorhergehenden Daten die belegen, daß CD40-vermittelte Signale die Aktivierung von NF-kB hervorrufen (Berberich et al., 1994, Lalmanach-Girad et al., 1993). Mittels Mutationsanalyse konnten wir zeigen, daß die Bindung von NF-kB für die Aktivierung von LT α essentiell ist. Dennoch ist die Bindung von NF-kB allein nicht ausreichend, um eine transkriptionale Aktivität für LT α zu vermitteln, da daß -120 bis +7 bp Konstrukt die NF-kB Bindungsstelle noch enthält, aber nicht mehr aktiv ist.

Die Untersuchung der Promotordeletionen ergab, daß die Region zwischen -152 and -120 bp ein wesentliches Element für die Promotoraktivität bindet. Diese Region weist eine AP-1-ähnliche Bindungsstelle zwischen -128 und 122 bp auf (TGACTGA), die sich mit einem Nukleotid von der AP-1 Konsensussequenz TGA(G/C)TCA unterscheidet (Lee et al., 1987). Eine genaue Untersuchung dieses Nukleoproteins mittels Gelshiftanalysen ergab, daß dieser Faktor konstitutiv exprimiert wird und nicht die Proteine Fos und Jun enthält, somit nicht klassischerweise einem AP-1 bindendem Transkriptionsfaktor entspricht.

Bisher wurden zahlreiche Nukleoproteine beschrieben, die AP-1-ähnliche Bindungsstellen binden. Hierzu gehört z. B. NFE2, das zur Familie der Leucin-Zipper-Proteine gehört (Andrews et al., 1993). Das Nukleoprotein, welches die Region zwischen -128 to -122 bp des LT α Promoters bindet, ist nicht bekannt.

Die Analyse der 5'-Region von LT α zeigte vier potentielle STAT-bindende Sequenzen. Die weitere Analyse der proximalen STAT-Bindungsseite TTCCCAGAA (-197 bis -189 bp) ergab, daß diese Sequenz ein IL-4-induziertes Nukleoprotein bindet. Dieses Nukleoprotein konnte über Supershift-Analyse als STAT6 identifiziert werden. Die Nukleoproteine der STAT-Familie werden durch verschiedene Zytokine induziert, wobei die Induktion von STAT6 für IL-4-spezifisch ist (Hou et al., 1994). Die Daten zeigen, daß IL-4 die anti-CD40-induzierte Reporterexpression in einem Konstrukt von -265 bis +7 bp steigern konnte, das diese proximale STAT6-Bindungsstelle enthält. Sowohl die Deletion als auch die Mutation dieser Bindungsstelle führte zu einem Verlust des Effektes von IL-4. Da IL-4 allein keinen Einfluß auf die Reporterexpression eines einzigen Konstruktes hatte, kann über eine isolierte Aktivierung durch STAT6 keine LT α -Genexpression ausgelöst werden. Dies steht im Einklang mit den LT α -mRNA-Daten, wonach mit IL-4-Stimulation allein keine Induktion von LT α -mRNA beobachtet wurde.

4.2 Charakterisierung von LT α für die B-Zellproliferation und IgE-Synthese bei Normalpersonen und bei atopischen Patienten.

In diesen Untersuchungen wurde die funktionelle Bedeutung von LT α , und im Vergleich TNF α , in Bezug auf B-Zellfunktionen wie Proliferation und IgE-Produktion in einem CD40/IL-4 abhängigen System untersucht. In die Untersuchungen wurden neben Zellen von Normalpersonen auch Zellen von allergischen Spendern mit einbezogen, um

gleichzeitig die Bedeutung von $LT\alpha$ bei allergischen Erkrankungen zu untersuchen.

$LT\alpha$ kommt in verschiedenen aktiven Formen vor, zum einen als sezerniertes lösliches, trimerisches Protein ($sLT\alpha$), das die TNF-RI und TNF-RII bindet, und zum anderen als membrangebundenes Protein als Komplex mit $LT\beta$, das konstitutiv auf der Membran exprimiert wird (Ware et al., 1992). Membranständige $LT\alpha/\beta$ -Komplexe binden den $LT\beta$ -R (Crowe et al., 1994). Die spezifischen Mechanismen, welche das Entstehen der membrangebundenen versus der sezernierten Form kontrollieren, sind nicht bekannt. Zahlreiche Untersuchungen weisen jedoch daraufhin, daß $LT\alpha/\beta$ $LT\beta$ -R Interaktionen eine wichtige Rolle für die Entwicklung eines intakten Immunsystems spielen (Baggiolini et al., 1994, Browning et al., 1996).

In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß erstens die Zytokine $TNF\alpha$ und $LT\alpha$ die B-Zellproliferation und IgE-Produktion dosisabhängig induzieren, und daß sie zweitens die CD40/IL-4 vermittelte B-Zellproliferation und IgE-Produktion erheblich steigern.

Andererseits wurde dosisabhängig und signifikant in Gegenwart von anti- $TNF\alpha$ als auch anti- $LT\alpha$ die CD40+IL4 induzierte Proliferation- und IgE-Produktion gehemmt. Die Daten weisen darauf hin, daß $TNF\alpha$ und $LT\alpha$ in CD40/IL-4 stimulierten Zellen als autokrine Faktoren eine wichtige Rolle spielen. Interessanterweise war bei den untersuchten Allergikern nur eine Hemmung der IgE-Produktion bei Patienten mit mäßig erhöhten Gesamt-IgE-Spiegeln zu beobachten, während bei Patienten mit sehr hohen IgE-Spiegeln nur noch ein sehr geringer Effekt zu beobachten war. Als Ursache kommt eine erhöhte endogene Produktion von $TNF\alpha$ und $LT\alpha$ in Betracht, wie sie auch nachgewiesen wurde (s.u.), die dazu führt, daß durch die neutralisierenden Antikörper in den eingesetzten Konzentrationen keine ausreichende Wirkung erzielt wurde.

Um zu bestimmen, ob eine veränderte B Zellantwort gegenüber CD40/IL-4 bei normalen und atopischen Spendern zu finden ist, wurde die Expression von $mLT\alpha$ nach CD40 und IL-4-Stimulation in diesen Gruppen untersucht. Die Daten zeigen eine erhöhte basale $mLT\alpha$ Expression aufgereinigter B-Zellen und eine verstärkte Expression von $mLT\alpha$ nach anti-CD40/IL-4 Stimulation bei atopischen versus normalen Spendern. Dieser Anstieg der $mLT\alpha$ Expression war mit einem vermehrten Nachweis des sezernierten Proteins assoziiert, während bei Normalpersonen kaum sezerniertes $LT\alpha$ Protein nachweisbar war. Zusammengefaßt zeigen diese Ergebnisse, daß beide $LT\alpha$ -Formen vermehrt bei Patienten mit allergischen Erkrankungen nachgewiesen werden. Dies kann einerseits durch eine erkrankungsbedingte Aktivierung des Organismus ausgelöst sein, andererseits auf intrinsische Unterschiede der B-Zellen bei den entsprechenden Patienten hinweisen. Daß B-Zellen von atopischen Patienten unterschiedlich auf Stimulation ansprechen, konnte auch in einer anderen Arbeit demonstriert werden. Hier wurde gezeigt, daß B-Zellen von Atopikern CD23 verstärkt nach anti-CD40/IL-4 Stimulation exprimieren (Patterson et al., 1996).

Zahlreiche Moleküle können die IgE-Produktion in-vitro modulieren, ohne daß eine Wirksamkeit in-vivo bestätigt werden konnte. Daher ist es immer wichtig zu untersuchen, ob das betreffende Molekül auch die Produktion der Keimbahntranskripte beeinflusst. So wurde zum Beispiel gezeigt, daß $INF\gamma$, $INF\alpha$, IL-8 and IL-12 die IgE-Synthese hemmen ohne einen Effekt auf die epsilon-Keimbahntranskripte zu haben, während TGF β einen hemmenden Einfluß hat (Vercelli et al., 1992). Andererseits haben Moleküle wie CD23, IL-5, IL-6, IL-9 und $TNF\alpha$, die die IgE-Produktion steigern, nur teilweise einen fördernden Effekt auf die epsilon-Keimbahntranskripte (Vercelli et al., 1989; Kiniwa et al.,

1992). Auch $LT\alpha$ steigert die IgE-Produktion, und dies offensichtlich über die epsilon-Keimbahntranskripte. Da auch $TNF\alpha$ die IgE-Produktion über die epsilon-Keimbahntranskripte steigert, können wahrscheinlich beide Zytokine über eine Aktivierung ihrer Rezeptoren TNF-RI oder RII wirksam werden, da weder die membrangebundene noch die sezernierte Form von $TNF\alpha$ den $LT\beta$ -R bindet.

Da auch $TNF\alpha$ wie $LT\alpha$ autokrine und parakrine Effekte auf die B-Zellproliferation und IgE-Synthese hat (Aversa et al., 1993, Boussiotis et al., 1994), stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage der relativen Bedeutung von $TNF\alpha$ und $LT\alpha$ in diesem System. In den vorliegenden in-vitro Untersuchungen konnten für beide Zytokine vergleichbare Daten erzielt werden. Andererseits muß berücksichtigt werden, daß $TNF\alpha$ mit höherer Affinität als $LT\alpha$ seine Rezeptoren CD120a and CD120b bindet. Andererseits konnte in den vorhergehenden Untersuchungen gezeigt werden, daß $TNF\alpha$ nur schwach und $LT\alpha$ stark nach anti-CD40 und IL-4-Stimulation (Worm et al., 1994) induziert wurde. Daher muß $LT\alpha$ gegenüber $TNF\alpha$ in seiner Bedeutung als zumindest gleichwertig eingestuft werden. Offensichtlich spielen beide Zytokine eine wichtige Rolle für die Ausbildung einer hinreichenden Immunantwort, da $TNF\alpha/LT\alpha$ Doppel-knockout Mäuse eine erhebliche Störung der Immunantwort aufweisen (Ryffel et al., 1997).

4.3 Bedeutung von Retinoiden und Vitamin D zur Hemmung der IgE-Produktion

Vitamin A spielt für die Proliferation und Differenzierung humaner B-Zellen eine wichtige Rolle (Buck et al., 1990; Blomhoff et al., 1992). Dagegen scheinen Retinoide, welche natürliche oder synthetische Derivate von Vitamin A darstellen, die Proliferation humaner B-Zell-Linien zu hemmen (Fahlman et al., 1995). Sie entfalten ihre Wirkungen in der Zelle durch Bindung an ihre intrazellulär gelegenen Rezeptoren (RAR und RXR), die danach in den Kern translozieren und dort über die Bindung an sogenannte retinoic-acid-responsive-elements (RARE) Gene aktivieren oder hemmen (Kastner et al., 1995). Auch Vitamin D zeigt einen vergleichbaren Wirkmechanismus, mit Aktivierung des intrazellulär gelegenen Vitamin D-Rezeptors. Da der Vitamin D-Rezeptor mit den Retinoid-Rezeptoren Heterodimere bildet und somit ähnlich wie Retinoide zu einer Aktivierung oder Hemmung von Genen führen kann (Freedman et al., 1991), wurde Vitamin D in die Untersuchungen einbezogen.

Die Daten zeigen, daß all-trans und 13-cis Retinsäure die anti-CD40/IL-4-vermittelte B-Zellaktivierung, einschließlich der IgE-Synthese dosisabhängig und bereits bei geringen Konzentrationen hemmen. Da der physiologische Serumspiegel von all-trans-Retinsäure ungefähr bei 10 nM liegt (De Ruyter et al., 1979), sollten im Rahmen einer oralen Retinoidbehandlung ausreichende Serumspiegel erreicht werden, um theoretisch eine Hemmung der IgE-Produktion zu erzielen (Maier et al., 1996).

Allerdings wurde in einem murinen in-vivo Modell nach OvA-Sensibilisierung eine verstärkte IgE-Antwort beobachtet (Barnett et al., 1982). Eine Hemmung der IgE-Produktion in-vitro durch Retinoide wurde dagegen auch mit Mauszellen beschrieben. Hier wurde gezeigt, daß mit IL-4 und Hydrokortison stimulierte B-Zellen aus der Milz der Mäuse in der Gegenwart von Retinoid weniger IgE produzieren (Tokuyama et al., 1996). Als Ursache dieser verschiedenen in-vitro und in-vivo Ergebnisse kommt in Frage, daß Retinoide in-vivo auf andere Zellen Wirkungen haben, die über systemische Effekte die B-Zell-Aktivierung steigern und nicht hemmen. Dennoch wurde die klinische Relevanz der immunologischen Wirkungen von Retinoiden auch in vivo durch andere Arbeiten bestätigt. So wurde gezeigt, daß eine orale Retinoidbehandlung erfolgreich zur Behandlung von

Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden kann (Furner et al., 1990). Darüberhinaus wurde in einem Mausmodell die Wirkung von Retinoiden auf die experimentell induzierte allergische Encephalomyelitis, ein Modell zur Untersuchung einer TH1-dominierten Immunantwort demonstriert (Racke et al., 1995).

Auch mit Vitamin D und seinem Derivat EB1089 wurde eine dosisabhängige Hemmung der CD40/IL-4-stimulierten IgE-Produktion, nicht jedoch der Proliferation beobachtet. Daß Vitamin D die Immunoglobulinproduktion beeinflussen kann, wurde bereits in vorhergehenden Studien gezeigt (Lemire et al., 1984).

Ob Vitamin D oder seine Derivate auch in-vivo zu einer signifikanten Modulation der IgE-Produktion führen können, ist bislang nicht bekannt. Ein therapeutischer Einsatz von Vitamin D muß aufgrund seiner hypercalcämischen Effekte mit Vorsicht betrachtet werden. Allerdings wurden die immunsupprimierenden Eigenschaften des Vitamin D zur Behandlung der Morphea, einer Autoimmunerkrankung, bereits klinisch erfolgreich eingesetzt (Elst et al., 1999). Bei einer Dosis bis zu 0.75 µg/d Vitamin D traten keine wesentlichen Nebenwirkungen auf.

Da $\text{INF}\gamma$ die IgE-Produktion hemmt (Xu et al., 1994), haben wir die $\text{INF}\gamma$ -Produktion in Gegenwart von Retinoiden und Vitamin D untersucht, um zu überprüfen, ob die beobachtete Hemmung der IgE-Produktion über einen $\text{INF}\gamma$ -abhängigen Mechanismus verläuft. Jedoch führten weder all-trans-Retinsäure noch Vitamin D zu einer Induktion der $\text{INF}\gamma$ -Produktion, so daß die Hemmung der IgE-Produktion wahrscheinlich über einen $\text{INF}\gamma$ -unabhängigen Mechanismus verläuft. Jedoch konnten wir zeigen, daß Retinoide offensichtlich die $\text{LT}\alpha$ -Produktion in vitro hemmen und in derzeitigen Untersuchungen prüfen wir die Bedeutung dieses Befundes.

Zusammenfassend zeigen die erhobenen Daten, daß sowohl Retinoide als auch Vitamin D potente Inhibitoren der IgE-Produktion in-vitro sind. Weitere Untersuchungen, die auch in-vivo Modelle einschließen, müssen den therapeutischen Wert dieser Substanzen zur Behandlung allergischer Erkrankungen aufklären.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit Mechanismen der CD40/IL-4-abhängigen IgE-Produktion. Dies kann einerseits als Modell zum Verständnis der Entstehung allergischer Erkrankungen eingesetzt werden; andererseits bietet es die Möglichkeit Moleküle in diesem System zu untersuchen, die zur Therapie allergischer Erkrankungen in Frage kommen.

Im Rahmen des Modells zum Verständnis allergischer Erkrankungen liefern die durchgeführten Arbeiten zur Produktion und funktionellen Bedeutung von LT α in einem CD40/IL-4-abhängigen System einen wichtigen Beitrag. So konnte gezeigt werden, daß LT α nach CD40/IL-4-Stimulation von humanen B-Zellen vermehrt produziert wird und dies in autokriner Weise zu einer Steigerung der CD40/IL-4-vermittelten Proliferation und IgE-Produktion führt. Darüberhinaus konnte eine vermehrte Produktion von LT α bei allergischen Patienten nachgewiesen werden, so daß die funktionelle Relevanz in der Pathogenese allergischer Erkrankungen unterstrichen wird. Die Arbeiten zu den intrazellulären Mechanismen der LT α -Induktion liefern wichtige Hinweise zu CD40/IL-4-vermittelten Signaltransduktionswegen.

Im Rahmen zu Untersuchungen mit Hilfe des CD40/IL-4-abhängigen Systems, die einen therapeutischen Einsatz zur Behandlung allergischer Erkrankungen haben könnten, wurde die Wirkung von Retinoiden und Vitamin D untersucht. Beide Substanzen führen zu einer erheblichen Hemmung der IgE-Produktion in-vitro. Zukünftige Arbeiten werden darauf abzielen, einerseits die Mechanismen dieser Hemmung der IgE-Produktion zu erarbeiten, andererseits mit Hilfe anderer Modelle deren Bedeutung zur Behandlung allergischer Erkrankungen zu studieren. Hierzu gehört vor allem der Einsatz von geeigneten in-vivo Modellen.

Literatur

Eigenzitate

Worm M, Geha RS (1994) CD40 ligation induces lymphotoxin alpha gene expression in human B cells. *Int Immunol.* 6 : 1883-90.

Schadendorf D, Jurgovsky K, Worm M, Czarnetzki BM (1994) In vitro sensitivity of human melanoma cells to chemotherapeutic agents and interferons. *Melanoma Res* 4: 243-9.

Worm M, Geha RS (1995) CD40-mediated lymphotoxin alpha expression in human B cells is tyrosine kinase dependent. *Eur J Immunol.* 25:2438-44.

Ramesh N, Morio T, Fuleihan R, Worm M, Horner A, Tsitsikov E, Castigli E, Geha RS (1995) CD40-CD40 ligand (CD40L) interactions and X-linked hyperIgM syndrome (HIGM1). *Clin Immunol Immunopathol.* 76: S208-13.

- Worm M, Geha RS (1995) Activation of tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin-alpha via anti-CD40 in human B cells. *Int Arch Allergy Immunol* 107: 368-9.
- Schadendorf D, Worm M, Jurgovsky K, Dippel E, Reichert U, Czarnetzki BM (1995) Effects of various synthetic retinoids on proliferation and immunophenotype of human melanoma cells in vitro. *Recent Results Cancer Res* 139: 183-93.
- Worm M, Henz B. M (1995) Molecular regulation of human IgE-synthesis. *J Mol Med* 75:440-447.
- Hermes B, Worm M, Nowak F, Kroczek R, Stein H, Henz BM (1997) Upregulation of CD40 and CD40-ligand in IgE associated diseases. *Acta Derm Venerol (Stockh)* 77:441-445.
- Worm M, Henz- B. M.(1997) Mechanismen der IgE-Synthese. *Hautarzt* 48(10):773-782.
- Worm MM, Tsytsykova A, Geha RS (1998) CD40 ligation and IL-4 use different mechanisms of transcriptional activation of the human lymphotoxin a promoter in B cells. *Eur J Immunol* 28:901-906.
- Worm M, Ebermayer K, Henz BM (1998) LT α is an important autocrine factor for CD40+IL-4 mediated B cell activation in normal and atopic donors *Immunology*94:395-402
- Worm M, Krah JM, Manz R, Henz BM (1998) Retinoic acid inhibits CD40+IL-4 mediated IgE-production in vitro *Blood* 1998
- Oberwalleney G, Henz BM, Worm M: Role of CD80/CD86 in CD40+IL-4 mediated B cell activation in normal and atopic donors. submitted 1999.

Fremdzitate

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (1994) Cellular and molecular immunology. Saunders Company, Philadelphia. pp 187-204.
- Aebischer I., M.R. Stämpfli, A. Zürcher, S. Miescher, A. Urwyler, B. Frey, T. Luger, R.R. White, B.M. Stadler (1994). Neuropeptides are potent modulators of human in vitro immunoglobulin E synthesis. *Eur J Immunol* Aug; 24:1908-13.
- Alderson MR, Armitage RJ, Tough TW, Strockbine L, Fanslow WC, Spriggs M (1993) CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J Exp Med* 178:669-674
- Alimzhanov MB, Kuprash DV, Kosco-Vilbois MH, Luz A, Turetskaya RL, Tarakhovsky A, Rajewsky K, Nedospasov SA, Pfeffer K (1997) Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin beta-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 9302-7.
- Andrews N C, Erdjument-Bromage H, Davidson MB, Tempst P, Orkin SH (1993) Erythroid transcription factor NF-E2 is a hematopoietic-specific basic-leucine zipper protein. *Nature* 262:722.
- Armitage R.J, Macduff BM, Spriggs MK., Fanslow WC (1993) Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines. *J Immunol* 150: 3671.
- Aubry JP, Pochon S, Graber P (1992) CD21 is a ligand for CD23 and regulates IgE-production. *Nature* 358:505-507.
- Aversa G, Punnonen J, Cocks BG, et al. (1993) An IL-4 mutant protein inhibits both IL-4 or IL-13 induced human IgG4 and IgE synthesis and B cell proliferation. *J Exp Med* 178:2213-2218.
- Aversa G, Punnonen J, deVries JE (1993) The 26-kD transmembrane form of tumor necrosis factor a on activated CD4+ T cell clones provides a costimulatory signal for human B cell activation. *J Exp Med* 177:1575-1585.
- Baggiolini M, Dahinden CA (1994) CC chemokines in allergic inflammation. *Immunol Today* 15:127-29.
- Barnett JB (1982) Immunopotential of the IgE antibody response by 13-cis retinoic acid. *Int Arch Allergy Immunol* 67: 287.
- Barrett TB, Shu G, Clark E (1991) CD40 signalling activates CD11a/CD18 (LFA-1) mediated adhesion in B cells. *J Immunol* 146:1722-1729.
- Berberich I, Shu GL, Clark E (1994). Crosslinking CD40 on B-cells rapidly activates nuclear factor-kB. *J. Immunol.* 153:4357-65.
- Besnier, E (1892) Premiere note et observation preliminaires pour servir d'introduction a l'etude diasthesique. *Ann Dermatol Syphyligr* 4, 634.
- Bieber T (1997) Fc epsilon RI on human epidermal Langerhans cells: an old receptor with new structure and functions. *Int Arch Allergy Immunol* 113:30-4.

- Blomhoff HK, Smeland EB (1994) Role of retinoids in normal hematopoiesis and the immune system. *Vitamin A in health and disease* 451.
- Bonnefoy JY, Shields J, Mermod JJ (1990) Inhibition of human Interleukin-4 induced IgE synthesis by a subset of anti-CD23/Fc epsilon RII monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 20:139-144.
- Bottaro A, Lansford R, Xu L, Zhang J, Rothman P, Alt FW (1994) S region transcription per se promotes basal IgE class switching recombination but additional factors regulate the efficiency of the process. *EMBO J* 13:665-674.
- Boussiotis VA, Nadler LM, Strominger JL, Goldfeld AE (1994) Tumor necrosis factor alpha is an autocrine growth factor for normal human B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7007-10.
- Brodie C, Oshiba A, Renz H, Bradley K, Gelfand EW (1996) Nerve growth-factor and anti-CD40 provide opposite signals for the production of IgE in interleukin-4-treated lymphocytes. *Eur J Immunol* 26:171-8.
- Browning JL, Ngam-ek A, Lawton P, DeMarinis J, Tizard R, Chow EP, Hession C, O'Brine-Greco B, Foley SF, Ware CF (1993) Lymphotoxin alpha, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell* 72:847-52.
- Browning JL, Douglas I, Ngam-ek A, Bourdon PR, Ehrenfels BN, Miatkowski K, Zafari M, Yampaglia AM, Lawton P, Meier W, Benjamin CP, Hession C (1995) Characterization of surface lymphotoxin forms. *J Immunol* 154:33-42.
- Browning JL, Androlewics MJ, Ware CF (1991) Lymphotoxin and an associated 33 kD glycoprotein are expressed on the surface of an activated human T-cell hybridoma. *J Immunol* 147:1230-39.
- Bruynzeel-Koomen C (1986) IgE on Langerhans cells: New insights into the pathogenesis of atopic dermatitis. *Dermatologica* 172:181-183.
- Buck J, Ritter G, Dannecker L, Katta V, Cohen SL, Chait BT, Hämmerling U (1990) Retinol is essential for growth of activated human B cells. *J Exp Med* 171:1613-17.
- Burd PR, Thompson WC, Max EE, Mills FC (1995) Activated mast cells produce interleukin 13. *J Exp Med* 181:1371-1380.
- Capron M, Morita M, Woerly G, Lengrand F, Gounni AS, Delaporte E, Capron A (1997) Differentiation of eosinophils from cord blood cell precursors: kinetics of Fc epsilon RI and Fc epsilon RII expression. *Int Arch Allergy and Immunol* 113:48-50.
- Carballido JM, Schols D, Namikawa R, et al. (1995) IL-4 induces human B cell maturation and IgE synthesis in SCID-hu-mice. Inhibition of ongoing IgE production by in vivo treatment with an IL-4/IL-13 receptor antagonist. *J Immunol* 155:4162-4170.
- Choi MS, Brines RD, Holman MJ, Klaus GG (1994) Induction of NF-AT in normal B lymphocytes by anti-immunoglobulin or CD40 ligand in conjunction with IL-4. *Immunity* 1:179-87.
- Coca AF, Cooke RA (1923) On classification of the phenomena of hypersensitiveness. *J Immunol* 6:63-71.

- Coffman RL, Ohara J, Bond MW, Carty J, Zlotnick A, Paul WE (1986) B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide activated B cells. *J Immunol* 136:4538-4545.
- Crowe PD, VanArsdale TL, Walter BN, Ware CF, Hession K, Ehrenfels B, Browning JL, Din WS, Goodwin RG, Smith CA (1994) A lymphotoxin- α -specific receptor. *Science* 264:707.
- Cuff CA, Schwartz J, Bergman CM, Russell KS, Bender JR, Ruddle NH (1998) Lymphotoxin alpha3 induces chemokines and adhesion molecules: insight into the role of LT alpha in inflammation and lymphoid organ development. *J Immunol* 161: 6853-60.
- De Monte L, Thienes CP, Monticelli S, Busslinger M, Gould HJ, Vercelli D (1997) Regulation of human epsilon germline transcription: Role of B cell specific activator protein. *Int Arch Allergy Immunol* 113:35.
- De Ruyter M, Lambert WE, DeLeenheer AP (1979) Retinoic acid: as endogenous compound of human blood. Unequivocal demonstration of endogenous retinoic acid in normal physiological conditions. *Anal Biochem* 98: 234.
- DeTogni P, Goellner J, Ruddle NH, Streeter PR, Fick A, Mariathasan S, Smith SC, Carlson R, Shornick LP, Strauss-Schoenberger J, Russell JH, Karr R, Chaplin DD (1994) Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science* 264:703-6.
- Diaz-Sanchez D, Chegini S, Zhang K, Saxon A (1994) CD58 (LFA-3) stimulation provides a signal for human isotype switching and IgE production distinct from CD40. *J Immunol* 153:10-20.
- Elst EF, Van Suijlekom-Smit LW, Oranje AP (1999) Treatment of linear scleroderma with oral 1,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol) in seven children. *Pediatr-Dermatol*. 1999 16:53-8.
- Estrov Z, Kurzrock R, Pocsik E, Pathak S, Kantarjian HM, Zipf TF, Harris D, Talpaz M, Aggarwal BB (1993) Lymphotoxin is an autocrine growth factor for epstein barr virus infected cell lines. *J Exp Med* 177:763-69.
- Fahlman C, Jacobsen SE, Smeland EB, Lomo J, Naess CE, Funderud S, Blomhoff HK (1995) All-trans and 9-cis- retinoic acid inhibit growth of normal human and murine B cell precursors. *J Immunol* 155:58-66.
- Flores-Romo L, Shields J, Humbert Y (1993) Inhibition of an in vivo antigen-specific IgE response by antibodies to CD23. *Science* 261:1038-1041.
- Fremaux Bacchi V, Fischer E, Lecoanet-Henchoz S, Mani JC, Bonnefoy JY, Kazatchkine MD (1998) Soluble CD21 (sCD21) forms biologically active complexes with CD23: sCD21 is present in normal plasma as a complex with trimeric CD23 and inhibits soluble CD23-induced IgE synthesis by B cells. *Int Immunol*. 10:1459-66.
- Fruman DA, Klee CB, Bierer BE, Burakoff SJ (1992) Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK506 and cyclosporin A. *Proc Natl Sci USA* 89: 3686-3690.

- Fuleihan R, Ramesh N, Horner A, Geha RS (1994) Cyclosporin A inhibits CD40 ligand expression in T lymphocytes. *J Clin Invest* 93:1315-1320.
- Fuleihan R, Ramesh N, Loh R, Jabara H, Rosen FS, Chatila T, Fu SM, Stamenkovic I, Geha RS (1993) Defective expression of the CD40 ligand in X-chromosome-linked immunoglobulin deficiency with normal or elevated IgM. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2170-73.
- Furner BB (1990) Subacute cutaneous lupus erythematosus response to isotretinoin. *Int J Dermatol* 29:587.
- Galli SJ, Gordon JR, Wershil BK (1993). Mast cell cytokines in allergy and inflammation. *Agents and Actions Suppl.* 43:209-20.
- Garrone P, Galibert L, Rousset F, Fu SM, Banchereau J (1994) Regulatory effects of prostaglandin E2 on the growth and differentiation of human B lymphocytes activated through their CD40 antigen. *J Immunol* 152:4282-4290.
- Gauchat JF, Aversa G, Gascan H, deVries JE (1991) Modulation of IL-4 induced germline ϵ RNA synthesis in human B cells by tumor necrosis factor- α , anti-CD40 monoclonal antibodies or transforming growth factor- β correlates with levels of IgE production. *Int Immunol* 4:397-406.
- Gauchat JF, Henchow S, Mazzel G (1993) Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature* 365:340-343.
- Goeddel DV, Aggarwal BB, Gray PW, Leung DW, Nedwin GE, Palladino MA, Patton JS, Pennica D, Shepard HM, Sugarman BJ, Wong GHW (1986) Tumor necrosis factors: gene structure and biological activities. *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol* 51:597.
- Goldfeld AE, Strominger JL, Doyle C (1991) Human tumor necrosis factor α gene regulation in phorbol ester stimulated T and B-cell lines. *J Exp Med* 174:73-78.
- Grabbe J, Haas N, Hamann K, Kolde G, Hakimi J, Czarnetzki BM (1993) Demonstration of the high affinity IgE receptor on human langerhans cells in normal and diseased skin. *Brit J Dermatol* 129:120-123.
- Grammer AC, Swantek JL, McFarland RD, Miura Y, Geppert T, Lipsky PE (1998) TNF receptor-associated factor-3 signaling mediates activation of p38 and Jun N-terminal kinase, cytokine secretion, and Ig production following ligation of CD40 on human B cells. *J Immunol.* 161:1183-93.
- Gruber MF, Bjornadal JM, Nakamura S, Fu SM (1989) Anti-CD45 inhibition of human B-cell proliferation depends on the nature of activation signal and the state of B-cell activation. *J Immunol* 142:4144-52.
- Hamano N, Terada N, Maesako K, Hohki G, Ito T, Yamashita T, Konno A (1998) Effect of female hormones on the production of IL-4 and IL-13 from peripheral blood mononuclear cells. *Acta Otolaryngol Suppl Stockh.* 537: 27-31.
- Hess S, Rensing-Ehl A, Schwabe R, Bufler P, Engelmann H (1995) CD40 function in nonhematopoietic cells. *J Immunol* 155:4588-4595.

- Hofstra CL, Van Ark I, Hofman G, Kool M, Nijkamp FP, Van Oosterhout AJ (1998) Prevention of Th2-like cell responses by coadministration of IL-12 and IL-18 is associated with inhibition of antigen-induced airway hyperresponsiveness, eosinophilia, and serum IgE levels. *J Immunol* 161: 5054-60.
- Hou J, Schindler U, Henzel WJ, Ho TC, Brasseur M, McKnight SL (1994) An Interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 stat. *Science* 265:1701-04.
- Ishizaka, K., Ishizaka T, Hornbrook MM (1966) Physicochemical properties of human reaginic antibody. V. Correlation of reaginic activity with gE globulin activity. *J Immunol* 97, 844-851.
- Ivashkiv LB (1995) Cytokines and STATs: How can signals achieve specificity? *Immunity* 3:1.
- Jabara HH, Ahern D, Vercelli D, Geha RS (1991) Hydrocortisone and IL-4 induce IgE isotype switching in human B cells. *J Exp Med* 177:1557-1560.
- Jabara HH, Fu SM, Geha RS, Vercelli D (1990) CD 40 and IgE: Synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin 4 in the induction of IgE synthesis by highly purified B-cells. *J Exp Med* 172:1861-64.
- Jeannin P, Delneste Y, Lecoanet-Henchoz S, Gretener D, Bonnefoy JY (1998) Interleukin-7 (IL-7) enhances class switching to IgE and IgG4 in the presence of T cells via IL-9 and sCD23. *Blood* 91: 1355-61.
- Jardieu P (1995) Anti-IgE therapy. *Curr-Opin-Immunol*. 1995 7(6): 779-82.
- Jelinek DF, Lipsky PE (1987) Regulation of human B lymphocyte activation, proliferation and differentiation. *Adv Immunol* 40:1-6.
- Jirapongsananuruk O, Hofer MF, Trumble AE, Norris DA, Leung DY (1998) Enhanced expression of B7.2 (CD86) in patients with atopic dermatitis: a potential role in the modulation of IgE synthesis. *J Immunol* 160: 4622-7.
- Johansson, S.G.O.(1967) Raised levels of a new immunoglobulin (IgND) in asthma. *Lancet*.2:951.
- Kansas GS, Tedder TF (1991) Transmembrane signals generated through MHC class II, CD19, CD20, CD39, and CD40 antigens induce LFA-1-dependent and independent adhesion in human B cells through a tyrosine kinase-dependent pathway. *J Immunol* 147:4094-03.
- Karmann K, Huges CCW, Schechner J, Fanslow WC, Pober JS (1995) CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4342-46.
- Kashiwada M, Shirakata Y, Inoue JI, Nakano H, Okazaki K, Okumura K, Yamamoto T, Nagaoka H, Takemori T (1998) Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) stimulates extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity in CD40 signaling along a ras-independent pathway. *J Exp Med* 187:237-44.
- Kastner PM, Mark M, Chambon P (1995) Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life. *Cell* 83: 859-65.

- Katada Y, Tanaka T, Ochi H, Aitani M, Yokota A, Kikutani H, Suemura M, Kishimoto T (1996) B cell-B cell interaction through intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte functional antigen-1 regulates immunoglobulin E synthesis by cells stimulated with interleukin-4 and anti-CD40 antibody. *Eur J Immunol* 26:192-200.
- Kawabe T, Naka T, Yoshida K, Kishimoto T, Kikutani K (1994) The immune responses in CD40-deficient mice: Impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1:167-72.
- Kehrl JH, Miller AH, Fauci AS (1987) Effect of tumor necrosis factor alpha on mitogen-activated human B-cells. *J Exp Med* 166:786-91.
- Kehrl JH, Alvarez-Mon M, Delsing A, Fauci AS (1987) Lymphotoxin is an important T cell-derived growth factor for human B-cells. *Science* 238:1144-48.
- Kimata H (1995) Differential effects on gangliosides on human IgE and IgG4 production. *Eur J Immunol* 25:302-305.
- Kimata H, Lindley I, Furusho K (1995) Effect of hydrocortisone on spontaneous IgE and IgG4 production in atopic patients. *J Immunol* 154:3557-66.
- Kimata H, Yoshida A, Fujimoto M, Mikawa H (1993) Effect of vasoactive intestinal peptide, somatostatin, and substance P on spontaneous IgE and IgG4 production in atopic patients. *J Immunol* 150:4630-4640.
- Kimata H, Yoshida A, Ishioka C, Lindley I, Mikawa H (1992) Interleukin-8 (IL-8) selectively inhibits immunoglobulin E production induced by IL-4 in human B cells. *J Exp Med* 176:1227-1231.
- Kimata H, Yoshida A, Fujimoto M, Mikawa H (1993) Effect of vasoactive intestinal peptide, somatostatin, and substance P on spontaneous IgE and IgG4 production in atopic patients. *J Immunol* 150:4630-4640.
- Kiniwa M, Gately M, Gubler U, Chizzonite R, Fargeas C, Delespesse G (1992) Recombinant interleukin-12 suppresses the of immunoglobulin E by interleukin-4 stimulated human lymphocytes. *J Clin Invest* 90:262-266.
- Korthäuer U, Graf D, Mages HW (1993) Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 361:539-541.
- Kühn R, Rajewski K, Müller W (1991) Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* 254:707-710.
- Kulmburg P, Radke M, Digel W (1998) Lymphotoxin-alpha is an autocrine growth factor for chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* 12:493-8.
- Kuperman D, Schofield B, Wills Karp M, Grusby MJ (1998) Signal transducer and activator of transcription factor 6 (Stat6)-deficient mice are protected from antigen-induced airway hyperresponsiveness and mucus production. *J Exp Med* 198 187:939-48.
- Lalmanach-Girard AC, Chiles TC, Parker DC, Rothstein TL (1993) T-cell dependent induction of NFkB in B-cells. *J Exp Med* 177:1215-21.

- Lane P, Traunecker A, Hueble S, Inui S, Lanzavecchia A, Gray A (1992) Activated human T cells express a ligand for the human B cell associated antigen CD40 which participate in T cell dependent activation of B lymphocytes. *Eur J Immunol* 24:2573-2578.
- Lane P, Brocker T, Hubele S, Padovan E, Lanzavecchia A, McConnell F (1993) Soluble CD40 ligand can replace the normal T-cell derived CD40 ligand signals to B-cells in T-cells dependent activation. *J Exp Med* 177:1209-13.
- Lee HH, Dempsey PW, Parks TP, Zhu X, Baltimore D, Cheng G (1999) Specificities of CD40 signaling: involvement of TRAF2 in CD40-induced NF-kappaB activation and intercellular adhesion molecule-1 up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1421-6.
- Lee WP, Mitchell P, Tijan R (1987) Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* 49:729.
- Lefort S, Vita N, Reeb R, Caput D, Ferrara P (1995) IL-13 and IL-4 share signal transduction elements as well as receptor components in TF-1 cells. *FEBS-Lett* 366:122-126.
- Lemire JM, Adams JS, Sakai R, Jordan SC (1984) 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Invest* 74:657-61.
- Leung DYM (1993) Role of IgE in atopic dermatitis. *Curr Opin Immunol* 5: 956-962.
- DYM, Rhodes AR, Geha RS, Schneider L, Ring J (1993). Atopic Dermatitis. In: *Dermatology in General Medicine*. McGraw-Hill, New York, 1543-1564.
- Life P, Aubry JP, Estoppey S, Schuriger V, Bonnefoy JY (1995) CD28 functions as an adhesion molecule and is involved in the regulation of human IgE synthesis. *Eur J Immunol* 25:333-339.
- Linehan LA, Warren WD, Thompson PA, Grusby MJ, Berton MT (1998) STAT6 is required for IL-4-induced germline Ig gene transcription and switch recombination. *J Immunol* 161:302-10.
- Liu YJ, Joshua DE, Williams GT, Smith CA, Gordon J, MacLennan ICM (1989) Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 342:929-31.
- Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissmann I, Schrieber SL (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66: 807-815.
- Liu M, Freedman LP (1994) Transcriptional synergism between the vitamin D3 receptor and other nonreceptor transcription factors. *Mol Endocrinol* 8:1593-604.
- Loh RK, Jabara HH, Ren CL, Fu SM, Vercelli D, Geha RS (1995) Role of protein tyrosine kinases and phosphatases in isotype switching: crosslinking CD45 to CD40 inhibits IgE isotype switching in human B cells. *Immunol Lett* 45: 99-106.
- MacKie R (1990) Interferon- α for atopic dermatitis. *Lancet* 335:1282-83.
- Mathey-Prevot B, Andrews NC, Murphy HS, Kreissman SG, Nathan DG (1990) Positive and negative elements regulate human interleukin 3 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5046-51.

- Matthews DJ, Clark PA, Herbert J (1995) Function of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma chain in biologic responses of X-linked severe combined immunodeficient B cells to IL-2, IL-4, IL-13, and IL-15. *Blood* 85:38-42
- Maurer D, Stingl G (1995) Immunglobulin E-binding structures on antigen-presenting cells in skin and blood. *J Invest Dermatol* 104:707-710.
- Messer G, Weiss EH, Baeuerle PA (1990) Tumor necrosis factor β (TNF- β) induces binding of the NF-kB transcription factor to a high affinity kB element in the TNF- β promoter. *Cytokine* 2:389-93.
- Messer G, Sprengler U, Jung MC, Honold G, Bloemer G, Pape GR, Teichmueller G, Weiss EH (1991) Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF- β gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF- β production. *J Exp Med* 173:209-15.
- Maier H, Hönigsmann H (1996) Concentration of etretinate in plasma and subcutaneous fat after long term acitretin. *Lancet* 348: 1107.
- Milan D, Griffith J, Su M, Price ER, McKeon F (1994) The latch region of calcineurin B is involved in both immunosuppressant-immunophilin complex docking and phosphatase activation. *Cell*. 79: 437-47.
- Millet I, Ruddle NH (1994) Differential regulation of lymphotoxin (LT), lymphotoxin-b (LT- β) and TNF- β in murine T cell clones activated through the TCR. *J Immunol* 152:433-643.
- Mudde G, Van Reijssen F, Bruynzeel-Koomen C (1992) IgE-positive Langerhans cells and TH2 allergen specific T cells in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 103S.
- Nagumo H, Agematsu K, Shinozaki K, Hokibara S, Ito S, Takamoto M, Nikaido T, Yasui K, Uehara Y, Yachie A, Komiyama A (1998) CD27/CD70 interaction augments IgE secretion by promoting the differentiation of memory B cells into plasma cells. *J Immunol* 161:6496-502.
- Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D, Goeddel DV, Gray PW (1985) Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localisation. *Nucl Acid Res* 13:6361-63.
- Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C (1990) RAG-1 and RAG-2 adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248:1517-1523.
- Ohshima Y, Yang LP, Avicé MN, Kurimoto M, Nakajima T, Sergerie M, Demeure CE, Sarfati M, Delespesse G (1999) Naive human CD4+ T cells are a major source of lymphotoxin alpha. *J Immunol* 162:3790-4.
- Paterson R., Lack G, Domenico JM, Delespesse G, Leung DYM, Finkel TH, Gelfand EW (1996) Triggering through CD40 promotes interleukin-4-induced CD23 production and enhanced soluble CD23 release in atopic disease. *Eur J Immunol* 26:1979-85.
- Pene J, Rousset F, Briere F (1988) Interleukin 5 enhances interleukin-4 induced IgE production by normal human B cells. The role of soluble CD23 antigen. *Eur J Immunol* 188:929-935.

- Pene J, Rousset F, Briere F, et al. (1988) IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons γ and α and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:6880-6884.
- Prausnitz, C, Küstner H (1921). Studien über die Überempfindlichkeit. *Zentralblatt für Bakteriologie, Infektionskrankheiten und Hygiene* 86:160-169.
- Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, deVries JE (1994) Role of Interleukin-4 and interleukin-13 in synthesis of IgE and expression of CD23 by human B cells. *Allergy* 49:576-586.
- Punnonen J, Aversa G, Cocks BG (1993) Interleukin-13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3730-3734.
- Punnonen J, Yssel H, de Vries JE (1997) The relative contribution of IL-4 and IL-13 to human IgE synthesis induced by activated CD4+ or CD8+ T cells. *J Allergy Clin Immunol* 100:792-801.
- Punnonen J, de Waal Malefyt R, van Vlasselaer P, Gauchat JF, de Vries JE (1993) IL-10 and viral IL-10 prevent IL-4 induced IgE synthesis by inhibiting the accessory cell function of monocytes. *J Immunol* 151:1280-89.
- Racke MK, Burnett D, Pak S-H, Albert PS, Canella B, Raine CS, McFarlin DE, Scott DE 1995 Retinoid treatment of experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 154:450-57.
- Reinhold U, Wehrmann W, Kukel S, Kreysel HW (1990) Recombinant interferon-g in severe atopic dermatitis. *Lancet* 335:1282.
- Ren CL, Fu SM, Geha RS (1994) Protein tyrosine kinase activation and protein kinase C translocation are functional components of CD40 signal transduction in resting human B-cells. *Immunol Invest* 123:322-25.
- Ren CL, Morio T, Fu SM, Geha RS (1994) Signal transduction via CD40 involves activation of lyn kinase and phosphatidylinositol-3-kinase and phosphorylation of phospholipase C β 2. *J Exp Med* 179:673-680.
- Roper RL, Brown DM, Phipps RP (1995) Prostaglandin E2 promotes B lymphocyte Ig isotype switching to IgE. *J Immunol* 154:162-70.
- Rousset F, Garcia E, Banchereau J (1991) Cytokine-induced proliferation and Immunoglobulin production of human B-lymphocytes triggered through their CD40 antigen. *J Exp Med* 173:705-710.
- Ryffel B, Di Padova F, Schreier MH, Le Hir M, Eugster HP, Quesniaux VFJ (1997) Lack of type 2 T cell independent B cell responses and defect in isotype switching in TNF-lymphotoxin a-deficient mice. *J Immunol* 158:2126-33.
- Sarfati M, Delespesse G (1988) Possible role of human lymphocyte receptor for IgE (CD23) or its soluble fragments in the in vitro synthesis of human IgE. *J Immunol* 141:2195-2199.
- Schatz DG, Oettinger MA, Schissel MS (1992) V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Ann Rev Immunol* 10:359-383

- Severinson E, Fernandez C, Stavnezer J (1990) Induction of germline immunoglobulin heavy chain transcripts by mitogens and interleukins prior to switch recombination. *Eur J Immunol* 20:1079-1084.
- Shaw G, Kamen R (1986) A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46:659.
- Shimoda K, van Deursen J, Sangster MY, Sarwar SR, Carson RT, Tripp RA, Chu C, Quelle FW, Nosaka T, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld G, Paul WE, Ihle JN (1996) Lack of IL-4-induced TH2 response and IgE class switching in mice with disrupted STAT6 gene. *Nature* 380:630-3.
- Snapper CM, Zelazowski P, Rosas FR, Kehry MR, Tian M, Baltimore D, Sha WC (1996) B cells from p50/NF-kappa B knockout mice have selective defects in proliferation, differentiation, germ-line Chtranscription and Ig class switching. *J Immunol* 156:183-91.
- Souillet G, Rousset F, de Vries JE (1989) Alpha interferon treatment of a patient with hyper IgE-syndrome. *Lancet* ii:1384.
- Stamenkovic I, Clark EA, Seed B (1989) A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *EMBO J* 8:1403.
- Sung SS J., Jung LKL, Walters JA, Jeffes III EWB, Granger GA, Fu SM (1989) Production of lymphotoxin by isolated human tonsillar B lymphocytes and B lymphocyte cell lines. *J Clin Invest* 84:236-42.
- Sung, SSJ, Jung LKL, Walters JA, Chen W, Wang CY, Fu SM (1988) Production of tumor necrosis factor/cachectin by human B cell lines and tonsillar B cells. *J Exp Med* 168:1539-44.
- Tokuyama H, Tokuyama Y, Nakanishi K (1995) Retinoids inhibit IL-4 dependent IgE and IgG1 production by LPS-stimulated murine splenic B cells. *Cell Immunol* 162:153-56.
- Tsubata T, Wu J, Honjo T (1993) B-cell apoptosis induced by antigen receptor crosslinking is blocked by a T-cell signal through CD40. *Nature* 364:645-47.
- Uckun FM, Schieven GL, Dibirdik I, Chandan-Langlie M, Tuel-Ahlgren L, Ledbetter JA (1991) Stimulation of protein tyrosine phosphorylation, phosphoinositide turnover, and multiple previously unidentified serine/threonine-specific protein kinases by the pan-B-cell receptor CD40/Bp50 at discrete developmental stages of human B-cell ontogeny. *J Biol Chem* 266:17478-82.
- Vercelli D, Geha RS (1992) Regulation of isotype switching. *Curr Opin Immunol* 4:794-797-05.
- Vercelli D, Jabara H, Arai K (1989) Endogenous IL-6 plays an obligatory role in IL-4 induced human IgE synthesis. *Eur J Immunol* 19:1419-1424.
- Vercelli D, Jabara H, Arai KI, Geha R (1989) Induction of human IgE synthesis requires interleukin 4 and T/B cell interactions involving the T cell receptor/CD3 complex and MHC class antigens. *J Exp Med* 169:1295-1307.

- Ware CF, Crowe PD, Grayson MH, Androlewics MJ, Browning JL (1992) Expression of surface lymphotoxin and tumor necrosis factor on activated T, B and natural killer cells. *J Immunol* 149:3881-86.
- Weiss SJ, Zeng FF, Bonagura VR (1996) Hyper-IgM syndrome (HIgMs): A B-cell defect. *J Allergy Clin Immunol* 97:393.
- Wu CY, Brinkmann V, Cox D (1992) Modulation of human IgE synthesis by transforming growth factor β . *Clin Immunol Immunopath* 62:277-284.
- Xu L, Rothmann P (1994). IFN γ represses ϵ germline transcription and subsequently downregulates switch recombination to ϵ Int *Immunol* 6:515-521.
- Yoshimoto T, Okamura H, Tagawa YI, Iwakura Y, Nakanishi K (1997) Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3948-53.
- Zieg G, Lack G, Harbeck RJ, Gelfand EW, Leung DY (1994) In vivo effects of glucocorticoids on IgE production. *J Allergy Clin Immunol* 94:220-30.

Verzeichnis der Abbildungen

- Abb. 1: Das IgE-Molekül bindet über C_ε3-Bindungsstelle an seine Rezeptoren und wird aus vier konstanten Domänen der schweren Kette gebildet.
- Abb. 2: Mechanismen der allergischen Reaktion vom Soforttyp.
- Abb. 3: Die IgE-Produktion wird über zwei Signale vermittelt.
- Abb. 4: Der Prozeß der Klassenumschaltung zu IgE.
- Abb. 5: Modulation der IgE-Produktion durch Zytokine und Kontaktmoleküle.
- Abb. 6: Verschiedene Formen von TNF α und LT α .
- Abb. 7: Durchflußzytometrie aufgereinigter B-Zellen mittels anti-CD20 Markierung.
- Abb. 8: Zeitkinetik der Induktion von TNF α und LT α mRNA nach Stimulation mit anti-CD40 in humanen B-Zellen.
- Abb. 9: Einfluß von Actinomycin D und Cycloheximid auf die Induktion von TNF α , LT α und LT β mRNA nach Stimulation mit anti-CD40 oder anti-CD40/IL-4 bei humanen B-Zellen.
- Abb. 10: Synergismus von IL-4 auf die Induktion von TNF α und LT α mRNA nach Stimulation mit anti-CD40 bei humanen B-Zellen.
- Abb. 11: Expression von mTNF α und von mLT α von humanen B-Zellen nach Stimulation mit anti-CD40 und/oder anti-CD40/IL-4.
- Abb. 12: Signaltransduktionswege nach CD40-Aktivierung.
- Abb. 13: CD40-induzierte LT α -Proteinexpression ist PTK-abhängig.
- Abb. 14: Quervernetzung der transmembranen Protein-Tyrosin-Phosphatase CD45 und CD40 resultiert in einer Hemmung der LT α -Proteinexpression.
- Abb. 15: Einfluß der Serin-Threonin-Phosphatasen PP1 und PP2A auf die LT α mRNA-Expression.
- Abb. 16: Schematische Darstellung der LT α -Promotorregion.
- Abb. 17: Charakterisierung der LT α -Promotorregion nach Stimulation mit anti-CD40 oder PMA.
- Abb. 18: CD40 induziert Nukleoproteine, die die NF-kB Bindungsstelle von LT α (-89 bis -99) erkennen und die Untereinheiten p50 und p65 von NF-kB enthalten.
- Abb. 19: Analyse des LT α -Promotors nach Mutation der NF-kB Bindungsstelle.
- Abb. 20: Ein AP-1 ähnlicher Faktor bindet LT α (-128 bis -122bp) und wird in B-Zellen konstitutiv exprimiert.
- Abb. 21: IL-4 induziert STAT6-Bindung an die STAT-Bindungsstelle des LT α -Promotors.
- Abb. 22: IL-4 verstärkt die CD40-vermittelte transkriptionale Aktivierung von LT α .

- Abb. 23: TNF α und LT α induzieren B-Zellproliferation.
- Abb. 24: Hemmung der anti-CD40/IL-4 induzierten Zellproliferation (PBMC und B-Zellen) durch anti-TNF α und anti-LT α .
- Abb. 25: TNF α und LT α steigern die IgE-Produktion humaner PBMC in vitro.
- Abb. 26: Anti-CD40 und IL-4 induzierte IgE-Produktion wird durch neutralisierende AK gegen TNF α und LT α bei PBMC (A) und B-Zellen (B) gehemmt.
- Abb. 27: LT α steigert die Produktion von epsilon-Keimbahntranskripten bei CD40/IL-4 stimulierten Zellen.
- Abb. 28: Hemmung der anti-CD40/IL-4 induzierten Proliferation durch anti-TNF α und anti-LT α bei B-Zellen von Atopikern.
- Abb. 29: Hemmung der IgE-Produktion durch anti-TNF α und anti-LT α bei atopischen Patienten in vitro.
- Abb. 30: Expression von LT α auf humanen B-Zellen von Normalpersonen im Vergleich zu Atopikern.
- Abb. 31: Sekretion von LT α durch humane PBMC von Atopikern im Vergleich zu Normalpersonen.
- Abb. 32: All-trans und 13-cis Retinsäure hemmen die Proliferation und IgE-Produktion bei PBMC.
- Abb. 33: All-trans und 13-cis Retinsäure hemmen die Proliferation und IgE-Produktion bei B-Zellen.
- Abb. 34: Einfluß von Vitamin D auf die Proliferation anti-CD40/IL-4 stimulierter B-Zellen.
- Abb. 35: Vitamin D hemmt die IgE-Produktion anti-CD40/IL-4 stimulierter B-Zellen in vitro.
- Tabelle 1: Bestimmung LT α -Protein in den Kulturüberständen stimulierter Daudi-Zellen mittels ELISA.
- Tabelle 2: Der Einfluß von Retinoiden und Vitamin D auf die IFN γ -Produktion anti-CD40/IL-4 stimulierter B-Zellen.

Lebenslauf

Dr. med. Margitta Worm, geboren am 25.10.1964 in Berlin, ledig.

Schulbildung	1971-1977	Grundschule, Berlin
	1977-1983	Gymnasium, Berlin
	1983	Hochschulreife
Hochschule	1984-1991	Studium der Humanmedizin an der Freien Universität, Berlin
	1990	PJ Innere, University of Wisconsin, USA
	1991	dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Teilapprobation
	1991	Promotion (Asthmapoliklinik, Prof. Kunkel)
	1992	Approbation
Berufliche Tätigkeit	1991-12/1992	Ärztin im Praktikum an der Hautklinik des Virchow Klinikums, Berlin (Prof. Czarnetzki jetzt Henz)
	1-6/1993	wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Hautklinik des Virchow Klinikums, Berlin
	7/1993-7/1995	gefördertes wissenschaftliches Ausbildungsprogramm in der Abteilung für Immunologie, Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA Prof. Raif Geha
	seit 8/1995	wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Hautklinik des Virchow Klinikums,
	seit 1996	im Rahmen der Fusion Hautklinik der Charite Bereich, Allergologie, Berlin (Direktor Prof. Sterry)
	10/1998	Fachärztin für Dermatologie und Venerologie
	1999/2000	Weiterbildung Allergologie und Umweltmedizin

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich alle wissenschaftlichen Arbeiten selbständig und eigenverantwortlich angefertigt habe.

Dr. med. Margitta Worm