

Thema

Der Einfluss von Glutamin im *in vitro* Experiment auf die Freisetzung der Zytokine IL-2 und TNF- α und der Zusammenhang mit der genetischen Variabilität für diese Zytokine bei gesunden Probanden.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der Justus Liebig Universität Gießen

von Thorben Müller
geboren am 14. Januar 1981
in Flensburg

Gießen 2008



Aus der Klinik für Anaesthesiologie, Intensivmedizin & Schmerztherapie
des Universitätsklinikums Gießen-Marburg GmbH, Standort Gießen
Prof. Dr. Dr. h. c. Gunter Hempelmann
Studienleitung: PD Dr. Jörg Engel

1. Gutachter: PD Dr. Engel

2. Gutachter: Prof. Dr. Hackstein

Tag der Disputation: 11.11.2008

1. Einleitung	7
1.1 Einführung in die Thematik	7
1.2 Ernährung	8
1.2.1 Immunonutrition	8
1.2.2 Total Parenterale Ernährung (TPE)	9
1.2.3 Glutamin als Substrat der parenteralen Ernährung	10
1.2.4 Glutamin und seine Wirkung	11
1.3 Das Immunsystem	14
1.3.1 Ein Überblick über die Funktion des Immunsystems	14
1.3.2 Die Zytokine	18
1.3.3 Interleukin-2 (IL-2)	19
1.3.3.1 Die Entdeckung von IL-2	19
1.3.3.2 Die Wirkung und Funktion von IL-2	20
1.3.4 Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)	23
1.3.4.1 Die Entdeckung von TNF- α und seine Namensgebung	23
1.3.4.2 Die Wirkung und Funktion von TNF- α	24
1.4 Humangenetik	26
1.4.1 Molekulare Grundlagen der Humangenetik (109)	26
1.4.1.1 DNA	26
1.4.1.2 Das Eukariontengenom	26
1.4.1.3 Die Variabilität des Genoms	27
1.4.2 Die Bedeutung des Single-Nucleotid-Polymorphismus des IL-2 Gens	28
1.4.3 Die Bedeutung des Single-Nucleotid-Polymorphismus des TNF- α Gens	30
1.5 Zielsetzung der Doktorarbeit	31
2. Material und Methoden	32
2.1 Material	32
2.1.1 Probandengut	32
2.1.2 Probengewinnung	32
2.2 Methoden	33
2.2.1 Einstellung der Glutaminkonzentration	33
2.2.1.1 Verwendete Materialien	33
2.2.1.2 Durchführung der Konzentrationseinstellung	33
2.2.2 Bestimmung von Glutamin mittels hochauflösender Fluoreszenz-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (F-HPLC)	33
2.2.2.1 Verwendete Geräte und Materialien	34
2.2.2.2 Automatisierte Vorsäulen-Derivatisierung	35
2.2.2.3 Gradientenelution	35
2.2.2.4 Qualitätskontrolle bei der Bestimmung von plasmatischem Glutamin mittels F-HPLC	36
2.2.3 In-vitro Aktivierung	37
2.2.3.1 Verwendete Geräte und Materialien	37
2.2.3.2 Durchführung der In-vitro Aktivierung	38

2.2.4 Zytokin Konzentrationsbestimmung mit dem „Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay“ (EASIA)	38
2.2.4.1 Verwendete Geräte und Materialien	38
2.2.4.2 Das Prinzip des „Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay“	39
2.2.4.3 Die Durchführung des „Enzym Amplified Sensitivity Immunoassay“ (EASIA)	40
2.2.4.4 Das Lesen der Mikrotiterplatte	41
2.2.5 Bestimmung des IL-2 und TNF- α Single-Nucleotid-Polymorphismen	41
2.2.5.1 Verwendete Geräte und Materialien	41
2.2.5.2 DNA Extraktion	42
Zell Lyse	42
Protein-Präzipitation	43
DNA Fällung	43
DNA Hydratation	43
2.2.5.3 Bestimmung des IL-2-330 und TNF- α -308 Single-Nucleotid-Polymorphismus mit dem TaqMan	44
Die Lokalisation der untersuchten Single-Nucleotid-Polymorphismen	46
Der Reaktionsansatz	47
Das PCR Programm	48
2.3 Statistik	48
3. Ergebnisse	49
3.1 Die Probandencharakteristika	49
3.2 Der Einfluss von Glutamin auf die IL-2 Freisetzung im Vollblut von Probanden in Verbindung zu dem IL-2 Genotypen	50
3.2.1 IL-2 Freisetzung nach Stimulation mit PMA und Ionomycin in Verbindung zur Glutaminsupplementierung	50
3.2.2 Der Einfluss des Interleukin-2 -330 T/G Polymorphismus	51
3.2.2.1 Verteilung der Genotypen innerhalb der Studienpopulation und ihr Einfluss auf die IL-2 Freisetzung	51
3.2.2.2 Einfluss der IL-2 Genotypen auf die IL-2 Freisetzung unter Glutamin	51
3.3 Schlussfolgerung – IL-2 in Bezug auf die Zielsetzung der Studie	53
3.4 Der Einfluss von Glutamin auf die TNF-α Freisetzung im Vollblut von Probanden in Verbindung zu dem TNF- α Genotypen	54
3.4.1 TNF- α Freisetzung nach Stimulation mit PMA und Ionomycin in Verbindung zur Glutaminsupplementierung	54
3.4.2 Der Einfluss des TNF- α -308 A/G Polymorphismus	55
3.4.2.1 Verteilung der Genotypen innerhalb der Studienpopulation und ihr Einfluss auf die TNF- α Freisetzung	55
3.4.2.2 Einfluss der TNF- α Genotypen auf die TNF- α Freisetzung unter Glutamin	56
3.5 Schlussfolgerung – TNF-α in Bezug auf die Zielsetzung der Studie	58
4. Diskussion	59

4.1 Der Einfluss von Glutamin auf die IL-2 und die TNF-α Freisetzung nach in-vitro Stimulation	59
4.2 Der Einfluss des Interleukin-2 -330 T/G und des TNF-α -308 A/G Polymorphismus auf die IL-2 und die TNF-α Freisetzung unter Glutamin	69
5. Zusammenfassung	75
6. Summary	77
7. Literaturverzeichnis	79
8. Abbildungsverzeichnis	94
9. Tabellenverzeichnis	95
10. Erklärung	96
11. Danksagung	97
12. Curriculum Vitae	98

1. Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik

Der Ernährungszustand ist ein sehr wichtiges Kriterium für die Immunkompetenz eines Patienten. In bestimmten Situationen sind Patienten auf die sinnvolle Substitution von bestimmten Ernährungsbestandteilen angewiesen. Hierzu zählt unter anderem die Aminosäure *Glutamin*, welche in dieser Studie eine zentrale Rolle spielt. Als ergänzende Maßnahme versucht man heute durch gezielte Ernährung einer Immunsuppression von Patienten mit bestimmten Erkrankungen entgegenzuwirken.

Es gibt eine Vielzahl von Mikroorganismen - Viren, Bakterien, Pilze, Protozoen und vielzellige Parasiten -, die im menschlichen Körper Krankheiten auslösen und im Falle einer unkontrollierten Ausbreitung ihren Wirt töten können. Welche Immunantwort zur Wirkung kommt hängt von dem Ort der Infektion und der Art des Krankheitserregers ab. Eine wichtige Funktion im Rahmen von Immunreaktionen besitzen Zytokine. Die untersuchten Zytokine im Rahmen dieser Studie sind *Interleukin-2* (IL-2) und *Tumornekrosefaktor- α* (TNF- α).

Neben dem Einfluss des Ernährungszustandes eines Patienten auf seinen Immunstatus weiß man, dass das Ausmaß einer Wirkung vieler Komponenten des Immunsystems zudem von genetischen Variabilitäten abhängt.

In dieser Studie geht es insbesondere darum, ob *Glutamin* im *in vitro* Experiment einen Einfluss auf die Freisetzung der Zytokine IL-2 und TNF- α hat, und ob dieser auch mit einer genetischen Variabilität für diese Zytokine zusammenhängt.

1.2 Ernährung

Ernährung ist die Aufnahme von Nährstoffen, die für den Aufbau, die Erhaltung und die Fortpflanzung von Lebewesen notwendig sind. Die Ernährung spielt eine wichtige Rolle für die Lebensweise einer Gesellschaft. Sie ist ein wichtiger Aspekt für präventivmedizinische Maßnahmen, und ihr kommt immer größere Bedeutung zu, da die Vermeidung von Krankheiten wesentlich kostengünstiger ist, als ihre Behandlung. Die Ernährungsmedizin macht sich zum Ziel die Idealvorstellungen der Ernährung für die gesamte Bevölkerung durch bestmögliche Realisierung und unter Beachtung des effektiven Einsatzes von Ressourcen umzusetzen.

1.2.1 Immunonutrition

Das Wort Nutrition stammt aus dem Lateinischen und bedeutet Ernährung (nutrire = ernähren). 1959 beschrieben *Scrimshaw et al.* als eine der ersten die Beziehung zwischen Immunsystem und Ernährungszustand bei der Infektionsabwehr. Seit etwa 20 Jahren zielen viele Studiendesigns auf die Wirkung einzelner Ernährungsfaktoren und ihren Einfluss auf bestimmte Komponenten des Immunsystems ab. Untersuchungen haben ergeben, dass Patienten, die einen schlechten Ernährungszustand haben, zu Komplikationen wie bakteriellen Infektionen prädisponieren. Schon 1939 beschrieb *Studley* die Abhängigkeit der Letalität chirurgischer Patienten in Bezug auf ihren Ernährungszustand. Der Ernährungszustand hat direkte Effekte auf die Antigenpräsentierung, die Proliferation und Differenzierung verschiedener Immunzellen und die phagozytische und zytolytische Kapazität der Zellen. Nur eine ausgewogene Ernährung, welche Aminosäuren, Energieträger wie Fett und Glukose, Vitamine und Mineralstoffe beinhaltet, ermöglicht die optimale Synthese von Immunkomponenten.

Ein längerer Eiweißkatabolismus durch Polytrauma, Operationen, Verbrennungen oder Sepsis führt zu wesentlichen metabolischen und immunologischen Veränderungen. Eine Verbesserung der Immunlage kann durch eine gezielte enterale oder parenterale Ernährung bewirkt werden. Einer besonderen Bedeutung bei der Immunonutrition kommt dem Glutamin zu, da freies Glutamin die Aminosäure mit der höchsten Konzentration in Plasma und Muskelgewebe ist und zudem die höchste Umsatzrate aller Aminosäuren hat (1).

1.2.2 Total Parenterale Ernährung (TPE)

Bei der künstlichen Ernährung unterscheidet man die enterale und die parenterale Ernährung. Über Nährstofflösungen, welche parenteral appliziert werden, und Sondennahrung, die enteral verabreicht wird kann man Patienten heute über einen nahezu beliebigen Zeitraum ausreichend ernähren.

Die Indikation zur parenteralen Ernährung ist gegeben, wenn der Patient nicht ausreichend enteral Nahrung zuführen kann, darf oder möchte. Bei der TPE werden Substratlösungen intravenös appliziert, die entweder standardisiert oder individuell hergestellt sind. Zu diesen Substraten gehören Energieträger wie Kohlenhydrate und Fette, Proteine, essentielle Fettsäuren, Elektrolyte, Spurenelemente und Vitamine. Was bei der parenteralen Ernährung nicht gewährleistet ist, ist die Ballaststoffzufuhr. Da es unter parenteraler Ernährung zu Komplikationen wie Infektionen über den zentralvenösen Zugang oder zu einer Darmatrophie kommen kann, sollten die Indikationen streng gestellt werden (1).

1.2.3 Glutamin als Substrat der parenteralen Ernährung

Ein grundlegender Bestandteil einer total parenteralen Ernährung sind Aminosäurelösungen. Im Idealfall umfassen diese Lösungen alle essentiellen und nicht-essentiellen Aminosäuren. Glutamin war in Aminosäurelösungen, die zur parenteralen Ernährung verwendet wurden, lange nicht enthalten. Man ging zu einem davon aus, dass Glutamin als nicht essentielle Aminosäure vom Organismus in ausreichenden Mengen synthetisiert werden konnte. Zum zweiten kann Glutamin als Monoaminosäure aufgrund seiner spezifischen chemischen und physikalischen Eigenschaften kommerziell erhältlichen Aminosäurelösungen nicht zugefügt werden, da L-Glutamin eine sehr geringe Löslichkeit von 35g/l H₂O hat (2). Bereits ab einer Konzentration von 1-1,5 % fällt Glutamin in einer Lösung aus (3). Diese Konzentrationen sind zu gering, um den Bedarf schwer kranker Patienten zu decken. Des Weiteren stand Glutamin aufgrund seiner Instabilität bei Hitzesterilisation einer Zufuhr mit parenteralen Aminosäurelösungen entgegen.

Studien in den 90er Jahren haben gezeigt, dass synthetisch hergestellte Dipeptide eine wesentlich höhere Löslichkeit als Monoaminosäuren haben (2). Mit dem Dipeptid Alanylglutamin konnte eine Löslichkeit von 568g/l erreicht werden, mit Glyzylglutamin eine von 154g/l. Auch während der Hitzesterilisation bleiben diese Peptide thermostabil und lassen sich zudem längere Zeit lagern. Durch diese Erkenntnisse werden die

<p>DIPEPTAMIN®, Fresenius Kabi AG</p> <p>Merkmale:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Zur Substitution der konditionell-essentiellen Aminosäure Glutamin im Rahmen einer parenteralen Ernährung • Als Zusatz zu glutaminfreien Aminosäuren-, Kombinations- oder Komplettlösungen für Patienten, bei denen aufgrund ihrer Erkrankung ein erhöhter Glutaminverbrauch oder -bedarf zu erwarten ist • Leicht lösliches und galenisch stabiles Dipeptid aus Alanin und Glutamin • Optimale Glutaminquelle durch schnelle und vollständige Metabolisierung (aus 20 g Alanyl-Glutamin werden 13,4 g Glutamin freigesetzt) 	<p>GLAMIN®, Baxter GmbH</p> <p>Merkmale:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Zur Zufuhr von Aminosäuren als Proteinbausteine im Rahmen einer parenteralen Ernährungstherapie, insbesondere bei mittelschwer bis schwer katabolen Patienten • 1000 ml Glamin enthalten 111,72 g Aminosäuren, 2,28 g Tyrosin und 20 g Glutamin • In der 1000 ml Infusionslösung werden 20g Glutamin aus 30,27 g N(2)-Glyzyl-L-Glutamin freigesetzt • Die Dosierung wird mit 7-14 ml pro kg KG pro Tag empfohlen, was einer Verabreichung von 10-20 g Glutamin pro Tag entspricht
--	---

Tabelle 1.1: Beispiele für Glutaminlösungen zur Infusion bei erhöhtem Glutaminbedarf.

Aminosäurelösungen den Anforderungen der klinischen Anwendung gerecht, so dass selbst hohe Konzentrationen von Glutamin parenteral appliziert werden können (4). Experimentelle (5, 6) und klinische (7, 8) Untersuchungen konnten eine sehr gute Utilisation von parenteral zugeführtem Glutamin als Dipeptid *in vivo* nachweisen. Dies wird mit der hohen Aktivität extra- und intrazellulärer Peptidasen erklärt (9, 10).

Nach der Bereitstellung kommerzieller Glutamin-Dipeptid-Lösungen stehen diese heute einer breiten klinischen Anwendung zur Verfügung. Zwei Beispiele sind in Tabelle 1.1 aufgeführt.

1.2.4 Glutamin und seine Wirkung

Glutamin hat die Summenformel $C_5H_{10}N_2O_3$. Das Grundgerüst besteht aus fünf C-Atomen, welchen zwei Aminogruppen und eine Carboxylgruppe angehängt sind. Die Strukturformel ist in Abbildung 1.1 dargestellt. Glutamin ist die im menschlichen Organismus am häufigsten vorkommende freie Aminosäure (11). Sie umfasst 25 % der Plasma Aminosäuren und 60 % der freien Aminosäuren im Muskel (12). Pro Liter intrazelluläres Wasser beträgt die Gesamtkonzentration an Aminosäuren im Muskel 35 mmol. Freies Glutamin erreicht eine alleinige Konzentration von 19,5 mmol/l Intrazellulärwasser (1). Die Plasma Konzentration von Glutamin des gesunden Erwachsenen ist etwa 600 μ M (13).

Die Hauptlieferanten von Glutamin sind das Gehirn, die Lunge und vor allem

der Skelettmuskel (12). Diese Organe besitzen die Fähigkeit, Glutamin aus Glutamat und Ammoniak mit Hilfe der Glutaminsynthetase zu synthetisieren (14). Dieser Vorgang spielt sich im Zytosol ab. In diesem Zusammenhang

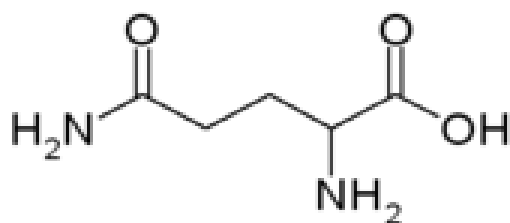


Abbildung 1.1: Die Aminosäure Glutamin mit zwei Stickstoffseitenketten.

fanden *Chakrabarti et al.* heraus, dass TNF- α die Produktion der Glutaminsynthetase der Ratte um das drei bis vierfache steigern kann, bedingt durch einen Einfluss auf das Glutaminsynthetase-Gen (15).

Umgekehrt katalysiert die Glutaminase die Hydrolyse von Glutamin zu Glutamat und Ammoniak, was hauptsächlich in glutaminkonsumierenden Zellen in den Mitochondrien abläuft. Hierzu gehören neben anderen die Mukosazellen des Darms (16), die Lymphozyten oder die Tubuluszellen der Niere. Somit ist Glutamin das wichtigste Substrat für die renale Ammoniakbildung (17, 18) und ist dadurch an der Regulation des Säure-Basen-Haushalts beteiligt. Zudem ist es das wichtigste metabolische Energiesubstrat für die Zellen des Gastrointestinaltraktes (19).

Glutamin liefert als Vorstufe Stickstoff für die Purin-, die Pyrimidin-, und die Nukleotidsynthese und spielt eine wichtige Rolle für die Stickstoffhomöostase in der Leber. Die Leber kann Glutamin sowohl synthetisieren als auch konsumieren, abhängig vom Bedarf anderer Organe (12). In ihr kann das Kohlenstoffgerüst des Glutamins im Rahmen der Glukoneogenese zu Glukose umgebaut werden (20). Zusammenfassend ist Glutamin also ein sehr wichtiges Substrat für viele Stoffwechselwege.

Die Glutaminkonzentration ist von einer Anzahl bestimmter Stresssituationen, welche auf den Organismus einwirken, abhängig. Die Plasmakonzentrationen sinken beispielsweise bei Sepsis (21), nach Operationen (22) und durch Verbrennungen. *Parry-Billings et al.* fanden heraus, dass die Glutaminkonzentration bei Patienten mit schweren Verbrennungen 58% unter der einer Kontrollgruppe lag und im Zusammenhang mit einer durch diese Verletzungen bedingten Herabsetzung der Immunfunktion zu stehen scheint (23). Die Abnahme von Glutamin unter diesen Bedingungen übersteigt die von anderen Aminosäuren und dauert auch während der Erholungsphase noch an. Es besteht eine enge Beziehung zwischen der Konzentration von freiem Muskel-Glutamin und der Rate der

Proteinsynthese. Der Erhalt des intrazellulären Glutaminpools scheint also die Erhaltung von Muskelprotein während katabolem Stress zu fördern (24).

Aufgrund des Ungleichgewichts zwischen Glutaminsynthese und dem Glutaminverbrauch durch bestimmte katabole Stoffwechsellagen des menschlichen Organismus wird Glutamin heute als eine bedingt essentielle Aminosäure eingestuft (25).

Ehrensvar *et al.* berichteten 1949 als erste über die Wichtigkeit von Glutamin für das Überleben von Zellen und für ihre Proliferation (26). Heute weiß man, dass besonders die Zellen des Immunsystems einer funktionellen Regulation durch unterschiedliche physiologische Plasma Glutamin Spiegel unterliegen (27). Studien demonstrierten eine auffallende Abhängigkeit der Lymphozytenfunktion von der Glutamindosis (28). Durch Funktionen des Glutamins wie Zellproliferation und Verstärkung von Immunzellen hat es klinische Relevanz bei Immunantworten (29).

Lymphozyten und Makrophagen benötigen große Mengen an Glutamin, sogar im Ruhezustand (30-33). Diese hohe Glutaminverwertung und der starke Glutaminanstieg während der Aktivierung lässt die Vermutung zu, dass Glutamin eine zentrale Rolle für diese Immunzellen spielt. Es ist eine sehr wichtige Substanz für Schlüsselereignisse während der Lymphozytenaktivierung. In diesem Zusammenhang reguliert Glutamin in *in vitro* Experimenten die T-Lymphozyten Proliferation, die Interleukin-2 (IL-2) Produktion und die IL-2 Rezeptorexpression (11, 28). Auch die Differenzierung von B-Lymphozyten in Plasmazellen ist von Glutamin abhängig und steigt stark bei Glutaminkonzentrationen, welche über physiologischen Konzentrationen liegen (34). Es konnte außerdem beobachtet werden, dass die MHC II Expression bei einer Senkung der extrazellulären Glutaminkonzentration von 2 auf 0,2 mmol um 40% zurückging und die Antigenpräsentation entsprechend sank (35). Gleichzeitig wurde unter diesen Bedingungen eine Verminderung der Phagozytose von durch Komplement opsonierten *Escherichia Coli* beobachtet. Im Umkehrschluss

lässt sich hier also eine Abhängigkeit der Immunantwort von Glutamin erkennen.

Es gibt Studien darüber, dass Glutamin im Rahmen einer totalen parenteralen Ernährung von chirurgischen Patienten zwar die T-Zell Funktion erhöht, dafür aber keinen Einfluss auf die Synthese der Zytokine IL-2 oder TNF- α hat (36). *Yaqoob et al.* veröffentlichten, dass Glutamin die Zytokinproduktion (darunter auch IL-2 und TNF- α) durch T-Lymphozyten verstärkt, die Zytokinproduktion durch Monozyten dagegen jedoch kaum beeinflusst (37).

Aufgrund des Einflusses der Zytokine wie Interleukine und Tumornekrosefaktor auf die Funktion und Modulierung des Immunsystems besteht großes Interesse an der Wirkung von Glutamin auf die Produktion von Zytokinen durch bestimmte Immunzellen. Die Wirkung und Funktion der Zytokine wird im folgenden Kapitel herausgearbeitet.

1.3 Das Immunsystem

1.3.1 Ein Überblick über die Funktion des Immunsystems

Jede Immunantwort beginnt mit der Erkennung eines Pathogens und geht in eine Reaktion zur Vernichtung des Krankheitserregers über. Die Arten der Immunantwort lassen sich grob in zwei Kategorien unterteilen. Die angeborene (nichtadaptive) und die erworbene (adaptive) Immunität.

Bei der angeborenen Immunantwort spielen Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten aus der Gruppe der Phagozyten eine entscheidende Rolle. Ihre Erkennungsmechanismen für das Pathogen sind im Gegensatz zur erworbenen Immunität unspezifisch.

Die Besonderheiten der erworbenen Immunität sind Spezifität und Gedächtnis. Die Immunantwort verbessert sich nach jedem erneuten

Zusammentreffen mit dem gleichen Pathogen und für bestimmte Krankheiten kann sogar lebenslange Immunität erreicht werden. Die zentrale Rolle hierbei spielen die B- und T-Lymphozyten. Sie erkennen die Pathogene ganz spezifisch, egal ob diese sich intra- oder extrazellulär im Organismus befinden. B-Zellen bekämpfen intrazelluläre Pathogene durch die Freisetzung von Antikörpern. Die T-Zellen funktionieren entweder durch Zytokinfreisetzung oder durch direkte Zell-zu-Zell-Interaktionen.

Phagozyten und Lymphozyten stehen in ständigen Wechselwirkungen zueinander. Phagozyten können den Lymphozyten Antigen präsentieren, woraufhin diese Zytokine freisetzen, welche wiederum die Phagozyten zur Phagozytose der Pathogene anregen. In einer anderen Wirkungsweise benutzen Phagozyten Antikörper als Erkennungshilfe für Pathogene. Eine Immunantwort besteht also immer aus einer Vielzahl angeborener und erworbener Komponenten.

Den Anteil der Blutzellen, welche für die Immunität verantwortlich sind, bilden die Leukozyten. Sie lassen sich grob in Lymphozyten, Phagozyten und Helferzellen, welche Entzündungsmediatoren ausschütten können, unterteilen.

Phagozyten liegen im Blut als Monozyten vor. Diese können sich im Gewebe zu Gewebsmakrophagen differenzieren und den T-Lymphozyten äußerst wirksam Antigen präsentieren. Zu den Phagozyten gehören auch die neutrophilen und die eosinophilen Granulozyten.

Lymphozyten leiten wegen ihrer Spezifität die erworbene Immunantwort ein. Die Lymphozyten stammen alle von den Knochenmarksstammzellen ab. T-Lymphozyten entwickeln sich im Thymus weiter, B-Lymphozyten im Knochenmark. Die B-Lymphozyten erkennen das Antigen ganz spezifisch und differenzieren sich zu Plasmazellen. Diese beginnen mit der Produktion spezifischer Antikörper. Diese Antikörper binden anschließend an das für sie spezifische Antigen und markieren es dadurch, damit es dann von anderen Teilen des Immunsystems erkannt und eliminiert wird.

T-Zellen werden in unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Die T-Helferzellen (Th) werden durch B-Zellen und Antigen-präsentierende-Zellen (APC) angeregt Zytokine zu produzieren. Diese interagieren mit B-Zellen und regen sie zur Proliferation und Differenzierung sowie zur Antikörperproduktion an. Zudem unterstützen sie die mononukleären Phagozyten bei der Zerstörung von Pathogenen. Die zytotoxischen T-Zellen (Tc) haben die Aufgabe Wirtszellen, welche von intrazellulären Pathogenen befallen sind, zu zerstören. Ihre Wirkungsweise wird somit Zytotoxizität genannt. Die T-Zellen erkennen die Antigene nur in Verbindung mit dem spezifischen T-Zellen-Antigenrezeptor (TCR).

Basophile Granulozyten und Mastzellen können aus ihren Granula eine Vielzahl von Mediatoren freisetzen, welche in ihrem umliegenden Gewebe eine Entzündungsreaktion hervorrufen. Das Ziel einer solchen Entzündungsreaktion ist es, Leukozyten und lösliche Immunmediatoren an den Sitz der Infektion zu locken.

An der Entwicklung einer Immunantwort sind neben den Antikörpern und Zytokinen auch eine Reihe von Proteinen beteiligt, die im Serum vorhanden sind. Die Serumkonzentration dieser Proteine erhöht sich während einer Infektion sehr schnell, weshalb man sie Akute-Phase-Proteine nennt. Ein Beispiel ist das C-Reaktive-Protein (CRP), welches die Anlagerung von Komplement und somit die Phagozytose begünstigt. Dieser Vorgang wird Opsonierung genannt.

Das Komplementsystem besteht aus einer Gruppe von etwa 20 Serumproteinen, die in ihrer Gesamtheit die Steuerung einer Entzündung übernehmen. Einige dieser Proteine sind Akute-Phase-Proteine. Die Anlagerung von Komplementmolekülen auf einem Mikroorganismus bewirkt seine Phagozytose. Wird das Komplementsystem auf diese angeborene, unspezifische Art aktiviert spricht man von der „alternativen Aktivierung“.

Eine Aktivierung des Komplementsystems kann aber auch durch Antikörper, welche auf der Oberfläche eines Pathogens gebunden sind, erreicht

werden. Bei dieser spezifischen, erworbenen Immunantwort spricht man von „klassischer Aktivierung“. Die Reaktionen des Komplementsystems laufen in einer Kaskade ab. Sowohl beim alternativen als auch beim klassischen Komplementweg entstehen Peptide mit unterschiedlichen Wirkungen. Durch Opsonierung werden Mikroorganismen zur Phagozytose vorbereitet. Plasmamembranen von vielen Bakterienspezies können lysiert werden. Die bei dieser Reaktion freiwerdenden Stoffe bewirken das Anlocken von Phagozyten zum Infektionsort. Dieser Vorgang wird Chemotaxis genannt. Zudem erhöhen die Peptide die Durchblutung am Infektionsort und die Kapillarpermeabilität für Plasmamoleküle.

B-Lymphozyten synthetisieren Immunglobuline. Im Prinzip stellen diese die lösliche Form des Antigenrezeptors der B-Zellen dar. Antikörper besitzen die gleiche Grundstruktur. Jeder Antikörper kann jedoch ganz spezifisch nur ein Antigen binden, abhängig von seiner Antigenbindungsstelle. Ist ein Antikörper mit einem Pathogen verbunden, kann er sich anschließend an einen Phagozyten binden um dann aufgenommen und phagozytiert zu werden. Der Antikörper wirkt also als Opsonin. Entweder benutzen Phagozyten Antikörper oder aktiviertes Komplement (C3b) als Opsonin.

Wie beschrieben ist das gesamte Immunsystem eine lebenswichtige Funktion des Organismus zum Schutz vor Krankheiten. Es gibt jedoch Organismen, bei denen das Immunsystem selbst die Ursache einer Krankheit ist. Das Immunsystem kann auf unterschiedliche Weise fehlfunktionieren. Fehlfunktionen sind Überempfindlichkeit, Immundefekt und die Autoimmunität des Systems.

Bei der Autoimmunität wird das körpereigene Gewebe nicht korrekt als „Selbst“ erkannt, was eine Entzündungsreaktion eigener Bestandteile zur Folge hat. Das Immunsystem greift also den eigenen Körper an.

Ein Immundefekt kommt zustande, wenn bestimmte Funktionen des Immunsystems ausfallen. Das System ist dann nicht mehr im Stande Infektionen des Individuums zu bekämpfen. Dabei können sich angeborene

Defekte direkt nach der Geburt manifestieren oder es entwickeln sich Defekte zum Beispiel durch Infektion mit dem human immunodeficiency virus (HIV).

Die Überempfindlichkeitsreaktion ist eine übersteigerte Immunantwort. Die Immunreaktion steht nicht mehr im Verhältnis zum Schaden, der durch das Pathogen ausgelöst wird. Beispiele hierfür sind Heuschnupfen oder Asthma bronchiale. (38)

Eine wichtige Rolle für die Teilung und Differenzierung von Immunzellen spielen also wie beschrieben die Zytokine. Zudem sind diese wichtig für die Signalübermittlung von Immunantworten und die Zellkommunikation.

1.3.2 Die Zytokine

Der Name der Zytokine stammt aus dem Griechischen und setzt sich aus den Begriffen *κύτος* (Zyto = Zelle) und *κίνησις* (Kinese = Bewegung) zusammen. Die Charakterisierung der Zytokine begann Mitte des 20. Jahrhunderts. Zytokine stellen eine große Gruppe von zumeist nur einfachen Polypeptiden (5-100 kDa) mit hormonähnlichem Charakter dar. Sie werden nach Stimulation von unterschiedlichen Zelltypen freigesetzt und wirken auf zahlreiche Zellen des Immunsystems. Man weiß heute, dass die Wirkung der Zytokine äußerst vielfältig ist. Ihnen werden unter anderem regulatorische Fähigkeiten auf die Ontogenese, Geweberegeneration, Immunabwehr, Entzündung und Apoptose zugesprochen. Die Wirkungscharakteristika der Zytokine sind (39, 40):

- Syntheseaktivierung durch auslösende Substanzen
- Häufig stimuliert ein Zytokin die Wirkung eines anderen, mitunter auch seine eigene Synthese
- Pleiotropie: Ein Zytokin löst mehrere Wirkungen aus
- Redundanz: Mehrere Zytokine lösen gleiche Wirkungen aus

- Synergismus: Mehrere Zytokine zusammen erreichen eine Wirkungsverstärkung
- Zytokinrezeptoren können zellständig, löslich oder beides sein
- Zytokine können auto-, para-, juxta- und endokrin wirken

Funktionelle Klassifikation:

Interferone (IFN)
Interleukine (IL-1 bis IL-23)
Tumornekrosefaktor (TNF)
Koloniestimulierende Faktoren (CSF)
Wachstumsfaktoren (EGF, PDGF)
Transformierende Wachstumsfaktoren (TGF)
Chemokine
Virokine

In den 70er Jahren wurden die Zytokine noch nach ihren Funktionen benannt (z.B. T-cell growth factor). Aufgrund der mittlerweile mehr als 40 entdeckten Zytokine unterliegt ihre Einteilung heute einer strengen Klassifikation nach Funktion, Struktur oder

Tabelle 1.2: Klassifikation der Zytokine nach Funktionen.

Rezeptorklasse. Ihre funktionelle Klassifikation ist in Tabelle 1.2 dargestellt. Seit 1992 werden die Bedingungen nach denen neu entdeckte Zytokine in die Gruppe der Interleukine aufgenommen werden, von der WHO geregelt (41). Eine zentrale Rolle in dieser Studie nehmen die Zytokine IL-2 und TNF- α ein.

1.3.3 Interleukin-2 (IL-2)

1.3.3.1 Die Entdeckung von IL-2

1976 wurde der T-Cell-Growth-Factor (TCGF) erstmals durch *Morgan et al.* in der Zeitschrift *Science* beschrieben (42). 1979 wurde diesem Faktor der Name Interleukin-2 gegeben und man erkannte sehr bald, dass er einer der Hauptfaktoren bei der physiologischen T-Zellproliferation ist (43).

IL-2 ist ein 153 Aminosäuren umfassendes, etwa 15 kDa schweres Glykoprotein (44). Aufgrund damaliger Entdeckungen, dass IL-2 von

antigenaktivierten T-Lymphozyten produziert wird, wurde es früher als Lymphokin bezeichnet (42, 45).

1.3.3.2 Die Wirkung und Funktion von IL-2

Ähnlich wie TNF- α ist das IL-2 ein potentes immunmodulatorisches Zytokin, welches auf unterschiedliche Immunzellen wirkt (46).

IL-2 kontrolliert die Reifung von aktivierten T-Zellen durch Wachstumsstimulierung und fördert später den Aktivierungs-induzierten Zelltod von selbst reaktiven T-Zellen (47). Dieser Aktivierungs-induzierte Zelltod ist ein wichtiger Mechanismus der Selbst-Toleranz. Er wird durch wiederholte Stimulation durch hohe Level von IL-2 Produktion in CD4+ T-Lymphozyten ausgelöst. Die T-Zellen exprimieren Fas (CD95) und Fas Liganden (FasL), welche Trigger für die Apoptose dieser Zellen sind. Mäuse mit Defekten in Fas, FasL oder im IL-2-Rezeptor zeigen Defekte des Aktivierungs-induzierten Zelltodes und entwickeln Autoimmunkrankheiten (48).

T-Lymphozyten können sich durch IL-2 Produktion selbst stimulieren. Dazu bindet der MHC Komplex einer antigenpräsentierenden Zelle (MHC-Klasse I auf beliebigen Zellen des Organismus, MHC-Klasse II auf B-Lymphozyten) an den T-Zell-Rezeptor auf T-Lymphozyten. Intrazellulär erfolgt die kaskadenartige Aktivierung mehrerer Kinasen an deren Ende Calcineurin steht. Calcineurin aktiviert wiederum Transkriptionsfaktoren, welche insbesondere die Expression des IL-2 Gens in diesem T-Lymphozyten steigern. Parallel exprimiert der gleiche Lymphozyt IL-2 Rezeptoren. Dieser Vorgang wird autokrine Stimulation genannt und regt die Zelle zur Proliferation und Differenzierung an (49-51).

Auch B-Lymphozyten werden über IL-2 aktiviert (52, 53) was unter anderem die Steigerung der Antikörperproduktion zur Folge hat (54).

IL-2 moduliert zudem die Funktion neutrophiler Granulozyten (55) und hat Effekte auf Monozyten. Monozyten reagieren auf IL-2 nicht mit Proliferation sondern mit funktionellen Veränderungen (56). Infolge der

Monozytenaktivierung durch IL-2 werden unterschiedliche weitere Zytokine freigesetzt, was wiederum eine Reihe von immunmodulatorischen Auswirkungen zur Folge hat.

Eosinophile Granulozyten können IL-2 synthetisieren und sezernieren (57, 58). Zudem werden IL-2 Rezeptoren auf eosinophilen Plasmamembranen exprimiert (59). *Hoenstein et al.* schlussfolgerten, dass IL-2 somit ein wichtiger Mediator für allergische Entzündungsreaktionen ist und diesbezüglich einen möglichen Ansatz für pharmakologische Interventionen bietet (60).

Auch Natürliche Killerzellen (NK) werden in ihrer Funktion durch IL-2 unterstützt (61). *Yron et al.* entdeckten 1980, dass Lymphozyten unter dem Einfluß von IL-2 zu Lymphokin-Aktivierten-Killerzellen (LAK) proliferieren und in vitro Tumoren lysieren können, die resistent gegen natürliche Killerzellen sind (62). 1985 publizierten *Mulè et al.* (63) und *Lafreniere et al.* (64) Erfolge von LAK/IL-2 Kombinationstherapien bei der Behandlung einer Reihe von pulmonalen und hepatischen Metastasen am Tiermodell. Aufgrund dieser Erfolge begann man dieses Modell auf den Menschen zu übertragen.

Rosenberg et al. begannen 25 Patienten mit Metastasen zu behandeln, bei denen die Standardtherapie versagt hatte. Die Patienten erhielten autologe LAK Zellen, welche durch Leukapherese gewonnen wurden und bis zu 90 Dosen Interleukin-2. Tumorregressionen über 50% fanden sich bei 11 Patienten, ein kompletter Tumorrückgang konnte bei einem Patienten mit einem metastasierenden Melanom beobachtet werden und bei neun Patienten mit pulmonalen oder hepatischen Metastasen von Melanomen, Kolonkarzinom oder Nierenzellkarzinom stellten sich bedingte Besserungen ein (65). Bei dieser so genannten adoptiven Immuntherapie werden nach mehrtägiger intravenöser Gabe von IL-2 durch Leukapherese weiße Blutzellen gewonnen und außerhalb des Körpers nochmals mit hohen Dosen von IL-2 behandelt. Hierbei entsteht eine große Menge der LAK-Zellen, die dann dem Patienten zur Tumorbekämpfung reinfundiert werden. Die LAK/IL-2 Therapie ist sehr aufwendig und so belastend, dass sie unter

intensivmedizinischen Bedingungen durchgeführt werden muss. Diese Art der Therapie zeigt, dass IL-2 zytotoxisch wirken kann, wenn seine Konzentration über der physiologischen Konzentration liegt. In Studien wurden häufig schon innerhalb von 24 Stunden nach IL-2 Gabe Tachykardien, ein Absinken des mittleren arteriellen Blutdruckes und eine Verminderung des peripheren Gefäßwiderstandes (66, 67) und des linksventrikulären Schlagvolumens (68) beobachtet. Als kardiale Nebenwirkungen wurden darüber hinaus Kardiomyopathien, Myokarditiden und Myokardinfarkte beobachtet (69, 70). *Lee et al.* berichteten 1989 neben kardialen Nebenwirkungen über periphere Ödeme, Aszites, Pleuraergüsse und respiratorische Insuffizienz bis hin zum intubationspflichtigen ARDS, welche bei ihren Patienten auftraten (66). *Belldegrun et al.* untersuchten die renale Funktion bei Patienten unter IL-2 Therapie. Es stellte sich heraus, dass die IL-2 Therapie mit Flüssigkeitsretention, Azotämie und Oligurie assoziiert ist (71).

Fast alle Nebenwirkungen in den unterschiedlichen Studien verschwanden innerhalb kurzer Zeit nach Beendigung der IL-2 Therapien.

Heute ist die Zytokintherapie mit Interleukin-2, sowie die LAK Zell Therapie besonders beim Nierenzellkarzinom eine anerkannte Methode (72). Aufgrund der Nebenwirkungen ist jedoch eine strenge Indikation zu stellen.

Die biologische Aktivität von IL-2 wird durch die Interaktion zwischen IL-2 und seinen unterschiedlichen Rezeptoren vermittelt. Diese bestehen aus den Untereinheiten α (IL-2R α), β (IL-2R β) und γ (IL-2R γ). Der isolierte IL-2R α bindet IL-2 mit niedriger Affinität ohne ein Signal zu vermitteln. Der heterodimere IL-2R $\beta\gamma$ bindet IL-2 mittelmäßig stark und er vermittelt ein intrazelluläres Signal. Der heterotrimere IL-2R $\alpha\beta\gamma$ bindet IL-2 mit hoher Affinität und vermittelt ebenfalls Signale (50, 73, 74). Aktivierte T-Lymphozyten können zudem einen löslichen IL-2 Rezeptor (SolL-2R) ins Blut abgeben (75). Hohe Serumspiegel dieses löslichen Rezeptors sind bei Patienten mit einem Magenkarzinom ein guter postoperativer Indikator für eine schlechte Prognose (76). Hohe Serumspiegel von SolL-2R wurden auch bei hämolymphopoetischen

Malignomen beschrieben (77, 78). Tumorzellen von Patienten mit Leukämien oder Lymphomen exprimieren fünf bis zehnmal mehr IL-2R auf ihrer Zelloberfläche als aktivierte T-Lymphozyten und sondern hohe Mengen von sIL-2R ins Blut ab. Erhöhte Serumspiegel von sIL-2R wurden auch bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis (79), systemischem Lupus Erythematoses (80), HIV Infektion (81) und Transplantatabstoßung (82-84) gefunden.

Die Regulation der Expression der IL-2 Rezeptor Untereinheiten hängt von extrazellulären Stimuli und von intrazellulärer Kontrolle ab. Somit variiert auch die Reaktion einer Zelle, welche auf IL-2 wirkt, mit den Bedingungen und dem Ausmaß einer Stimulation in der Zellumgebung.

Natürliche Killerzelle (NK) sind angeborene Killerzellen, die 10-15% der peripheren Blutlymphozyten entsprechen. Sie wirken antigenunspezifisch auf ihre Zielzellen und können schnell auf ausgeschüttete Zytokine wirken. Besonders die mit dem Antigen CD56 dicht besiedelten NK und aktivierte T-Lymphozyten können den hoch-affinitiven IL-2R $\alpha\beta\gamma$ (61, 85) exprimieren und bereits auf picomolare Konzentrationen von IL-2 reagieren (46). Dies spielt eine Rolle bei der therapeutischen Gabe von IL-2.

1.3.4 Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)

1.3.4.1 Die Entdeckung von TNF- α und seine Namensgebung

Tumornekrosefaktor (TNF) wurde ursprünglich im Blut von Mäusen entdeckt, welche mit Bacille-Calmette-Guerin (BCG) infiziert waren. Man stellte fest, dass mit der Übertragung dieses Faktors auf tumor erkrankte Mäuse eine fundierte Tumornekrose in den Tieren induziert werden konnte. Aufgrund dieser tumornekrotisierenden, antikanzerogenen Wirkung wurde dieser Faktor daher als Tumornekrosefaktor benannt (86).

TNF- α gehört zur Gruppe der Tumornekrosefaktoren, zu denen außerdem noch TNF- β und Lymphotoxin- β zählen. Es wird im menschlichen Organismus

als Vorstufe mit 233 Aminosäuren sezerniert und durch die Metalloproteinase *TNF- α Converting Enzyme* (TACE) in seine aktive Form mit 157 Aminosäuren gespalten.

1.3.4.2 Die Wirkung und Funktion von TNF- α

TNF- α gehört zu einer Gruppe von proinflammatorischen Zytokinen, welche nach Infektionen und Verletzungen schnell freigesetzt werden (87, 88). Es kann die Differenzierung, die Proliferation, sowie durch Apoptose den Tod von Zellen induzieren (89). Die Synthese von TNF- α erfolgt hauptsächlich durch Makrophagen. Weitere Quellen sind Neutrophile Granulozyten, Mastzellen, aktivierte T-Zellen und andere nicht-lymphatische Zellen (90).

TNF- α vermittelt eine große Anzahl von Effekten. Es verursacht einen Abbau von Fettgewebe, hebt die Körpertemperatur, zügelt den Appetit, und stimuliert die Produktion einer Reihe von unterschiedlichen immunmodulatorischen Zytokinen und Oxidantien (91). Diese Effekte induzieren eine feindliche Umgebung für eindringende Pathogene und verstärken und modifizieren die Aktivität des Immunsystems. Da die Zytokine durch sehr niedrige Konzentrationen wirken (pg/ml) sind ihre Wirkungen sehr eng an ihre zirkulierenden Konzentrationen geknüpft (92). Aus diesem Grund kann eine überschießende Steigerung der Zytokinproduktion die Homöostase eines Organismus schnell ins Ungleichgewicht bringen, so dass es zu organspezifischen oder sogar systemischen Ausfällen kommen kann. Eine Inbalance der Zytokinproduktion spielt daher eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen und Infektionskrankheiten (93). Neben anderen Zytokinen scheint TNF- α bei diesen Prozessen eine zentrale Rolle zu spielen (87). TNF- α kann sich daher trotz seiner protektiven Eigenschaften durch eine vorzeitige oder überschießende Freisetzung durchaus auch negativ auf den Organismus auswirken.

Dies ist beispielsweise der Grund dafür, dass TNF- α eine wichtige Rolle hinsichtlich der Mortalität bei Meningitis (94), Sepsis (95) und Malaria (96) spielt. Aber auch bezüglich der Pathologie von entzündlichen Erkrankungen wie die Rheumatoide Arthritis (97), chronisch entzündliche Darmerkrankungen (98), die Entwicklung von artherosklerotischen Plaques (99) und die Transplantatabstoßung (100) hat TNF- α einen Einfluss.

Heute kommt der TNF- α -Blocker Etanercept (Enbrel®) bei therapierefraktärer rheumatoider Arthritis und bei MTX-refraktärer aktiver juveniler chronischer Arthritis zum Einsatz (101).

Es gibt zwei unterschiedliche TNF Rezeptoren (TNF-R), die beide TNF binden. Auf den meisten Zelloberflächen kommt TNF-R1 (102, 103) auf vielen Zellen kommen aber auch beide Rezeptoren vor. TNF-R2 wird dabei vorwiegend von Zellen lymphatischer Abstammung und TNF-R1 wird überwiegend von Zellen epithelialer Herkunft exprimiert (104).

Man kann davon ausgehen, dass der TNF-R1 hauptverantwortlich für die durch TNF induzierten Immunantworten ist, da Mäuse mit einer Fehlfunktion im TNF-R1 Gen resistent für einen durch TNF vermittelten endotoxinen Schock sind (105, 106). Generell werden dem TNF-R1 im Vergleich zum TNFR2 die meisten biologischen Antworten zugesprochen. Hierzu gehören die Apoptose, die genetische Induktion, die antivirale Aktivität und die Zytokinproduktion im Allgemeinen (107).

Der TNF-R2 kann zum einen als TNF Antagonist durch die Neutralisierung von TNF und zum anderen als TNF Agonist durch die Verstärkung der Interaktion zwischen TNF und TNF-R1 an den Zelloberflächen fungieren (108).

Peschon et al. stellten fest, dass es bei Mäusen, durch das Fehlen entweder nur des TNF-R1 oder durch das Fehlen beider Rezeptoren zu Defiziten in der Immunabwehr kommt. Im Gegensatz dazu führte das alleinige Fehlen des TNF-R2 bei Mäusen zu infektexazerbierten Lungenentzündungen mit dramatisch erhöhten TNF Serumspiegeln. Diese Tatsache lässt den Schluss zu, dass der TNF-R2 eine wichtige Rolle bezüglich der Suppression von TNF bei

durch ihn induzierten Entzündungsreaktionen (108) und Gewebenekrosen (107) spielt.

Durch Variabilitäten des Genoms gibt es zwischen Individuen bestimmte Unterschiede in der Höhe der Zytokinfreisetzung. Die Bedeutung dieser genetischen Variationen wird im folgenden Kapitel erklärt.

1.4 Humangenetik

1.4.1 Molekulare Grundlagen der Humangenetik (109)

1.4.1.1 DNA

Die DNA liegt im menschlichen Genom als unverzweigter antiparallel angeordneter, helikaler Doppelstrang vor. Die Grundbausteine dieser Nukleinsäuren sind die Nukleotide. Sie bestehen aus einem Pentosemolekül (Desoxyribose), einer Purinbase oder Pyrimidinbase und einer Phosphatgruppe. Zu den Purinbasen gehören Adenin und Guanin, zu den Pyrimidinbasen Thymin und Cytosin. Als komplementär werden jeweils die Basenpaare Adenin und Thymin sowie Guanin und Cytosin gesehen. In der DNA werden diese gegenüberliegenden Basenpaare in der Doppelhelix über Wasserstoffbrücken verbunden. Die einzelnen Nukleotide sind dabei über Zuckerphosphatketten verkoppelt. Jeweils drei Basen, welche Triplett oder Codon genannt werden, kodieren eine Aminosäure.

1.4.1.2 Das Eukariontengenom

Die Zellen des Homo Sapiens enthalten einen diploiden Chromosomensatz mit 46 Chromosomen. Die Chromosomenpaare 1-22 sind geschlechtsneutral

und werden als Autosomen bezeichnet. Auf dem Chromosomenpaar 23 sind die Geschlechtschromosomen, die Gonosomen, lokalisiert. Frauen besitzen zwei gleiche, Männer zwei unterschiedliche Gonosomen. Die Gene, welche für die Ausprägung eines Erbmerkmals verantwortlich sind, setzen sich aus drei Hauptbausteinen zusammen. Der Steuerungsbaustein besteht aus dem Promotor, welcher den Start der Transkription definiert, dem Enhancer, welcher die Transkription beschleunigt und einem Silencer, welcher bei Bedarf die Genexpression unterdrückt. Die im Rahmen dieser Studie untersuchten Single-Nucleotid-Polymorphismen (SNP) für IL-2 und TNF- α liegen in einer solchen Promoterregion. Der Transkriptionsbaustein besteht aus den Exons, welche für das Genprodukt kodieren und aus den Introns, ein nicht kodierender DNA Anteil. Der dritte Baustein ist der Terminator, welcher das Signal für die Beendigung der Transkription induziert.

Das Genom repräsentiert die gesamte Erbinformation eines Individuums.

1.4.1.3 Die Variabilität des Genoms

Abgesehen von pathogenen Genom- oder Chromosomenmutationen gibt es eine Vielzahl von Mutationen, welche keinen Einfluss auf die Funktion eines Syntheseproduktes haben. Bleibt nach einer Mutation die Funktion des synthetisierten Proteins intakt, spricht man von einem genetischen Polymorphismus. Die meisten bisher beschriebenen Polymorphismen sind Single-Nucleotid-Polymorphismen (SNP). Bei den SNP ist eine Base an einer ganz bestimmten Position gegen eine andere ausgetauscht. So kann das Gen an dieser Stelle entweder heterozygot, homozygot mutiert oder wild sein. Die Existenz verschiedener Allele (Genotypen) eines einzelnen Gens kann mit einer gesteigerten oder reduzierten Synthese des entsprechenden Proteins assoziiert sein. Genau um solche SNP dreht sich die Genotypisierung dieser Studie in Bezug auf IL-2 und TNF- α .

1.4.2 Die Bedeutung des Single-Nucleotid-Polymorphismus des IL-2 Gens

Ein Single-Nucleotid-Polymorphismus (SNP) wurde 1998 durch *John et al.* für IL-2 an der Position -330 (T/G) entdeckt (110). Dieser SNP (chromosomale Lokalisation 4q26-q27) variiert zwischen den Allelen Thymin und Guanin. Die Studie wurde an 79 unverwandten gesunden Probanden der Bevölkerung von Manchester (United Kingdom) durchgeführt. *John et al.* vermuteten, dass dieser Polymorphismus einen direkten Einfluss auf die IL-2 Synthese haben kann und dadurch ein Marker für die Anfälligkeit für bestimmte Entzündungsreaktionen sein könnte (110).

Im Jahr 2000 führten *Reynard et al.* eine ähnliche Studie an Kaukasoiden aus Süd-Ost England durch und beobachteten in Bezug auf IL-2 die gleichen Häufigkeitsverteilungen der Genotypen des -330 Polymorphismus wie sie auch von *John et al.* zwei Jahre zuvor beobachtet wurden (111). Eine weitere Studie wurde 2002 von *Scarel-Caminaga et al.* an 76 Brasilianern der ethnischen Gruppen Schwarzafrikaner, Kaukasoiden und Mulatten durchgeführt. Auch hier ähnelten die Ergebnisse den Studien von *John et al.* und von *Reynard et al.* (112). Man vermutete, dass Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung der Genotypen zwischen bestimmten Bevölkerungsgruppen signifikante klinische Relevanz für Erkrankungen und die Prognose nach Organtransplantation haben könnte, wenn dieser Polymorphismus funktionelle Konsequenzen haben sollte.

2001 schrieben *Cox et al.* über auffallende Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung der Genotypen zwischen afroamerikanischen und weißen Populationen (113). Im gleichen Jahr wurde durch *Hoffmann et al.* veröffentlicht, dass Individuen die homozygot für das G Allel (G/G) sind dreimal mehr IL-2 produzieren als Träger die homozygot für das T Allel (T/T) oder heterozygot (T/G) sind (114). Die IL-2 Produktion wurde an isolierten und stimulierten peripheren Blut Lymphozyten untersucht.

2003 untersuchten *Morgun et al.* ob der IL-2 SNP -330 einen Einfluss auf die Prognose nach Nierentransplantation hat. Überraschender Weise wurde eine Assoziation des T/T Genotyps, nicht jedoch des T/G Genotyps, zu akuter Transplantatabstoßung gefunden, obwohl beide Genotypen zuvor von *Hoffmann et al.* mit einer Korrelation zu niedrigen IL-2 Produktionen beschrieben wurden (115). Im selben Jahr fanden *MacMillan et al.* heraus, dass die Anwesenheit mindestens eines IL-2 G Allels mit zweifach erhöhtem Risiko einer Graft-Versus-Host Reaktion nach Knochenmarkstransplantation assoziiert ist (116).

2004, also ein Jahr später veröffentlichten *Matesanz et al.* eine Studie über die IL-2 Genexpression in Jurkat Zellen in Abhängigkeit des Genotyps bei Multiple Sklerose Patienten. Bei Individuen mit den Genotypen G/T und T/T fand eine höhere Genexpression von IL-2 mRNA statt, als bei denen mit dem G/G Genotyp. Diese Ergebnisse unterscheiden sich auch von den Ergebnissen von *Hoffmann et al.*, welche 2001 veröffentlicht wurden (114, 117).

2005 fanden *Pawlik et al.* heraus, dass bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA) und dem G/G Genotyp die aktive Form der RA häufiger diagnostiziert wird (118). In einer anderen Studie konnte keine statistische Signifikanz der Verteilung der IL-2 Genotypen zwischen Patienten mit funktionierendem Nierentransplantat und Patienten mit akuter Transplantatabstoßung nachgewiesen werden (119).

Zusammenfassend scheinen die möglichen Polymorphismen des IL-2 -330 Gens durch ihren Einfluss auf die IL-2 Produktion eine Rolle für die Entwicklung von Selbst-Toleranz und die Prädisposition zu Autoimmunkrankheiten (114), für Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen (115, 116) und für rheumatische Erkrankungen (118) zu spielen.

Aufgrund der Tatsache, dass der SNP für IL-2 -330 erstmals 1998 beschrieben wurde, gibt es erst relativ wenige Studien über die Funktionen und über die Konsequenzen der unterschiedlichen Genotypen an dieser Position.

1.4.3 Die Bedeutung des Single-Nucleotid-Polymorphismus des TNF- α Gens

Die TNF- α Serumspiegel zwischen gesunden Personen variieren beträchtlich (120). Diese Variabilität hängt von Polymorphismen in der Promoterregion des TNF Gens ab, welche das Ausmaß der TNF Sekretion beeinflussen (121). Dieser Einfluss auf die TNF Freisetzung nach einem inflammatorischen Stimulus scheint klinische Relevanz zu haben, da viele entzündliche und autoimmune Erkrankungen mit einer überschießenden TNF- α Freisetzung assoziiert sind. Es wurden im menschlichen TNF Gen Promoter bereits unterschiedliche Single-Nucleotid-Polymorphismen (SNP) bei Personen mit unterschiedlichen HLA Haplotypen entdeckt (122-125). Der wichtigste SNP wurde an der Position -308 identifiziert (125). Dieser SNP (chromosomale Lokalisation 6p21.3) variiert zwischen dem TNF1 Allel (-308 Guanin) und dem TNF2 Allel (-308 Adenin). Das seltenere TNF2 Allel ist eng mit den MHC Haplotypen HLA-A1, B8 und DR3 assoziiert (126). Diese gehen wiederum mit einer hohen TNF Freisetzung (120, 127, 128) und mit Autoimmunerkrankungen wie zum Beispiel insulinabhängigem Diabetes Mellitus (128) einher. Man sollte dabei jedoch beachten, dass bereits eine Reihe von Erkrankungen gefunden wurden, deren Krankheitsausmaß nicht vom TNF- α -308 Polymorphismus abhängig ist. Hierzu gehören unter anderem Vitiligo (129), das Insulinresistenzsyndrom (130) und Systemischer Lupus Erythematodes (131).

Generell scheinen homozygote Individuen für das TNF2 Allel höhere TNF Serumspiegel zu haben als Individuen, welche homozygot für das TNF1 Allel sind (132). Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass der TNF -308 Polymorphismus eine zentrale Rolle in Bezug auf die TNF Freisetzung spielt und er möglicherweise auch einen genetischen Faktor für die Anfälligkeit MHC assoziierter Autoimmun- und Infektionskrankheiten darstellt (133).

Die genetischen Polymorphismen scheinen zudem eine Rolle bei der therapeutischen Einflussnahme auf die TNF- α Produktion zu spielen. Man weiß

heute, dass ω -3-Fettsäuren antiinflammatorische Eigenschaften durch die Senkung des TNF Spiegels besitzen (134). *Grimble et al.* beobachteten, dass eine solche Senkung der TNF- α Produktion über ω -3-Fettsäuren nicht von dem jeweiligen TNF- α -308 Polymorphismus beeinflusst wird (91). Die gleiche Abhängigkeit der Gabe von ω -3-Fettsäuren lässt sich für die therapeutische Gabe von Glutamin vermuten (135). Aus diesem Grund spielt Glutamin in Bezug auf die TNF- α und die IL-2 Freisetzung in Abhängigkeit zu bestimmten Polymorphismen in dieser Studie eine zentrale Rolle.

1.5 Zielsetzung der Doktorarbeit

Im Rahmen dieser Studie sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Hat Glutamin bei stimulierten Lymphozyten, die in ihrem physiologischen Medium Blut verbleiben, eine steigernde Wirkung auf die IL-2 Freisetzung oder die TNF- α Freisetzung bei einer Konzentration von 2000 μ M im Vergleich zu einer Konzentration, die sich unter der physiologischen Norm bei 250 μ M bewegt?
2. Haben die Single-Nucleotid-Polymorphismen (SNP) IL-2 -330 (T/G) und TNF- α -308 (G/A) einen Einfluss auf die IL-2 beziehungsweise die TNF- α Freisetzung mit oder ohne Glutaminsupplementierung?

Die Versuche für diese Studie wurden *in vitro* durchgeführt. Hier sei darauf hingewiesen, dass die Lymphozyten nicht wie in anderen Studien isoliert wurden, sondern während der Versuche in ihrem physiologischen Medium Blut verblieben sind.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Probandengut

Die Blutproben wurden von gesunden Probanden verwendet. Medikamenteneinnahme, Allergien, Lungen-, Leber- und Nierenerkrankungen, Diabetes mellitus, Autoimmunerkrankungen, konsumierende oder immunsuppressive Krankheiten führten zum Ausschluss aus der Untersuchung. Die Probanden wurden vor der Blutentnahme über die Zielsetzung der Untersuchung aufgeklärt und gaben dafür alle ihre Einwilligung. Das überschüssige Blut, das nicht für diese Untersuchung benötigt wurde, wurde entsorgt.

Alle Blutproben stammen aus einem Probandenkollektiv bestehend aus beiden Geschlechtern. Die Proben wurden von Januar bis Juli 2003 gesammelt. Während der ganzen Zeit waren die Proben bei -20°C tiefgefroren.

2.1.2 Probengewinnung

Für die IL-2 und die TNF- α Konzentrationsbestimmung wurde von jedem Probanden 7,5 ml venöses Vollblut in Natrium-Heparinat-Röhrchen gesammelt.

Parallel dazu wurden für die IL-2 und die TNF- α Gentypisierung von den gleichen Probanden jeweils 10 ml venöses Vollblut in Natrium-Heparinat-Röhrchen gesammelt.

2.2 Methoden

Vor Beginn der Bestimmung der Konzentrationen von IL-2 und TNF- α wurden die Probandenproben auf zwei unterschiedliche Glutaminkonzentrationen eingestellt und anschließend in-vitro aktiviert. Parallel wurde die DNA aus den Probandenproben extrahiert und anschließend wurden die IL-2 -330 und die TNF- α -308 Polymorphismen bestimmt.

2.2.1 Einstellung der Glutaminkonzentration

2.2.1.1 Verwendete Materialien

- Vollblut der Probanden
- RPMI 1640
- L-Alanyl-L-Glutamin

2.2.1.2 Durchführung der Konzentrationseinstellung

Im ersten Schritt wurde das Vollblut 1:1 mit Glutamin freiem RPMI 1640 verdünnt. Dann wurden die Proben mit L-Alanyl-L-Glutamin jeweils auf zwei unterschiedliche Glutaminkonzentrationen eingestellt. Dieses wird im Blut durch Hydrolasen aufgespalten, so dass binnen Minuten das freie Glutamin vorliegt. Zielkriterien hierbei waren eine Konzentration von 2000 μ M und eine von 250 μ M, was der Halbierung der physiologischen Glutaminkonzentration entspricht. Die eingestellten Konzentrationen wurden mit Hilfe der HPLC überprüft.

2.2.2 Bestimmung von Glutamin mittels hochauflösender Fluoreszenz-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (F-HPLC)

Die Bestimmung von Glutamin im Plasma erfolgte mit hochauflösender Fluoreszenz-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (F-HPLC). Dafür wurden die Plasmaproben lyophilisiert (Gefriertrocknung unter Hochvakuum bei

-80°C, CIT-2®, Heraeus, Hanau). Die Lyophilisierung ermöglicht die längerfristige Lagerfähigkeit der Proben bis zur Derivatisierung.

2.2.2.1 Verwendete Geräte und Materialien

- Fluorescence high-performance liquid chromatography system (F-HPLC) bestehend aus einer hydrostatischen Gradientenpumpe, einem Controller für Gradientenprogrammierung (600 EA, Waters, USA) und einem programmierbaren Autosampler für die automatische Derivatisierung (TriathlonA, Spark, Niederlande) mit einem Rheodyne Injektionsventil und einem 100 ml filling loop (AS 300®, Sunchrom, Germany). Die folgenden Säulen wurden für die Separation gewählt: Nova-PakA, 300 mm x 3.9 mm I.D.; RPC- 18, 4 mm (Waters, USA). Die Temperatur wurde bei 35°C mit einem Säulenofen (Knauer, Germany) gehalten. Die Fluoreszenz wurde mit einem Fluoreszenz Spektromonitor (RF-530A, Shimadzu, Japan) gemessen. Die Messungen wurden mit einer Exzitationswellenlänge von 330 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm bestimmt. Die Datenaufnahme und die Auswertung wurden mit der „computer integration software“ (EuroChrom 2000A Knauer, Germany) durchgeführt.
- Standardextraktionspuffer bestehend aus einem Gemisch von 80% „Methanol für die HPLC“ und 20% „H₂O für die HPLC“ (beide Merck, Darmstadt), welcher zusätzlich zur internen Standardisierung der Analytik das in physiologischen Aminosäuregemischen nicht vorkommende Homoserin (Sigma, Deisenhofen) in einer Konzentration von 4 µg/ml beinhaltet
- Laborzentrifuge: Universal/K2S, Werknummer 39366, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
- Probengefäß: 2-CRV® Chromacoll, Trumbull, USA
- Boratpuffer (Fa. Merck, Darmstadt)
- o-Phtaldialdehyd-Mercaptoethanol-Reagenz, OPA-Thiol-Reagenz (Fa. Merck, Darmstadt)

- 0,75 N HCl (Fa. Merck, Darmstadt)
- Elutionspuffer (siehe Tabelle 2.1 Seite 36)

2.2.2.2 Automatisierte Vorsäulen-Derivatisierung

Die lyophilisierten Proben wurden vor der Vorsäulenderivatisierung manuell durch Aufpipettieren von 280 µl Standardextraktionspuffer gelöst und in einen methanolischen Extrakt überführt. Der Standardextraktionspuffer gewährleistet die kurzfristige Lagerungsfähigkeit der resuspendierten Aminosäurenlyophilisate im Rahmen der sich anschließenden automatisierten Vorsäulen-Derivatisierung. Nach der Zentrifugation wurden 200 µl des Extrakts in ein spezielles Probengefäß gebracht und anschließend automatisiert mit 0,5 M Boratpuffer auf einen pH=9,5 basisch gepuffert. Danach wird o-Phtaldialdehyd-Mercaptoethanol-Reagenz (OPA-Thiol-Reagenz) zur Fluoreszenzmarkierung der Aminosäuren zugesetzt. Die Derivatisierung wurde nach exakt 120 Sekunden durch Neutralisierung mittels 0,75 N HCl gestoppt, um die Stabilität der im alkalischen Medium Fluoreszenzmarkierten Aminosäuren zu gewährleisten und die Stabilität des Säulenmaterials zu schonen. Dieser Ansatz wurde weiterhin mit dem Elutionspuffer A 1:4 verdünnt und 50 µl dieser Lösung in das System injiziert.

2.2.2.3 Gradientenelution

Nach sorgfältiger Äquilibrierung der Analytik über mehr als vier Stunden erfolgte die Gradientenelution. Zur Verwendung kam ein binäres Eluentensystem mit Methanol-Acetat (0,05 M)-Puffern. Die Elutionspuffer wurden mit einer Flussrate nach den in Tabelle 2.1 beschriebenen Mischungsverhältnissen in das F-HPLC-System eingespeist. Die von der Gradientenpumpe erzeugte Flussrate beträgt 1 ml x min⁻¹. Der aufgrund dieser Flussrate im System entstehende Arbeitsdruck betrug je nach Puffer-Mischungsverhältnis zwischen 2900 und 3500 PSI. Die zur Fluoreszenzdetektion

der Aminosäuren verwendete Anregungswellenlänge lag bei 330 nm, die Emissionswellenlänge bei 450 nm.

Gradientenzeitverläufe

Zeit (min)	Puffer A	Puffer B
0	97	3
3	97	3
3,1	100	0
37	70	30
63	0	100
67	97	3

Puffer A: 19% Methanol / 81% 0,05 M Acetat, pH 7,2

Puffer B: 75% Methanol / 25% 0,05 M Acetat pH 7,2

Flussrate: 1ml/min

Druck: 2900 PSI + 150 PSI (A: 97% / B: 3%)

Fluoreszenzdetektion:

Anregungswellenlänge: 330 nm, Emissionswellenlänge: 450 nm

Tabelle 2.1: Elutionsbedingungen des binären Gradientenelutionssystems zur Analyse von Glutamin. Zur Verwendung kommen zwei vorgemischte Methanol-Acetatpuffer.
1 PSI = 6894,76 Pa.

2.2.2.4 Qualitätskontrolle bei der Bestimmung von plasmatischem Glutamin mittels F-HPLC

Um die Reproduzierbarkeit und die Qualität der Messergebnisse im Rahmen der F-HPLC Quantifizierung der Aminosäuren konstant gewährleisten zu können, wurde die Analytik kontinuierlich mittels externen sowie internen Standardisierungsverfahren überwacht.

Die Variationskoeffizienten für die Reproduzierbarkeit der Methodik (Variationskoeffizienten der Flächen) betragen bei Reihenanalysen von Standardaminosäurenproben im Durchschnitt zwischen 0,86% und 2,34% sowie bei „Tag-zu-Tag“-Analysen zwischen 1,88% und 4,69%. Die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten bei Reihenanalysen liegt im Mittel zwischen 0,02% und 0,23% und bei „Tag-zu-Tag“-Analysen zwischen 0,04% und 0,72%. Wie die Ergebnisse der Reihen- aber auch der „Tag-zu-Tag“-Untersuchungen zeigen, gewährleistet der verwendete Standardextraktionspuffer (80%/20% Methanol-H₂O-Gemisch) die kurzfristige Lagerfähigkeit, so dass es auch nach Resuspendierung der lyophilisierten Standardaminosäurenproben zu keiner weiteren chemischen Umwandlung beziehungsweise zum Verlust an Fluoreszenzaktivität kommt. Die Wiederfindungsrate betrug sowohl bei den Aminosäurenstandardproben wie bei den Plasmaproben für die untersuchten Aminosäuren 100%.

2.2.3 In-vitro Aktivierung

2.2.3.1 Verwendete Geräte und Materialien

- Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Katalognummer P-8139, Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim.

Das PMA liegt als Pulver (1 mg) vor und wird mit 10 ml DMSO auf eine Konzentration von 0,1 mg/ml gelöst. Diese Lösung wird in 25 µl Aliquots bei -20°C aufbewahrt. Für den Gebrauch verdünnt man das aufgetaute PMA 1:100 mit PBS (Stock I-Lösung). Die Stock I-Lösung wird nochmals 1:100 mit PBS verdünnt (Stock II-Lösung), so dass eine Konzentration von 1 ng/µl entsteht.

Davon werden 10 µl (10 ng) mit 1 ml Vollblut inkubiert.

- Ionomycin, Katalognummer I-0634, Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim.

Das Ionomycin liegt als Pulver (1 mg) vor und wird mit 2 ml Äthanol auf eine Konzentration von 0,5 mg/ml gelöst. Diese Lösung kann bei -20°C

aufbewahrt werden. Für den Gebrauch verdünnt man das aufgetaute Ionomycin 1:10 mit PBS (Stock I-Lösung). Die Stock I-Lösung wird nochmals 1:10 mit PBS verdünnt (Stock II-Lösung). Nun hat man eine Konzentration von 0,05 µg/µl. Zur Inkubation mit 1 ml Blut werden 20 µl (1 µg) Ionomycin zugesetzt.

- Brutschrank: BB 16, Bestellnummer 51010689, Heraeus Instruments, Hanau
- Laborzentrifuge: Universal/K2S, Werknummer 39366, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

2.2.3.2 Durchführung der In-vitro Aktivierung

Die in-vitro Aktivierung erfolgte durch 10 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und 1 µg/ml Ionomycin. PMA und Ionomycin stimulieren vorwiegend die Lymphozyten. Beide Stoffe setzen die intrazelluläre, Signal induzierte Kaskade frei und fördern somit die Produktion von Zytokinen. Die Stimulation erfolgte im Inkubator bei 37°C über 8 Stunden. Im Anschluß wurde der Ansatz 5 min lang bei 500g zentrifugiert. Der Überstand der Proben wurde entnommen und bis zur Bestimmung der Spiegel von IL-2 und TNF-α mit dem „Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay“ (EASIA) bei -80°C tiefgefroren.

2.2.4 Zytokin Konzentrationsbestimmung mit dem „Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay“ (EASIA)

2.2.4.1 Verwendete Geräte und Materialien

- EASIA Kits der Firma Biosource Europe, Belgien
TNF-α Katalognummer KAC 1751
IL-2 Katalognummer KAC 1241
Inhalt der Kits:
 - Mikrotiterplatte

- HRP Konjugat
- Konjugatpuffer
- 0 Standard
- 5 Standards
- Inkubationspuffer
- 2 Kontrollen
- Waschlösung
- Chromogen Reagenz
- Substratpuffer
- Stopp Reagenz
- Schüttelapparat: Easyshaker EAS 2/4, Labinstruments, Austria
- Microplate Reader EL 311, Behring GmbH
- Software: ELISA-Software V 2.0.2, Behring GmbH

2.2.4.2 Das Prinzip des „Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay“

In den Untersuchungsreihen wurden IL-2 und TNF- α mit den oben genannten EASIA Kits der Firma Biosource Europe, Belgien bestimmt.

Der EASIA ist ein feste Phase Immunoassay, welcher auf einer Mikrotiter Platte abläuft. Er basiert auf einem oligoklonalen System, in dem eine Mischung aus monoklonalen Antikörpern (MAbs) gegen bestimmte TNF- α Epitope verwendet wird. Die Proben und die Standards, welche TNF enthalten, binden an die monoklonalen Antikörper (MAbs 1), welche wiederum an die Mikrotiterplatte gebunden sind. Nach Inkubation wird der gelegentlich vorhandene Überschuss an Antigenen durch einen Waschvorgang entfernt. Anschließend werden MAb 2 Antikörper, das sind Meerrettich-Peroxidase (HRP) markierte Antikörper, zugegeben. Durch eine weitere Inkubation bildet sich ein MAbs 1 – TNF- α – Mab 2 – HRP „Sandwich“. Im Anschluß folgt ein zweiter Waschvorgang um ungebundene Enzym-Antikörper-Komplexe zu entfernen. Gebundene Enzym-Antikörper-Komplexe werden durch eine chromatische Reaktion gemessen. Zu diesem Zweck wird Chromogenic

Solution (TMB + H₂O₂) zugegeben und dann inkubiert. Die Reaktion wird durch Stop Solution (H₂SO₄) beendet und die Mikrotiterplatte dann bei der vorgegebenen Wellenlänge gelesen. Der Ertrag an Substratumsatz wird photometrisch, durch die Messung der Absorption, welche proportional zur TNF- α Konzentration ist, bestimmt. Die TNF- α Konzentration einer Probe wird in Abhängigkeit von der gemessenen Standardkurve berechnet.

2.2.4.3 Die Durchführung des „Enzym Amplified Sensitivity Immunoassay“ (EASIA)

Vor der Durchführung des EASIA wurden die in-vitro aktivierten Probandenproben 1:10 mit Aqua dest. verdünnt.

Zu Beginn wurden 50 μ l Inkubationspuffer in alle vorgesehenen Wells pipettiert. Dazu wurden 200 μ l der entsprechenden Standards, Proben und Kontrollen gegeben. Nach einer Inkubation über zwei Stunden bei Raumtemperatur, durchgeführt auf einem horizontalen Schüttelapparat bei 700 rpm, wurde der Überstand aus jedem Well entfernt. Im Anschluß wurde die Platte dreimalig gewaschen. Dazu wurden jeweils 0,4 ml Waschlösung in die Wells gegeben und wieder aspiriert. Nach dem Waschvorgang wurden in alle Wells 100 μ l Standard 0 und 50 μ l Anti-TNF- α Konjugate bzw. Anti-IL-2 Konjugat gegeben. Wieder folgte eine Inkubation über zwei Stunden bei Raumtemperatur, durchgeführt auf einem horizontalen Schüttelapparat bei 700 rpm.

Wieder wurde der Überstand entfernt und der Waschvorgang wie oben beschrieben wiederholt. Nach einer Zugabe von 200 μ l Chromogen Reagenz in jedes Well wurde wiederum eine Inkubation über 30 Minuten unter gleichen Bedingungen wie bei den vorherigen Inkubationsvorgängen, wiederholt. In alle Wells wurden dann 50 μ l Stopp Reagenz pipettiert.

2.2.4.4 Das Lesen der Mikrotiterplatte

Zum Lesen der Mikrotiterplatte wurde der Microplate Reader EL 311 der Firma Behring verwendet. Die verwendete Software war Behring ELISA-Software V 2.0.2. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm bestimmt. Nach der Erstellung einer Standardkurve wurden die Konzentrationen berechnet.

2.2.5 Bestimmung des IL-2 und TNF- α Single-Nucleotid-Polymorphismen

2.2.5.1 Verwendete Geräte und Materialien

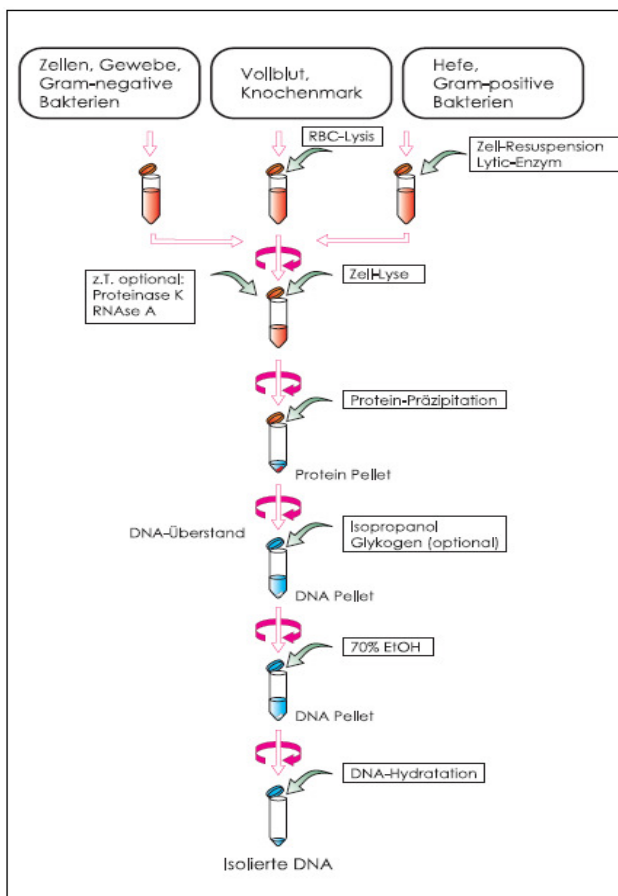
- Genomic DNA Purification Kit, D-5000, Gentra Systems, USA
Inhalt des Kits:
 - RBC Lysis Solution
 - Cell Lysis Solution
 - Protein Precipitation Solution
 - DNA Hydration Solution
 - RNase A Solution
- Laborzentrifuge: Universal/K2S, Werknummer 39366, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
- Vortexer: Minishaker MS1, IKA®
- Isopropanol 100%
- Ethanol 70%
- Extrahierte DNA
- Typisierungskit für den TaqMan, Assays-by-Design, Applied Biosystems
Inhalt des Kits:
 - MasterMixPuffer, bestehend aus Puffer, dNTPs und AmpliTaq Gold® Polymerase
 - Test-Kit, Sonden und Primer, spezifisch für die TNF- α -308 und IL-2-330 Sequenzen synthetisiert – die Sequenzen der Primer und Sonden sind in Tabelle 2.2 Seite 48 aufgeführt

- Aqua dest.
- Taqman ABI Prism 7000, Applied Biosystems, Applied Biosystems GmbH, Darmstadt
- Software: ABI Prism 7000 SDS v1.1

2.2.5.2 DNA Extraktion

Die DNA Extraktion aus dem Vollblut der Patienten wurde mit Hilfe des „Genomic DNA Purification Kit“ D-5000 der Firma Gentra Systems durchgeführt. Die Durchführung der Extraktion gliedert sich in vier Arbeitsschritte: Die Lyse der Erythrozyten und anderer kernhaltiger Zellen, die Protein-Präzipitation, die DNA Gewinnung und die DNA Hydratation (Siehe Abbildung 2.1).

Zell Lyse



3 ml Vollblut wurden in ein 15 ml Tube gegeben, welches mit 9 ml RBC Lysis

Solution gefüllt war. Zum Vermischen wurde das Tube geschwenkt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Ziel dieses ersten Schrittes ist die Lyse der Erythrozyten. Im Anschluß wurde das Tube 10 Minuten lang mit 2000g zentrifugiert um die Zelltrümmer am Boden zu sammeln. Der Überstand wurde entsorgt, so dass das Zellpellet und ca. 100 µl Restflüssigkeit übrig blieben. Um das Zellpellet in der

Abbildung 2.1: Arbeitsablauf DNA Extraktion.

Restflüssigkeit zu resuspendieren, wurde das Tube einige Zeit gevortext. Dieser Schritt diente der Erleichterung der nachfolgenden Zellyse. Zu den resuspendierten Zellen wurden anschließend 3 ml Cell Lysis Solution zugegeben und auf und ab pipettiert um die Zellen so vollständig zu lysieren.

Protein-Präzipitation

Unter Protein-Präzipitation wird die Ausfällung von Proteinen verstanden. Um dies zu erreichen, wurde zu dem Zelllysate 1 ml Protein Precipitation Solution zugegeben. Das Tube wurde jetzt bei höchster Geschwindigkeit gevortext um die Precipitation Solution gleichmäßig mit dem Zelllysate zu vermischen. Anschließend wurde wieder mit 2000g 10 Minuten zentrifugiert. Die ausgefällten Proteine ergaben somit ein festes, dunkelbraunes Pellet.

DNA Fällung

Der Überstand, welcher die DNA beinhaltete, wurde in ein neues 15 ml Tube gegeben, welches mit 3 ml 100% Isopropanol gefüllt war. Die Probe wurde dann ungefähr 50 mal geschwenkt, bis die weißen DNA Fäden einen sichtbaren Klumpen bildeten. Nach einer weiteren dreiminütigen Zentrifugierung bei 2000g war die DNA als weißes Pellet sichtbar. Der Überstand wurde entsorgt und das Pellet im Anschluss mit 3 ml 70% Ethanol durch Schwenken des Tube gewaschen.

DNA Hydratation

Das DNA Pellet wurde in ein mit 250 µl DNA Hydration Solution gefülltes 1,5 ml Cap gegeben. Durch Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht wurde die DNA rehydriert. Der Ertrag der DNA lag im Durchschnitt bei 200 ng/µl. Bis zur Gentyppisierung der gesuchten Polymorphismen wurden die Caps mit der DNA bei -20°C gelagert.

2.2.5.3 Bestimmung des IL-2-330 und TNF- α -308 Single-Nucleotid-Polymorphismus mit dem TaqMan

Zur Bestimmung des IL-2-Single-Nucleotid-Polymorphismus an Position -330 und des TNF- α -Single-Nucleotid-Polymorphismus an Position -308 wurde jeweils ein spezifisches Typisierungskit synthetisiert. Die Sequenzdatei für den IL-2-SNP an Position -330 ist in Abbildung 2.3 dargestellt, die Sequenzdatei für den TNF- α -SNP an Position -308 in Abbildung 2.2.

```

TTCCTTGAA GCCAAGACTG AAACCAGCAT TATGAGTCTC CGGGTCAGAA TGAAAGAAGA
AGGCCTGCC CAGTGGGGTC TGTGAATTCC CGGGGGTGAT TTCACTCCCC GGGGCTGTCC
CAGGCTTGTC CCTGCTACCC CCACCCAGCC TTTCTGAGG CCTCAAGCCT GCCACCAAGC
CCCCAGCTCC TTCTCCCCGC AGGGACCCAA ACACAGGCCT CAGGACTCAA CACAGCTTTT
CCCTCCAACC CCGTTTTTCTC TCCCTCAAGG ACTCAGCTTT CTGAAGCCCC TCCCAGTTCT
AGTTCTATCT TTTTCTGCA TCCTGTCTGG AAGTTAGAAG GAAACAGACC ACAGACCTGG
TCCCCAAAAG AAATGGAGGC AATAGGTTTT GAGGGGCATG
[A/G]
GGACGGGGTT CAGCCTCCAG GGTCCTACAC ACAAATCAGT CAGTGGCCCA GAAGACCCCC
CTCGGAATCG GAGCAGGGAG GATGGGGAGT GTGAGGGGTA TCCTTGATGC TTGTGTGTCC
CCAACTTTCC AAATCCCCGC CCCC GCGATG GAGAAGAAAC CGAGACAGAA GGTGCAGGGC
CCACTACCGC TTCCTCCAGA TGAGCTCATG GGTTTCTCCA CCAAGGAAGT TTCCGCTGG
TTGAATGATT CTTTCCCCGC CCTCCTCTCG CCCAGGGAC ATATAAAGGC AGTTGTTGGC
ACACCCAGCC AGCAGACGCT CCCTCAGCAA GGACAGCAGA GGACCAGCTA AGAGGGAGAG
AAGCAACTAC AGACCCCCC TGAAAACAAC CCTCAGACGC
    
```

Abbildung 2.2: Sequenzdatei für den TNF- α -SNP an Position -308. Schwarze Markierung: Positionen der Primer. Graue Markierung: Position der Sonde. Der SNP ist hier fett dargestellt.

```
CATCAGTATC CTTGAATGCA AACCTTTTTTC TGAGTATTTA ACAATCGCAC CCTTTAAAAA
ATGTACAATA GACATTAAGA GACTTAAACA GATATATAAT CATTTTAAAT TAAAAAGCG
TTAAACAGTA CCTCAAGCTC AATAAGCATT TTAAGTATTC TAATCTTAGT ATTTCTCTAG
CTGACATGTA AGAAGCAATC TATCTTATTG TATGCAATTA GCTCATTGTG TGGATAAAAA
GGTAAACCA TTCTGAAACA GGAAACCAAT ACACTTCCTG TTTAATCAAC AAATCTAAAC
ATTTATTCTT TTCATCTGTT TACTCTTGCT CTTGTCCACC ACAATATGCT ATTCACATGT
TCAGTGTAGT TTTA
[G/T]
          GACAA AGAAAAATTTT CTGAGTTACT TTTGTATCC CACCCCCTTA
AAGAAAGGAG GAAAAACTGT TTCATACAGA AGGCGTTAAT TGCATGAATT AGAGCTATCA
CCTAAGTGTG GGCTAATGTA ACAAAGAGGG ATTTACACCTA CATCCATTCA GTCAGTCTTT
GGGGGTTTAA AGAAATTCCA AAGAGTCATC AGAAGAGGAA AAATGAAGGT AATGTTTTTTT
CAGACAGGTA AAGTCTTTGA AAATATGTGT AATATGTAAA ACATTTTGAC ACCCCCATAA
TATTTTTCCA GAATTAACAG TATAAATTGC ATCTCTTGT CAAGAGTTCC CTATCACTCT
CTTTAATCAC TACTCACAGT AACCTCAACT CCTGCCACAA TGTACAGGAT GCAACTCCTG
```

Abbildung 2.3: Sequenzdatei für den IL-2-SNP an Position -330. Schwarze Markierung: Positionen der Primer. Graue Markierung: Position der Sonde. Der SNP ist hier fett dargestellt.

Die Gentyisierung mit dem TaqMan erfolgt mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen.

Im ersten Schritt wird eine Sequenz durch das für sie spezifische Primerpaar amplifiziert, welches den Polymorphismus einschließt. Zwei Sonden, die dem Reaktionsgemisch beigefügt und mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, binden auf dem Polymorphismus. Entweder als Wildtypsonde oder als mutierte Sonde. Bei heterozygoten Personen binden beide Sondenformen.

Wird die Sonde durch die DNA Polymerase während der Reaktion zerstört, wird der Fluoreszenzfarbstoff der entsprechenden Sonde freigesetzt und kann gemessen werden. Die Zerstörung der Sonde und somit die Fluoreszenzfreisetzung kann also nur erfolgen, wenn die Sonde und die

Sequenz übereinstimmen. Je nach dem welcher der zwei Fluoreszenzfarbstoffe freigesetzt wird, kann im Umkehrschluss auf die Existenz des homozygoten Wildtyps, der homozygoten Mutation oder auf einen heterozygoten Polymorphismus geschlossen werden (Siehe Abbildung 2.4).

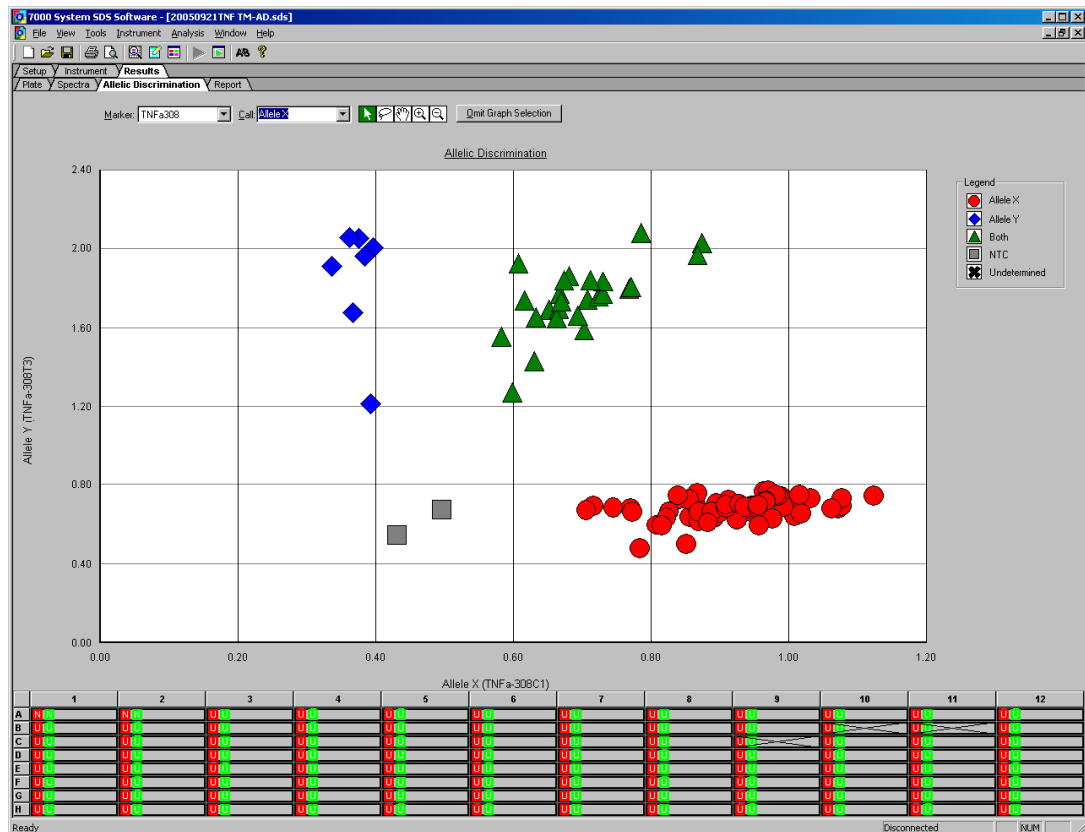


Abbildung 2.4: Screenshot eines Fluoreszenzmusters einer Typisierung mit dem TaqMan.

Die Lokalisation der untersuchten Single-Nucleotid-Polymorphismen

Der untersuchte SNP für TNF- α an Position -308 liegt auf dem Chromosomenteil 6p21.3. Die Basenvariation an dieser Stelle ist Guanin/Adenin. Die Nummer des SNP ist RS 1800629.

Der untersuchte SNP für IL-2 an Position -330 liegt auf dem Chromosomenteil 4q26-q27. Die Basenvariation an dieser Stelle ist Guanin/Thymin. Die Nummer des SNP ist RS 2069762.

Der Reaktionsansatz

Der Reaktionsansatz beinhaltete pro Probe 7,5 µl MasterMixPuffer, bestehend aus Puffer, dNTPs und AmpliTaq Gold® Polymerase, 0,25 µl Test-Kit (Sonden und Primer), 5,25 µl Aqua dest. und 2 µl DNA. Die Sequenzen der Primer und Sonden befinden sich in Tabelle 2.2.

Polymorphismus		Sequenz 5' – 3'	
IL-2-330	Primer	Forward	GCTCTTGTCCACCACAATATGCTAT
		Reverse	GCCTTCTGTATGAAACAGTTTTTCCT
	Sonde	Wildtyp	VIC-ATTTTCTTTGTCATAAACT
		Mutation	FAM-TTTCTTTGTCCTAAACT
TNF-α-308	Primer	Forward	GTAGGACCCTGGAGGCTGAAC
		Reverse	GAAATGGAGGCAATAGGTTTTGAG
	Sonde	Wildtyp	VIC-CCGTCCCCATGCC
		Mutation	FAM-CCGTCCTCATGCC

Tabelle 2.2: Primer und Sonden für die Typisierung der Polymorphismen IL-2 und TNF-α.

Das PCR Programm

Das PCR Programm wurde mit folgenden Schritten, Zyklusanzahl, Temperatur und Zeitdauer durchgeführt:

Step 1:	1 Zyklus	50°C für 2 min
		95°C für 10 min
Step 2:	40 Zyklen	95°C für 15 sec
		60°C für 1 min

Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei 60°C.

2.3 Statistik

Die deskriptive Darstellung der IL-2- und TNF- α -Freisetzung erfolgte durch das arithmetische Mittel und die Standardabweichung. Entsprechend der Höhe aus hoher, mittlerer und geringer Zytokinantwort wurden auch die Terzilen dargestellt. Die Daten wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft.

Vergleiche der IL-2- und der TNF- α -Freisetzung zwischen der auf 2000 μ M Glutamin-supplementierten Gruppe und jener bei 250 μ M Glutamin wurden mit einer Varianzanalyse und dem Scheffé-Test als Anschlussstest durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt. Die Verteilung der Genotypen und die Beziehung des Genotyps mit den Terzilen der IL-2- und der TNF- α -Freisetzung wurden mit Chi²-Tests überprüft. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS für Windows Version 11.0.1. im Statistikbüro MoreData, Gießen.

3. Ergebnisse

3.1 Die Probandencharakteristika

Die Blutproben stammen aus einem Normalkollektiv von insgesamt 91 Probanden. Es wurde darauf geachtet, dass die Geschlechtsverteilung der Probandenproben übereinstimmt. Die Probandencharakteristika sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

	Probanden n=91
Patientenalter (Jahre)	32,1 ± 12,0
Geschlecht	
männlich	48
weiblich	43
Body mass Index (kg/m ²)	23,8 ± 3,4
Leukozyten (Giga/l)	6,9 ± 1,9
Lymphozyten (%)	32,6 ± 6,9
Lymphozyten (Giga/l)	1,7 ± 1,0
Monozyten (%)	4,5 ± 2,4
Monozyten (Giga/l)	0,3 ± 0,2
Granulozyten (%)	48,6 ± 25,8
Granulozyten (Giga/l)	4,4 ± 1,7

Tabelle 3.1: Probandencharakteristika.

3.2 Der Einfluss von Glutamin auf die IL-2 Freisetzung im Vollblut von Probanden in Verbindung zu dem IL-2 Genotypen

3.2.1 IL-2 Freisetzung nach Stimulation mit PMA und Ionomycin in Verbindung zur Glutaminsupplementierung

Die IL-2 Freisetzung in Abhängigkeit von der Glutamin Supplementierung ist in Tabelle 3.2 dargestellt. Entsprechend der Höhe aus niedriger, mittlerer und hoher Zytokinantwort wurde die IL-2 Freisetzung in Terzilen eingeteilt. Insgesamt war die Spannweite der IL-2 Freisetzung der Probanden im Vollblut sehr groß. Aus den gesammelten Daten der gesamten Studienpopulation (n=91) konnte daher kein signifikanter Einfluss von Glutamin auf die IL-2 Freisetzung festgestellt werden.

Analysiert man die unterschiedlichen Terzilen jedoch einzeln, fällt auf, dass in der Terzile 1 (niedrige Zytokinantwort) die Zytokinantwort bei Glutaminsupplementierung im Durchschnitt um 47% steigt.

In der Terzile 2 (mittlere Zytokinantwort) bewirkt die Supplementierung von Glutamin im Durchschnitt einen Anstieg der IL-2 Freisetzung um 35%, jedoch ohne Signifikanz (p=0,918).

In der Terzile 3 (hohe Zytokinantwort) sinkt die Zytokinantwort unter Glutaminsupplementierung im Durchschnitt um 17%.

IL-2-Freisetzung [U/ml]	250 µM Glutamin	2000 µM Glutamin	p-Wert
Alle Probanden (n=91)	65,0 ± 64,4	63,7 ± 59,7	p = 0,855
Terzilen der IL-2-Produktion			
Terzile 1 (n=30)	14,6 ± 5,5	21,4 ± 16,4	p = 0,126
Terzile 2 (n=30)	38,8 ± 11,2	52,3 ± 48,6	p = 0,918
Terzile 3 (n=31)	139,2 ± 57,9	115,7 ± 58,2	p = 0,128

Tabelle 3.2: IL-2 Freisetzung mit und ohne Glutaminsupplementierung im Vollblut nach Stimulation mit PMA und Ionomycin.

3.2.2 Der Einfluss des Interleukin-2 -330 T/G Polymorphismus

3.2.2.1 Verteilung der Genotypen innerhalb der Studienpopulation und ihr Einfluss auf die IL-2 Freisetzung

Die Verteilung der T/T, T/G und G/G Genotypen in der Studienpopulation ist in Tabelle 3.3 dargestellt. Der T/T Genotyp konnte bei 47% der Probanden nachgewiesen werden, der G/T Genotyp bei 46% und der G/G Genotyp bei 7%. Der Interleukin-2 -330 T/G Polymorphismus hat keinen Einfluss auf die IL-2 Freisetzung wie Tabelle 3.3 zeigt.

IL-2 -330-Genotyp	TT	GT	GG
Alle Probanden (n=91)	43 (47%)	42 (46%)	6 (7%)
Terzilen der IL-2 Produktion			
Terzile 1 (n=30)	12	16	2
Terzile 2 (n=30)	15	15	0
Terzile 3 (n=31)	16	11	4

Tabelle 3.3: Verteilung von IL-2 Genotypen in der Studienpopulation in Relation zur IL-2 Freisetzung im Vollblut nach Stimulation mit PMA und Ionomycin **ohne** Glutaminsupplementierung.

3.2.2.2 Einfluss der IL-2 Genotypen auf die IL-2 Freisetzung unter Glutamin

Die IL-2 Freisetzung im Vollblut nach Stimulation mit PMA und Ionomycin in Relation zu den IL-2 Genotypen mit und ohne Glutaminsupplementierung zeigt Tabelle 3.4.

In der ersten Terzile steigerte die Glutaminsupplementierung die IL-2 Freisetzung. Der Anstieg der IL-2 Freisetzung konnte bei den Probanden in dieser Terzile nicht auf eine klare Verteilung der Genotypen zurückgeführt werden.

Ähnlich verhält sich auch die Statistik der zweiten Terzile. Die Zugabe von Glutamin steigerte hier zwar auch die Zytokinantwort im Vergleich zur IL-2 Freisetzung ohne Glutaminsupplementierung, jedoch scheint auch bei den Probanden in dieser Terzile der Genotyp nicht die Sensitivität der Zytokinantwort auf Glutamin zu verbessern.

Unter der Analyse der dritten Terzile fällt auf, dass die Glutaminzugabe die Zytokinfreisetzung im Durchschnitt senkt und das auch hier der Genotyp keinen Einfluss auf die IL-2 Freisetzung weder mit noch ohne Glutaminsupplementierung hat.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Interaktion des Genotyps auf die IL-2 Freisetzung im Gesamten nicht signifikant ist. Zudem zeigte sich insgesamt kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Interaktion der IL-2 Genotypen und der IL-2 Freisetzung unter dem Einfluss von Glutamin. Ein stimulierender Effekt von Glutamin auf die IL-2 Freisetzung in der ersten und zweiten Terzile war unabhängig vom Genotyp erkennbar.

Beziehung zwischen **IL-2 Genotyp** und den **Terzilen der IL-2 Freisetzung** [U/ml]

	TT (n=43)	GT (n= 42)	GG (n= 6)	p-Wert
Terzile 1				
250 µM Glutamin	15,0 ± 3,9	13,9 ± 6,3	14,3 ± 1,3	p = 0,862
2000 µM Glutamin	27,9 ± 33,3	24,6 ± 33,7	25,1 ± 4,5	p = 0,965
Terzile 2				
250 µM Glutamin	37,7 ± 11,0	42,6 ± 12,4	—	p = 0,262
2000 µM Glutamin	51,3 ± 47,5	54,4 ± 51,3		p = 0,865
Terzile 3				
250 µM Glutamin	143,1 ± 64,8	141,4 ± 51,1	137,0 ± 52,7	p = 0,942
2000 µM Glutamin	115,2 ± 64,8	121,9 ± 53,0	121,6 ± 47,8	p = 779

Tabelle 3.4: IL-2 Freisetzung im Vollblut nach Stimulation mit PMA und Ionomycin in Relation zu IL-2 Genotypen ohne Glutaminsupplementierung und die Veränderung nach Glutamingabe.

3.3 Schlussfolgerung – IL-2 in Bezug auf die Zielsetzung der Studie

1. Hat Glutamin bei stimulierten Lymphozyten, die in ihrem physiologischen Medium Blut verbleiben, eine steigernde Wirkung auf die IL-2 Freisetzung bei einer Konzentration von 2000 μM im Vergleich zu einer Konzentration, die sich unter der physiologischen Norm bei 250 μM bewegt?

Glutamin hat keinen signifikanten Einfluss auf die IL-2 Freisetzung. In den Terzilen mit niedriger und mittlerer Zytokinantwort scheint unter dem Einfluss von Glutamin ein diskreter Effekt auf die IL-2 Freisetzung erkennbar zu sein, dieser hat jedoch keine Signifikanz.

2. Hat der Single-Nucleotid-Polymorphismus (SNP) IL-2 -330 (T/G) einen Einfluss auf die IL-2 Freisetzung ohne oder mit Glutaminsupplementierung?

Der IL-2 Genotyp hat in unserer Untersuchung, unabhängig von der Höhe der Glutaminkonzentration im Vollblut, keinen Einfluss auf die Höhe der IL-2 Freisetzung.

3.4 Der Einfluss von Glutamin auf die TNF- α Freisetzung im Vollblut von Probanden in Verbindung zu dem TNF- α Genotypen

Die Blutproben für die TNF- α Studie stammen aus dem gleichen Probandenkollektiv wie die der IL-2 Studie (siehe Kapitel 3.1). Aus technischen Gründen konnte die TNF- α Studie jedoch nur an 87 von insgesamt 91 Probandenblutproben beendet werden.

3.4.1 TNF- α Freisetzung nach Stimulation mit PMA und Ionomycin in Verbindung zur Glutaminsupplementierung

Die TNF- α Freisetzung in Abhängigkeit von der Glutamin Supplementierung ist in Tabelle 3.5 dargestellt. Entsprechend der Höhe aus niedriger, mittlerer und hoher Zytokinantwort wurde die TNF- α Freisetzung auch hier in Terzilen eingeteilt.

Bei der Analyse der einzelnen Terzilen zeigt sich, dass eine Glutaminzugabe ins Vollblut die TNF- α Freisetzung im Durchschnitt in der ersten Terzile um 23% steigert und in der zweiten und dritten Terzile um 9% und 11% senkt. Die Schwankungen der TNF- α Freisetzung sind in allen Terzilen so groß, dass kein klarer Zusammenhang zwischen der Höhe der Glutaminkonzentration und der Höhe der TNF- α Zytokinantwort eruiert werden kann.

TNF- α -Freisetzung [pg/ml]	250 μ M Glutamin	2000 μ M Glutamin	p-Wert
Alle Probanden (n=87)	4415 \pm 2624	4145 \pm 2538	p = 0,491
Terzilen der TNF- α -Produktion			
Terzile 1 (n=29)	1916 \pm 752	2352 \pm 1716	p = 0,215
Terzile 2 (n=29)	3714 \pm 655	3384 \pm 979	p = 0,138
Terzile 3 (n=29)	7615 \pm 1606	6799 \pm 2117	p = 0,104

Tabelle 3.5: TNF- α Freisetzung mit und ohne Glutaminsupplementierung im Vollblut nach Stimulation mit PMA und Ionomycin.

Die Glutaminsupplementierung bewirkt bezüglich des gesamten Probandenkollektivs (n=87) im Durchschnitt eine Senkung der TNF- α Freisetzung um 6%. Es kann kein signifikanter Einfluss von Glutamin auf die TNF- α Freisetzung festgestellt werden (p=0,491).

3.4.2 Der Einfluss des TNF- α -308 A/G Polymorphismus

3.4.2.1 Verteilung der Genotypen innerhalb der Studienpopulation und ihr Einfluss auf die TNF- α Freisetzung

Die Verteilung der G/G, G/A und A/A Genotypen in der Studienpopulation ist in Tabelle 3.6 dargestellt. Bei 66% der Probanden aus dem Kollektiv fand sich der G/G Genotyp. Der G/A Genotyp wurde bei 28% und der A/A Genotyp wurde bei 6% der Probanden nachgewiesen. Wie Tabelle 3.6 zeigt, ist die Verteilung der Probanden auf die unterschiedlichen Terzilen mit niedriger, mittlerer und hoher TNF- α Produktion innerhalb der Gruppen der drei unterschiedlichen Polymorphismen sehr ausgewogen. Dies spricht zunächst dafür, dass der TNF- α -308 Polymorphismus keinen Einfluss auf die Höhe der TNF- α Produktion hat. Unter Berücksichtigung der tatsächlich freigesetzten TNF- α Konzentrationen (Siehe nachfolgendes Kapitel 3.4.2.2)

TNF- α -308-Genotyp	GG	GA	AA
Alle Probanden (n=87)	58 (66%)	24 (28%)	5 (6%)
Terzilen der TNF- α Produktion			
Terzile 1 (n=29)	18	9	2
Terzile 2 (n=29)	22	7	0
Terzile 3 (n=29)	18	8	3

Tabelle 3.6: Verteilung von TNF- α Genotypen in der Studienpopulation in Relation zur TNF- α Freisetzung im Vollblut nach Stimulation mit PMA und Ionomycin **ohne** Glutaminsupplementierung.

muss man diese Vermutung jedoch revidieren. Es wird erkennbar, dass der TNF- α Polymorphismus einen diskreten Einfluss auf die TNF- α Freisetzung haben könnte.

3.4.2.2 Einfluss der TNF- α Genotypen auf die TNF- α Freisetzung unter Glutamin

Die TNF- α Freisetzung im Vollblut nach Stimulation mit PMA und Ionomycin in Relation zu den TNF- α Genotypen mit und ohne Glutaminsupplementierung ist in Tabelle 3.7 dargestellt.

In der Terzile 1 hat Glutamin auf die TNF- α Freisetzung der Probanden mit dem G/G und dem G/A Polymorphismus, also bei 94% des Kollektivs, einen steigernden Effekt. In der Gruppe der Probanden mit dem A/A Polymorphismus senkt Glutamin im Durchschnitt die TNF- α Freisetzung.

In den Terzilen 2 und 3 senkt Glutamin unabhängig vom Genotypen bei den Probanden die TNF- α Freisetzung, allerdings mit nicht aussagefähiger Streuung der freigesetzten TNF- α Konzentrationen.

Aufgrund der breiten Streuung der TNF- α Konzentrationen kann kein

Beziehung zwischen TNF-α-Genotyp und den Terzilen der TNF-α Freisetzung [pg/ml]				
	GG (n=58)	GA (n= 24)	AA (n= 5)	p-Wert
Terzile 1				
250 μ M Glutamin	1930 \pm 814	1966 \pm 691	1546 \pm 787	p = 0,541
2000 μ M Glutamin	2017 \pm 1023	2303 \pm 2408	949 \pm 657	p = 0,199
Terzile 2				
250 μ M Glutamin	3560 \pm 592	4017 \pm 676	—	p = 0,121
2000 μ M Glutamin	3105 \pm 871	3754 \pm 1150	—	p = 0,178
Terzile 3				
250 μ M Glutamin	7413 \pm 1515	8395 \pm 1654	6421 \pm 1260	p = 0,159
2000 μ M Glutamin	6757 \pm 2059	7383 \pm 2408	5284 \pm 827	p = 0,120

Tabelle 3.7: TNF- α Freisetzung im Vollblut nach Stimulation mit PMA und Ionomycin in Relation zu TNF- α Genotypen ohne Glutaminsupplementierung und die Veränderung nach Glutamingabe.

eindeutiger Zusammenhang der Glutaminkonzentration oder des entsprechenden Genotypen des TNF- α -308 Polymorphismus mit der Höhe der TNF- α Freisetzung eruiert werden. Die Ergebnisse sind nicht signifikant. Tendenziell ist die TNF- α Freisetzung aber unabhängig von der Terzile bei den Probanden mit dem G Allel (G/G oder G/A) durchschnittlich am höchsten. Die Probandengruppe mit dem A/A Genotypen hat durchschnittlich und unabhängig von der Terzile, die geringste TNF- α Freisetzung.

3.5 Schlussfolgerung – TNF- α in Bezug auf die Zielsetzung der Studie

1. Hat Glutamin bei stimulierten Lymphozyten, die in ihrem physiologischen Medium Blut verbleiben, eine steigernde Wirkung auf die TNF- α Freisetzung bei einer Konzentration von 2000 μ M im Vergleich zu einer Konzentration, die sich unter der physiologischen Norm bei 250 μ M bewegt?

Glutamin hat keinen signifikanten Einfluss auf die TNF- α Freisetzung. In den Terzilen mit mittlerer und hoher Zytokinantwort ist unter dem Einfluss von Glutamin ein tendenziell senkender Effekt auf die TNF- α Freisetzung ohne Signifikanz erkennbar.

2. Hat der Single-Nucleotid-Polymorphismus (SNP) TNF- α -308 (A/G) einen Einfluss auf die TNF- α Freisetzung ohne oder mit Glutaminsupplementierung?

Tendenziell zeigt sich, dass der TNF- α Polymorphismus, unabhängig von der Höhe der Glutaminkonzentration im Vollblut, einen diskreten Einfluss auf die Höhe der TNF- α Freisetzung haben könnte. Über allen Terzilen scheint die Höhe der TNF- α Konzentration bei Probanden mit mindestens einem G Allel durchschnittlich höher zu sein als bei Probanden mit dem A/A Genotyp. Diese Aussage ist jedoch durch kein signifikantes Ergebnis gestützt.

4. Diskussion

4.1 Der Einfluss von Glutamin auf die IL-2 und die TNF- α Freisetzung nach in-vitro Stimulation

Die Ernährung von Patienten nach schweren Traumata oder mit Sepsis stellt in der Intensivmedizin eine große Herausforderung dar. Bei diesen Patienten sind diese Krankheitsbilder mit verschiedenen endokrinen und metabolischen Veränderungen verbunden. In den letzten Jahren wurden dank der erweiterten immunologischen Untersuchungstechniken und der verbesserten ernährungstechnischen Möglichkeiten neue Behandlungsstrategien in der Ernährungstherapie entwickelt. Durch den Einfluss verschiedener Nährstoffe, unter anderem auf die zelluläre Abwehrfunktion oder auf die unspezifische Immunantwort, orientieren sich diese Strategien nicht mehr allein an der kalorischen Wertigkeit der zugeführten Stoffe, sondern vor allem an den pharmakologischen Eigenschaften. Die zugeführten Nährstoffe werden im Rahmen der Ernährungstherapien deshalb als „Pharmakonutrients“ und die gesamte Ernährungstherapie, wenn sie das Immunsystem betrifft, als „Immunonutrition“ bezeichnet. Die Supplementierung von Schlüsselnährstoffen hat immunmodulatorische Eigenschaften. Hierzu gehören vor allem Arginin, Omega-3 Fettsäuren und Glutamin. Eine Analyse der Prinzipien der evidence-based medicine unterstützt die Hypothese, dass der prä- oder perioperative Gebrauch von Immunnutrients in bestimmten Situationen Infektionsraten signifikant reduziert und Gesundheitsressourcen sichern kann (136). Wie bei allen Pharmaka sollte auch für derartig modifizierte Nährlösungen eine klare Indikation gestellt werden um Patienten, bei denen Kontraindikationen bestehen nicht zu gefährden, und um möglichst ökonomisch zu therapieren.

Eine besonders hohe klinische Relevanz in Bezug auf die Modulation von Immunantworten hat Glutamin (29). In den letzten Jahren ist Glutamin, die quantitativ größte freie Aminosäure im Körper, zu einer der am intensivsten untersuchten Nährstoffe im Rahmen der Ernährungsmedizin geworden (11). Glutamin kann synthetisiert werden und wird deshalb als bedingt essentielle Aminosäure betrachtet (12, 14, 137). Da die meisten natürlich vorkommenden Proteine 4-8% ihrer Aminosäuren als Glutamin enthalten, werden täglich etwa 10 g Glutamin von jeder Person konsumiert. Diese Angabe unterstreicht die nötige Supplementierung von Glutamin im Rahmen der Immunnutrition bei Patienten, die nicht in der Lage sind, Nahrung enteral aufzunehmen.

Ehrensverd et al. (26) und *Eagle et al.* (138) berichteten 1949 und 1956 als erste über die Wichtigkeit von Glutamin für das Überleben von Zellen und für ihre Proliferation. Sie zeigten, dass Glutamin in 10-100facher Menge im Vergleich zu jeder anderen Aminosäure in einer Zellkultur vorhanden sein muss und auch nicht durch Glutamat oder Glukose ersetzt werden kann.

Die plasmatische Glutaminkonzentration übersteigt bis auf die Konzentrationen von Alanin und Valin alle anderen Aminosäuren um das Vier- bis Fünffache (139). Durch seine zwei Stickstoffgruppen ist Glutamin eine der wichtigsten Verbindungen für den Stickstofftransport im Körper.

In den 80er Jahren wurden viele Untersuchungen angestellt, um herauszufinden wie Glutamin auf die physiologische und biochemische Homöostase im Körper wirkt. Die Hauptgründe für die Untersuchungen in dieser Zeit waren, dass Glutamin als essentielle Aminosäure erwogen wurde, und dass die analytischen Meßmethoden bis zu den späten 70er Jahren nicht ausreichend entwickelt waren. Erst mit der Entwicklung von Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie und Fluoreszenzmessungen konnten genauere Messungen bezüglich des Glutamins angestellt werden.

Während katabolem Stress sinkt die Glutaminkonzentration im Skelettmuskel rapide, so zum Beispiel bei Verletzungen, Sepsis oder bei Operationen (140).

Muhlbacher et al. simulierten 1984 Stresssituationen durch die Gabe von Dexamethason. Die Plasma-Glutaminkonzentration sank um 26% bei einer Dexamethason Gabe von 0,44 mg pro kg Körpergewicht pro Tag. Man stellte fest, dass der Abfall der intrazellulären Glutaminkonzentrationen im Skelettmuskel durch einen Anstieg der Freisetzung von Glutamin um das Drei- bis Vierfache aus dem Muskel ausgelöst wird (141). Durch eine erhöhte Glutaminaufnahme des Intestinaltrakts, der Leber, der Nieren und der Zellen des Immunsystems sinkt die Plasma-Glutaminkonzentration trotz gesteigerter Glutaminfreisetzung aus dem Skelettmuskel und gesteigerter de novo Glutaminsynthese im Stressintervall ab (16, 142). Diese Balance zwischen Glutaminproduktion und Glutaminaufnahme durch andere Gewebe wird durch den Plasma-Glutaminspiegel repräsentiert. In der frühen metabolischen Stressphase überwiegt noch die Glutaminproduktion, so dass der Plasma-Glutaminspiegel steigt. Später steigt die Glutaminaufnahme in den Geweben so stark an, dass die Glutaminproduktion diese Aufnahme nicht mehr kompensieren kann und die Plasmakonzentrationen unter die der Norm absinken. Parallel fallen auch die Glutaminspiegel im Skelettmuskel ab. Die Muskelproteinstruktur wird geringer und die Muskulatur atrophiert (143). Sinkt der Glutaminbedarf der Gewebe wieder ab, steigt die Glutaminkonzentration innerhalb des Aminosäure-Pools wieder an. Das Muskelprotein wird wieder hergestellt (144). Die Zugabe von Glutamin im Rahmen der Immunnutrition während eines katabolen Stoffwechsels schont die freien Glutaminspiegel im Muskel, wirkt einem Abfall der Muskelproteinsynthese entgegen und verbessert die Stickstoffbilanz (145). In den 90er Jahren belegten viele Studien, dass der Glutaminmetabolismus für die Lymphozytenfunktion essentiell ist und somit auch für die Immunität des Körpers. In Situationen, mit gesteigertem Glutaminumsatz, wie zum Beispiel bei Gewichtsverlust, Infektionen, Trauma oder bei Verbrennungen sinkt die Plasma-Glutaminkonzentration ab und das Immunsystem wird geschwächt (146). 1985 beschrieben *Newsholme et al.*, dass Lymphozyten

durch Glutaminolyse mit Vorstufen für die Makromolekülsynthese und mit Energie versorgt werden und das in Lymphozyten und lymphatischem Gewebe eine hohe Glutaminaseaktivität herrscht (32). Diese Glutaminaseaktivität steigt während einer Aktivierung des Immunsystems (147). 1983 stimulierten *Ardawi et al.* isolierte Lymphozyten aus Lymphknoten von Ratten mit Concanavalin A, welches in der immunologischen Forschung als Mitogen eingesetzt wird. Es stimuliert T-Lymphozyten und auch B-Lymphozyten zur Proliferation. Der Glutaminverbrauch stieg um 51% während Concanavalin A bei fehlendem Glutamin im Kulturmedium keine Steigerung der Syntheseleistung der Lymphozyten erzielte (30).

Auch klinische Studien konnten zeigen, dass die Glutaminzugabe im Rahmen der Immunnutrition die Mortalität von bestimmten Patientengruppen senkt. 1992 verglichen *Ziegler et al.* in einer doppel-blinden randomisierten, kontrollierten klinischen Studie zwei Patientenkollektive mit und ohne Glutaminsupplementierung nach Knochenmarktransplantation. Das Kollektiv mit Glutamingabe zeigte eine bessere Stickstoffbilanz, niedrigere Infektionsinzidenz und verkürzte Hospitalisierung (148). Die Ergebnisse dieser Studie decken sich mit vielen Ergebnissen anderer Studien der letzten 15 Jahre in Bezug auf die Glutaminsupplementierung bei schweren Infektionen, operativem Stress und Krebserkrankungen, die alle einen Benefit hinsichtlich Mortalität, Dauer der Hospitalisierung und Infektionsmorbidity zeigten (149). Damit diese Effekte verstanden werden, haben *in vitro* Studien geholfen wichtige Mechanismen der Glutaminwirkung auf das Immunsystem zu erläutern (150-152).

Lymphozyten, Makrophagen und Granulozyten spielen bei der zellulären Immunabwehr eine wichtige Rolle. In den letzten Jahrzehnten wurden große Fortschritte bezüglich des Verständnisses dieser Zellen und des Prozesses der chemischen Kommunikation gemacht. Da dieses System eine sehr wichtige Bedeutung bei der Eingrenzung von Infektionen und bei allgemeinen Erholungsprozessen nach Krankheit oder Trauma hat, ist ihm in den letzten

Jahren immer mehr Aufmerksamkeit zugekommen. Von fundamentaler Bedeutung für die Immunmodulation sind die Zytokine. Nach Stimulation unterschiedlicher Zelltypen werden sie freigesetzt und wirken dann auf zahlreiche Zellen des Immunsystems.

IL-2 wird vornehmlich von T-Lymphozyten produziert, wodurch sich die Lymphozyten selbst stimulieren (autokrine Wirkung) und zur Proliferation und Differenzierung angeregt werden (49-51). Im Rahmen der Lymphozytenaktivierung wirkt IL-2 zudem stimulierend auf benachbarte T-Lymphozyten (parakrine Wirkung) (47). IL-2 fördert außerdem das B-Zellen Wachstum was unter anderem die Steigerung der Antikörperproduktion erhöht (52-54). Weiterhin moduliert IL-2 neutrophile Granulozyten in ihrer Funktion und bewirkt funktionelle Veränderungen an Monozyten, was die Freisetzung weiterer Zytokine zur Folge hat. Aus diesem Grund ist IL-2 ein zentrales, aktivierendes Regulatormolekül innerhalb des Immunsystems (55, 56). Im Rahmen von Autoimmunerkrankungen ist IL-2 ein wichtiger Mediator für den Fas vermittelten Zelltod (48).

TNF- α gehört zur Gruppe der proinflammatorischen Zytokine und wird nach Infektionen und Verletzungen schnell freigesetzt (87, 88). TNF- α wird überwiegend von Makrophagen und Monozyten synthetisiert (153). Die Wirkung von TNF- α induziert für Pathogene eine feindliche Umgebung und verstärkt und modifiziert das Immunsystem. Seine Wirkung ist sehr eng an seine zirkulierende Konzentration geknüpft, wodurch es schnell zu überschießenden Immunreaktionen kommen kann. TNF- α spielt deshalb auch im Rahmen von Autoimmunerkrankungen eine zentrale Rolle (87, 93).

Die Plasmaglutaminkonzentration von gesunden erwachsenen Menschen liegt bei 600 μM (13). Es wird angenommen, dass optimale Lymphozytenfunktionen in *in vitro* Studien bei physiologischen Glutaminkonzentrationen von 500-600 μM erreicht werden (23). Studien

haben gezeigt, dass in vitro die Proliferation von T-Zellen nach Stimulation bei Ratten (30, 154), Mäusen (155, 156) und bei Menschen (23) mit den Mitogenen Concanavalin A oder Phytohämagglutinin von der Glutaminkonzentration abhängig ist.

Zwei Studien von *Yaqoob et Calder* 1998 (37) und von *Rohde et al.* 1996 (11) demonstrierten, dass die Zytokinproduktion eindeutig von der Höhe der Glutaminkonzentration abhängig ist, sie kommen allerdings teilweise zu unterschiedlichen Ergebnissen. *Yaqoob et Calder* stimulierten isolierte menschliche Lymphozyten bei unterschiedlichen Glutaminkonzentrationen (0, 0.1, 0.4, 0.6 und 2 mM) mit Concanavalin A oder bakteriellen Lipopolysacchariden. 24 Stunden später wurden die Konzentrationen der T-Lymphozyten und die der produzierten Zytokine im Kulturmedium gemessen. Die maximale IL-2 Produktion wurde bei einer Glutamin Konzentration von 100 μ M erreicht und stieg bei den Kulturmedien mit den höheren Glutaminkonzentrationen nicht weiter an. Im Vergleich zum glutaminfreien Ansatz stieg die Freisetzung um 100%. Die TNF- α Freisetzung zeigte die gleiche Dynamik, mit einer Steigerung von 24-35%, auch wieder bei einer Glutaminkonzentration von 100 μ M und stieg bei Konzentrationen über 100 μ M auch nicht weiter an. In der Studie von *Rohde et al.* hatte Glutamin nur einen sehr geringen Effekt auf die TNF- α Synthese, steigerte aber die IL-2 Produktion beträchtlich. Nach einer Stimulation von isolierten, peripheren, mononukleären Zellen mit Phytohämagglutinin und bakteriellen Lipopolysacchariden kam es im Vergleich zu einem Kontrollansatz mit isotoner NaCl Lösung bei Glutaminkonzentrationen von 300 μ M und 600 μ M zu einem signifikanten Anstieg der IL-2 Produktion. Versuche mit Glutamat, Leucin, Isoleucin und Valin, welche alle Substrate für die Glutaminsynthese darstellen zeigten keine Steigerung der Zytokinsynthese. Die TNF- α Freisetzung stieg in den Ansätzen mit 300 μ M und 600 μ M Glutamin leicht an.

In einer Studie von *Chang et al.* aus dem Jahre 1999 zeigten die Autoren, dass der maximale Effekt der Lymphozytenproliferation nach Stimulation mit

Phytohämagglutinin bei einer Glutaminkonzentration von 600 μM erreicht wird. Die Proliferationsrate war dreimal höher als bei den Ansätzen ohne Glutamin. Bei den Messungen der IL-2 Konzentrationen in den stimulierten Ansätzen wurden im Vergleich zu einer Kontrolle mit 0 μM Glutamin signifikante, dosisabhängige Steigerungen der IL-2 Synthese in den Ansätzen mit 200 μM , 600 μM und 2000 μM Glutamin festgestellt (157).

Vor Beginn der Bestimmung der Konzentrationen von IL-2 und TNF- α wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit die Probandenproben auf zwei unterschiedliche Glutaminkonzentrationen eingestellt. Im ersten Schritt wurde das Vollblut 1:1 mit Glutamin freiem RPMI 1640 verdünnt. Dann wurden die Proben mit L-Alanyl-L-Glutamin jeweils auf die Konzentration von 2000 μM und von 250 μM eingestellt. Die in-vitro Aktivierung der Proben erfolgte durch 10 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und 1 $\mu\text{g/ml}$ Ionomycin. PMA und Ionomycin stimulieren vorwiegend die Lymphozyten. Beide Stoffe setzen die intrazelluläre, Signal induzierte Kaskade frei und fördern somit die Produktion von Zytokinen. Die Stimulation erfolgte im Inkubator bei 37°C über 8 Stunden. Im Anschluss wurde der Ansatz 5 min lang bei 500g zentrifugiert. Der Überstand der Proben wurde entnommen. Anschließend wurden die Spiegel von IL-2 und TNF- α bestimmt. Die Konzentration von 250 μM wurde gewählt, da sie der Hälfte der unter anderem von *Parry-Billings* beschriebenen unteren optimalen Konzentration von 500 μM bis 600 μM für die in vitro Lymphozytenaktivierung entspricht (23). Die Konzentration von 2000 μM in unserer Studie resultiert aus der Tatsache, dass diese Konzentration in den meisten Zellkulturmedien enthalten ist, und dass die Ergebnisse im Rahmen dieser Konzentration gut mit anderen Studien vergleichbar sind. Mit der Glutaminkonzentration von 2000 μM wird im Prinzip eine *in vitro* Immunnutrition der Zellkultur erreicht.

	250 μ M Glutamin	2000 μ M Glutamin		
IL-2	65,0 \pm 64,4 [U/ml]	63,7 \pm 59,7 [U/ml]	p = 0,855	n=91
TNF-α	4415 \pm 2624 [pg/ml]	4145 \pm 2538 [pg/ml]	p = 0,491	n=87

Tabelle 4.1: IL-2 und TNF- α Konzentrationen nach achtstündiger Stimulation mit PMA und Ionomycin.

In unserer Studie zeigt sich, wie in Tabelle 4.1 dargestellt, im Vergleich von 250 μ M gegen 2000 μ M Glutamin kein Unterschied hinsichtlich der IL-2 und TNF- α Freisetzung. Diese Ergebnisse decken sich mit den oben bereits vorgestellten Studien von *Yaqoob et Calder* (37) und *Rohde et al.* (11). In der Studie von *Yaqoob et Calder* werden maximale Werte der IL-2 und der TNF- α Freisetzung bereits ab einer Glutaminkonzentration von 100 μ M erreicht, welche darüber hinaus auch nicht weiter ansteigen. Dieser Schwellenwert wird von unserer Studie nicht erfasst. Man kann aber davon ausgehen, dass die Zytokinproduktion bei Glutaminkonzentrationen, die nur noch der Hälfte der physiologischen Norm entsprechen, noch nicht beeinträchtigt zu sein scheint, so wie durch uns demonstriert. Erst ab einer Glutaminkonzentration von unter 100 μ M könnte die IL-2 und die TNF- α Freisetzung kompromittiert sein. In der Studie von *Rohde et al.*, die mit Konzentrationen von 300 μ M und 600 μ M arbeiteten, werden maximale Werte der IL-2 und TNF- α Freisetzung bereits, ähnlich wie bei uns, bei 300 μ M erreicht. Ebenfalls ohne die von *Yaqoob et Calder* angegebenen 100 μ M als Schwellenwert zu erfassen. Es wäre also interessant weitere Studiendesigns zu entwerfen, in denen weitere Abstufungen zwischen gänzlich fehlendem Glutamin und Glutaminkonzentrationen von 100 μ M im Kulturmedium vorgenommen

werden. Somit könnte man eventuell einen tatsächlichen Schwellenwert der Höhe der Glutaminkonzentration für die Zytokinsteigerung definieren. Was für den Vergleich unserer Studie mit der von *Yaqoob et Calder* und *Rhode et al.* erschwerend dazu kommt, sind die unterschiedlich verwendeten Stimulanzen und die unterschiedlich lange Inkubationszeit für die in vitro Aktivierung der Lymphozyten. *Yaqoob et Calder* verwendeten 15 µg/ml Concanavalin A und 10 µg/ml Lipopolysaccharide bei einer Inkubationsdauer von 24 Stunden. *Rhode et al.* inkubierten 24 Stunden mit 100 µg/ml Lipopolysacchariden und 20 µg/ml Phytohämagglutinin, wohin gegen wir mit 10 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und 1 µg/ml Ionomycin über 8 Stunden stimulierten.

Das Glutamin generell die Zytokinproduktion von IL-2 und TNF- α steigert, lässt sich durch unsere Studie nicht bestätigen. Herausgefunden haben wir aber, dass es im Vergleich 250µM zu 2000µM Glutamin keinen Unterschied gibt, woraus wir schlussfolgern, dass die Glutaminkonzentration wahrscheinlich sogar unter die von uns untersuchten 250 µM absinken müsste, um für die Zytokinproduktion Relevanz zu zeigen. Diese Interpretation wird durch die Ergebnisse von *Yaqoob et Calder* und *Rhode et al.* bestärkt. Die Übertragung unserer Ergebnisse auf die Klinik ist schwer. Das ein Abfall der Glutaminkonzentration klinische Relevanz besitzt und das bei einem Abfall das Immunsystem geschwächt wird, bleibt unumstritten (146). Auch, dass eine Glutaminzugabe im Rahmen der Immunnutrition die Mortalität von bestimmten Patientengruppen senkt konnte belegt werden (148, 149). Viele klinische Studien zeigten aber auch, dass die Glutaminkonzentration in Stresssituationen wie bei schweren Verbrennungen oder Sepsis zwar absinkt, die Glutaminkonzentration jedoch über 300 µM verbleibt (21-23, 158). Somit würde nach unserer Schlussfolgerung weiterhin genügend Glutamin für die IL-2 und TNF- α Synthese zur Verfügung stehen und es bleibt weiterhin ungeklärt, ob die steigenden Mortalitätsraten bei Glutaminmangel in direktem Zusammenhang mit der Zytokinproduktion stehen. Unsere

Untersuchung bezieht sich lediglich auf die peripheren mononukleären Blutzellen. Welche Auswirkung die Glutaminkonzentration auf andere lymphatische Organe und deren Auswirkungen auf das Immunsystem hat, bleibt an dieser Stelle offen.

4.2 Der Einfluss des Interleukin-2 -330 T/G und des TNF- α -308 A/G Polymorphismus auf die IL-2 und die TNF- α Freisetzung unter Glutamin

1998 beschrieben *John et al.* einen IL-2 Polymorphismus, der in der Promotorregion (-330) liegt und einen Einfluss auf die Höhe der IL-2 Freisetzung haben könnte. Dieser Single-Nucleotid-Polymorphismus (SNP) (chromosomale Lokalisation 4q26-q27) variiert zwischen den Allelen Thymin und Guanin. In der Studie wurden die IL-2-330 Allele an 79 unverwandten gesunden Kaukasoiden untersucht. Den Genotyp TT trugen 53,2%, GT 39,2% und GG 7,6% (110). Man vermutete, dass Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung der Genotypen signifikante Relevanz für die Pathogenese von Erkrankungen haben könnte. Eine ähnliche Untersuchung, durchgeführt 2000 von *Reynard et al.*, an 76 Kaukasoiden, zeigte die gleiche Häufigkeitsverteilung: TT mit 55,3%, TG mit 40,8 % und GG mit 3,9% (111). Auch unsere Studie an 91 Probanden geht mit diesen Ergebnissen konform. Der Genotyp TT ist bei uns mit 47% vertreten, GT mit 46% und der GG Genotyp mit 7% (Siehe Tabelle 4.2).

In vitro Studien haben gezeigt, dass das Guanin Allel mit einer frühen und nachhaltigen IL-2 Produktion assoziiert ist. Der Genotyp wird als so genannter „high producer“ Genotyp bezeichnet. In einer Studie von *Hoffmann et al.* aus dem Jahre 2001 beschreibt der Autor funktionelle Konsequenzen des IL-2-330 T/G Polymorphismus. Anders als in anderen Studien wurden die Zellen nicht mit Mitogenen sondern mit Mikrosphären, die mit monoklonalen Antikörpern gegen die T-Zell Rezeptoren CD3 und CD28 bestückt waren, stimuliert. Es wird beschrieben, dass bei dieser Stimulation die Zytokinsekretion vier bis zehnfach im Vergleich zur Zytokinfreisetzung nach Stimulation mit Mitogenen steigt. Unter dieser Stimulation konnte ein signifikanter Anstieg des IL-2 beim G/G Genotyp beobachtet werden (114).

2003 wollten *MacMillan et al.* herausfinden, ob dieser high producer Genotyp auch klinische Relevanz hat. Die Studie wurde an 95 Empfängern von Knochenmarktransplantaten durchgeführt. Tatsächlich stellte sich heraus, dass die Wahrscheinlichkeit einer graft versus host Reaktion (GVHD) signifikant mit der Anwesenheit mindestens eines Guanin Allels zusammenhängt. Die Wahrscheinlichkeit am Tag 100 nach Transplantation eine GVHD zu erleiden, stieg von 24% bei Patienten ohne Guanin Allel, auf 49% bei Patienten mit mindestens einem Guanin Allel an. Das Risiko einer GVHD war somit, abhängig vom Guanin Allel im IL-2-330 SNP, zweifach erhöht (116). Das Guanin Allel scheint also eine wichtige Rolle in Bezug auf eine überschießende IL-2 Produktionen zu spielen, und ausgerechnet solche sind in die Pathogenese von chronisch infektiösen Erkrankungen verwickelt (159-161).

Nach der Betrachtung dieser Fakten überrascht die Studie von *Morgun et al.* mit anderen unerwarteten Ergebnissen. Bei 63 Patienten nach Nierentransplantation war mindestens eine akute Abstoßungsreaktion innerhalb der ersten drei Monate nach Transplantation mit dem T/T Genotyp assoziiert. Die gleiche Untersuchung an 67 Patienten nach Herztransplantation zeigte gar keine Assoziation zwischen dem Genotyp und einer akuten Abstoßungsreaktion (115). Nach den vorherigen *in vitro* Ergebnissen, bei denen sich das G Allel als „high producer“ darstellt und das T Allel eher mit einer niedrigen IL-2 Synthese assoziiert ist, hätte man ein anderes Fazit erwartet. Eine mögliche Erklärung ist, dass sich der *in vivo* Einfluss, unter immunsuppressiven Bedingungen, von dem *in vitro* Einfluss der Genotypen auf die IL-2 Synthese unterscheidet.

Aufgrund der divergierenden Ergebnisse wollten auch wir wissen, ob der SNP an Position -330 einen Einfluss auf die Höhe der IL-2 Freisetzung hat und ob Glutamin als Immunnutrients die Ansprechbarkeit der Zytokinproduktion nach Stimulation verändert. Bei unserer Untersuchung fanden wir keinen Einfluss des IL-2-330 Polymorphismus auf die Reaktivität unter Glutamin. Selbst

diskrete Einflüsse im Bereich aller drei Terzilen können nicht beobachtet werden. Auch das Guanin Allel konnten wir aufgrund der geringen Fallzahl im G/G Genotyp (n=6) nicht als „high producer“ verifizieren. Der Genotyp scheint deshalb bei unseren Probanden nicht entscheidend für eine verbesserte Sensitivität der IL-2 Freisetzung unter Glutamin zu sein.

In der Studie von *Reynard et al.* interessierten sich die Autoren neben dem IL-2-330 SNP auch für die Verteilung des TNF- α -308 Polymorphismus. Das GG Allel trugen 60,5%, das GA Allel 35,5% und das AA Allel 3,9% (111). Dieser SNP (chromosomale Lokalisation 6p21.3) variiert zwischen den Allelen Guanin (TNF1 Allel) und Adenin (TNF2 Allel) und wurde als erstes von *Wilson et al.* 1992 beschrieben (125). Einige Autoren haben herausgefunden, dass Adenin an der Position -308 ein stärkerer Transkriptionsaktivator ist (162, 163) und das dieses Allel *in vitro* mit einer höheren TNF- α Produktionen assoziiert ist (132, 164). Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass der TNF- α -308 SNP eine zentrale Rolle in Bezug auf die Höhe der TNF- α Freisetzung spielt und er eventuell ein genetischer Faktor für MHC assoziierte Autoimmun- und Infektionskrankheiten ist (133). Klinische Studien unterstreichen diese Hypothese. Das TNF2 Allel scheint mit einem erhöhten Risiko für zerebrale Malaria (165) und Asthma (166) in Verbindung zu stehen.

TNF- α verstärkt und modifiziert durch seine Wirkungen das Immunsystem. Bei überschießender Produktion wird durch das TNF- α die Morbidität und Mortalität zum Beispiel bei Sepsis (95) und Meningitis (94) erhöht. Man hat festgestellt, dass die Höhe der TNF- α Produktion aufgrund unterschiedlicher Polymorphismen in der Promotorregion von TNF- α und Lymphotoxin- α erheblich variieren kann (121).

Als proinflammatorisches Zytokin ist die TNF- α Produktion im Rahmen einer therapeutischen Einflussnahme von dem genetischen Polymorphismus abhängig. *Endres et al.* zeigten, dass ω -3-Fettsäuren antiinflammatorische Eigenschaften durch die Senkung des TNF Spiegels besitzen (134). Mit

immunnutritiven Nährstoffen, wie auch Glutamin, wird ein Einfluss des Genotyps auf die Ansprechbarkeit auf diese Pharmakonutrients vermutet. Bisher konnte jedoch kein solitärer Einfluss des Genotyps auf die Produktion von Immunmediatoren in Bezug auf immunnutritive Nährstoffe eruiert werden. Grimble et al. (91) fanden heraus, dass eine Steigerung oder Senkung der TNF- α Produktion durch ω -3-Fettsäuren unter anderem auch von dem jeweiligen Lymphotoxin- α Polymorphismus abhängig ist und interessanter Weise wenig mit dem TNF- α -308 SNP zu tun haben scheint. In ihrer Studie an 111 gesunden jungen Männern als Probanden wurden die genetischen Charakteristika von TNF- α und Lymphotoxin- α an drei Terzilen mit unterschiedlich hoher Zytokinantwort nach ω -3-Fettsäure Supplementierung verglichen. Eine Assoziation zeigte sich zwischen dem genetischen homozygoten Lymphotoxin- α -2 Allel und den Terzilen mit mittlerer und hoher TNF- α Produktion. Hier lässt sich ein proinflammatorischer Einfluss durch das homozygote Lymphotoxin- α -2 Allel vermuten. Bei Heterozygotie ist ein antiinflammatorischer Einfluss erkennbar.

Die Studie von Grimble et al. nahmen wir zum Anlass, einen ähnlichen Untersuchungsansatz zu entwerfen. Statt einer Supplementierung mit den ω -3-Fettsäuren haben wir die Verteilung des TNF- α -308 SNP an der Höhe der TNF- α Produktion mit und ohne Supplementierung von Glutamin verglichen. Wie auch bei IL-2 hielten wir die Aufteilung in Terzilen mit niedriger, mittlerer und hoher Zytokinantwort ebenfalls für sinnvoll. Wie in vergleichbaren Studien kommen wir bezüglich der Häufigkeitsverteilung der Allelfrequenzen bei dem TNF- α -308 SNP zu gleichen Ergebnissen (siehe Tabelle 4.3). Paradoxer Weise zeigt sich bei uns, unabhängig von der Höhe der Glutaminkonzentration, im Unterschied zu anderen Studien über allen Terzilen tendenziell eine erhöhte TNF- α Produktion bei Probanden die heterozygot oder homozygot für das Guanin Allel sind (TNF1 Allel) (132, 164). Es könnte aber auch sein, dass diese anscheinend erhöhte TNF- α Produktion die Norm darstellt, und dass ein homozygoten Adenin Allel (TNF2 Allel) die TNF- α Synthese senkt. Dies würde

aber bedeuten, dass dieses TNF2 Allel inhibierend auf TNF- α und somit antiinflammatorisch wirkt. Diese Vermutung würde allerdings nicht zu den oben genannten klinischen Studien passen, bei denen gerade dieses Allel die Morbidität und Mortalität bestimmter Erkrankungen zu erhöhen scheint.

Im Vergleich zu unseren Ergebnissen konnten *Grimble et al.* keinerlei Abhängigkeit zwischen dem TNF- α -308 SNP und der TNF- α Freisetzung ausmachen. Ob die erhöhte Zytokinfreisetzung in unserer Studie von der Höhe der Glutaminkonzentration abhängig ist, lässt sich auch nicht verifizieren, da in unserer Studie wie bereits in Kapitel 4.1 beschrieben, lediglich zwei unterschiedlich hohe Glutaminkonzentrationen verwendet wurden. Die niedrigere Konzentration von 250 μ M Glutamin ist wahrscheinlich nicht niedrig genug gewählt um einen Unterschied zur höheren Glutaminkonzentration von 2000 μ M festzustellen. In unserer Studie scheinen wir mit unseren Konzentrationen also nicht den Grenzwert zu erfassen, ab welchem eine Änderung der Höhe der Zytokinfreisetzung erkennbar werden könnte. Dieser Umstand lässt somit weder zur IL-2 Freisetzung noch zur TNF- α Freisetzung einen klaren Zusammenhang zur supplementierten Glutaminhöhe erkennen.

Korrespondierend zur diskutierten Studie von *Grimble et al.*, bei denen ω -3-Fettsäuren vor allem bei hoher TNF- α Freisetzung eine antiinflammatorische Wirkung zeigten, hätte man erwarten können, dass Glutamin, abhängig vom genetischen Polymorphismus auch einen antiinflammatorischen Einfluss auf die TNF- α Produktion hat. Diese Hypothese lässt sich abschließend jedoch nicht bestätigen.

Abschließend ist zu sagen, dass der Vergleich unserer Studie mit den anderen diskutierten Studien durch die Form der Methodik erschwert wird. Wir haben uns im Gegensatz zu den anderen Untersuchungen, in denen mit isolierten Zellen gearbeitet wird, gezielt dazu entschlossen Immunzellen zu stimulieren, die in ihrem physiologischen Medium Blut verbleiben. Durch den Prozess der Isolation von Zellen können diese aktiviert werden, so dass die

Messung der Zytokinproduktion verändert sein kann. Dieses Phänomen haben wir mit unserem Vollblutansatz versucht zu vermeiden.

Tabelle 4.2: Allelfrequenzen verschiedener Studien für den IL-2-330 SNP.

Autor	SNP	TT	GT	GG	n
<i>John et al.</i>	IL-2	53,2%	39,2%	7,6%	79
<i>Reynard et al.</i>	IL-2	55,3%	40,8%	3,9%	76
<i>eigene Studie</i>	IL-2	47%	46%	7%	91

Tabelle 4.3: Allelfrequenzen verschiedener Studien für den TNF- α -308 SNP.

Autor	SNP	GG	GA	AA	n
<i>Reynard et al.</i>	TNF- α	60,5%	35,5%	3,9%	76
<i>Grimble et al.</i>	TNF- α	68%	30%	2%	111
<i>eigene Studie</i>	TNF- α	66%	28%	6%	87

Weitere Untersuchungen sowohl mit gesunden Probanden als auch mit Patientenkollektiven sind notwendig, um die klinische Relevanz des IL-2 330 SNP und auch des TNF- α 308 SNP näher zu beleuchten.

5. Zusammenfassung

Ein wichtiges Kriterium für die Immunkompetenz eines Patienten ist sein Ernährungszustand. Zu einer sinnvollen Substitution von bestimmten Ernährungsbestandteilen bei immungeschwächten Patienten zählt unter anderem die Aminosäure Glutamin. Studien haben gezeigt, dass Glutamin durch seinen Einfluss auf die Freisetzung von Zytokinen, das Immunsystem eines Individuums modifizieren und dadurch stärken kann.

Die Differenzierung und Modulierung von Immunzellen wird durch eine ganze Reihe von unterschiedlichen Zytokinen reguliert. Es gibt Hinweise darauf, dass die Höhe der Freisetzung solcher Zytokine auch von ihrem jeweiligen genetischen Polymorphismus abhängig ist. An unserer Studie haben wir untersucht, welchen Einfluss die Polymorphismen IL-2 -330 (T/G) und TNF- α -308 (A/G) auf die Zytokine IL-2 und TNF- α haben und ob Glutamin, eine bedingt essentielle Aminosäure, im Rahmen einer Immunnutrition die Zytokinsynthese beeinflussen könnte.

Die Blutproben, die wir für unsere Studie verwendeten, stammen aus einem Probandenkollektiv bestehend aus 91 Individuen beider Geschlechter.

Das Vollblut der Probanden wurde 1:1 mit Glutamin freiem RPMI 1640 verdünnt und dann auf die Glutaminkonzentrationen 250 μ M und 2000 μ M eingestellt. Vor Beginn der Bestimmung der Konzentrationen von IL-2 und TNF- α wurden die Proben durch 10 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und 1 μ g/ml Ionomycin *in-vitro* aktiviert. Die Stimulation der Immunzellen erfolgte im Inkubator bei 37°C über 8 Stunden. Anders als in anderen Studien sind die Immunzellen in unserer Untersuchung also während der Aktivierung in ihrem physiologischen Milieu Blut verblieben. Parallel wurde die DNA aus den Probandenproben extrahiert und anschließend wurden die IL-2 -330 und die TNF- α -308 Polymorphismen bestimmt.

In unserer Studie fand sich kein signifikanter Einfluss von Glutamin auf die IL-2 Freisetzung. In den Terzilen mit niedriger und mittlerer Zytokinantwort scheint ein diskreter, nicht signifikanter Effekt auf die IL-2 Freisetzung unter dem Einfluss von 2000 μ M Glutamin erkennbar zu sein. Glutamin hat in unserer Untersuchung auch keinen signifikanten Einfluss auf die TNF- α Freisetzung. In den Terzilen mit mittlerer und hoher Zytokinantwort ist unter dem Einfluss von Glutamin ein tendenziell senkender Effekt auf die TNF- α Freisetzung ohne Signifikanz erkennbar.

Unabhängig von der Höhe der Glutaminkonzentration hat der IL-2 Genotyp in unserer Studie keinen Einfluss auf die Höhe der IL-2 Freisetzung. Tendenziell zeigt sich, dass der TNF- α Polymorphismus, unabhängig von der Höhe der Glutaminkonzentration im Vollblut, einen diskreten Einfluss auf die Höhe der TNF- α Freisetzung haben könnte. Über allen Terzilen scheint die Höhe der TNF- α Konzentration bei Probanden mit mindestens einem G Allel durchschnittlich höher zu sein als bei Probanden mit dem A/A Genotyp. Diese Aussage ist jedoch durch kein signifikantes Ergebnis gestützt.

Widersprüche zu anderen Studien sind zum Teil durch die unterschiedliche Methode der Stimulation der Immunzellen und dem unterschiedlichen physiologischen Medium, in dem die Zellen während der Aktivierung verbleiben, zu erklären. Man weiß heute, dass allein durch den Prozess der Isolation Zellen aktiviert werden können, so dass die Messung der Zytokinproduktion verändert sein kann. Dieses haben wir mit unserem Vollblutansatz vermieden.

Da in dieser Untersuchung nur der Einfluss unterschiedlicher Glutaminkonzentrationen auf die Zytokinfreisetzung bei gesunden Probanden dargestellt wurde, sind weitere Untersuchungen sowohl mit gesunden Probanden als auch mit Patientenkollektiven notwendig, um sowohl die klinische Relevanz einer Glutaminsupplementierung als auch den Einfluss des IL-2 330 SNP beziehungsweise des TNF- α 308 SNP näher zu beleuchten.

6. Summary

An important part of a patient's immune-competence is his nutritional condition. A reasonable and valuable substitution of certain nutritional components for patients with a weak immune system is, among other things, the amino acid glutamine. Studies have shown that glutamine, with its influence on the release of cytokines, can modify and therefore strengthen an individual's immune system.

The differentiation and shaping of immune cells is regulated by an array of various cytokines. Various findings indicate and suggest that the amount of such released cytokines is also dependent upon each respective genetic polymorphism. With our study, we researched which influence the polymorphisms IL-2-330 (T/G) and TNF- α -308 (A/G) had on the cytokines IL-2 und TNF- α and if glutamine, a conditional essential amino acid, can influence or change the cytokines synthesis if given within a nutritional diet.

The blood samples that we used in our study came from a collective of test subjects consisting of 91 individuals of both genders.

The subject's whole blood was diluted 1:1 with glutamine free RPMI 1640 and then adjusted to the glutamine concentration of 250 μ M und 2000 μ M. Before beginning to stipulate the concentration of IL-2 und TNF- α we activated the samples in-vitro with 10 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) and 1 μ g/ml Ionomycin. In the incubator and with a temperature of 37° C, the stimulation of the immune cells occurred within and across the next 8 hours. Unlike in other studies, the immune cells in our examination stayed in their physiologically milieu blood during the activation. Simultaneously the DNA of the test subject's samples was extracted and then the IL-2 -330 and the TNF- α -308 polymorphisms determined.

Within our studies, no significant influence of glutamine on the IL-2 release was found.

Within the tertiles of a low and middle cytokine response seems to be a discrete and insignificant effect on the IL-2 release under the influence of 2000 μ M glutamine. Furthermore, glutamine had no significant influence on the TNF- α release within our study. In the tertiles of middle and high cytokine response and under the influence of glutamine, there is a decreasing tendency of the effect on the TNF- α release without significance distinguishable.

Regardless of the amount of glutamine concentration, within our research, the IL-2 genotype had no influence over the amount of the IL-2 release. It indicates that the TNF- α Polymorphism, regardless of the amount of the glutamine concentration in the whole blood, could have a discrete influence over the amount of the TNF- α release. Throughout all tertiles it seems that the amount of the TNF- α concentration is on average higher for test subjects with a minimum of at least one G-allele than it is for test subjects with a A/A genotype. This statement, however is not supported by a significant finding.

Discrepancies to other studies can be partially explained by different methods used to stimulate the immune cells and the various physiological mediums, in which the cells remain during the activation process. We know today, that the simple process of isolation can activate cells, and therefore the measurement of cytokine production may be altered. In our research, we avoided this from happening with our whole blood approach.

Since our study only outlines the influence of various glutamine concentrations on the cytokine release of healthy test subjects, more research with healthy test subjects, as well as with groups of patients is necessary in order to shine a light on the clinical relevance of a glutamine supplementation as well as the influence of the IL-2 330 SNP and the TNF- α 308 SNP.

7. Literaturverzeichnis

1. Biesalski, H.K., Fürst, P., Kasper, H., Kluthe, R., Pölerl, W., Puchstein, Ch., Stähelin, H.B. (HRSG.), *Ernährungsmedizin*. 2.Auflage ed. 1999, New York: Georg Thieme Verlag Stuttgart.
2. Fürst, P., et al., *Design of parenteral synthetic dipeptides for clinical nutrition: in vitro and in vivo utilization*. *Ann Nutr Metab*, 1997. **41**(1): p. 10-21.
3. Fürst, P. and P. Stehle, *(Glutamine supplemented nutrition in clinical practice--use of glutamine-containing dipeptides)*. *Infusionsther Transfusionsmed*, 1995. **22**(5): p. 317-24.
4. Fürst, P. and P. Stehle, *The potential use of parenteral dipeptides in clinical nutrition*. *Nutr Clin Pract*, 1993. **8**(3): p. 106-14.
5. Babst, R., et al., *Glutamine peptide-supplemented long-term total parenteral nutrition: effects on intracellular and extracellular amino acid patterns, nitrogen economy, and tissue morphology in growing rats*. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1993. **17**(6): p. 566-74.
6. Jiang, Z.M., et al., *Comparison of parenteral nutrition supplemented with L-glutamine or glutamine dipeptides*. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1993. **17**(2): p. 134-41.
7. Brandl, M., et al., *Parenteral nutrition with an amino acid solution containing a mixture of dipeptides. Evidence for efficient utilization of dipeptides in man*. *Beitr Infusionsther Klin Ernähr*, 1987. **17**: p. 103-16.
8. Matthews, D.E., A. Battezzati, and P. Fürst, *Alanylglutamine kinetics in humans*. *Clin Nutr*, 1993. **12**(1): p. 57-8.
9. Lochs, H., et al., *Metabolism of dipeptides and their constituent amino acids by liver, gut, kidney, and muscle*. *Am J Physiol*, 1988. **254**(5 Pt 1): p. E588-94.
10. Stehle, P. and P. Fürst, *In vitro hydrolysis of glutamine-, tyrosine- and cystine-containing short-chain peptides*. *Clin Nutr*, 1990. **9**(1): p. 37-8.
11. Rohde, T., D.A. MacLean, and B. Klarlund Pedersen, *Glutamine, lymphocyte proliferation and cytokine production*. *Scand J Immunol*, 1996. **44**(6): p. 648-50.

12. Griffiths, R.D., *The evidence for glutamine use in the critically-ill*. Proc Nutr Soc, 2001. **60**(3): p. 403-10.
13. Parry-Billings, M., et al., *Plasma amino acid concentrations in the overtraining syndrome: possible effects on the immune system*. Med Sci Sports Exerc, 1992. **24**(12): p. 1353-8.
14. Plumley, D.A., et al., *Role of the lungs in maintaining amino acid homeostasis*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1990. **14**(6): p. 569-73.
15. Chakrabarti, R., *Transcriptional regulation of the rat glutamine synthetase gene by tumor necrosis factor-alpha*. Eur J Biochem, 1998. **254**(1): p. 70-4.
16. Souba, W.W., R.J. Smith, and D.W. Wilmore, *Effects of glucocorticoids on glutamine metabolism in visceral organs*. Metabolism, 1985. **34**(5): p. 450-6.
17. Phromphetcharat, V., et al., *Ammonia partitioning between glutamine and urea: interorgan participation in metabolic acidosis*. Kidney Int, 1981. **20**(5): p. 598-605.
18. Welbourne, T.C. and S. Joshi, *Interorgan glutamine metabolism during acidosis*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1990. **14**(4 Suppl): p. 77S-85S.
19. Windmueller, H.G., *Glutamine utilization by the small intestine*. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 1982. **53**: p. 201-37.
20. Nurjhan, N., et al., *Glutamine: a major gluconeogenic precursor and vehicle for interorgan carbon transport in man*. J Clin Invest, 1995. **95**(1): p. 272-7.
21. Roth, E., et al., *Metabolic disorders in severe abdominal sepsis: Glutamine deficiency in skeletal muscle*. Clin Nutr, 1982. **1**(1): p. 25-41.
22. Parry-Billings, M., et al., *Effects of major and minor surgery on plasma glutamine and cytokine levels*. Arch Surg, 1992. **127**(10): p. 1237-40.
23. Parry-Billings, M., et al., *Does glutamine contribute to immunosuppression after major burns?* Lancet, 1990. **336**(8714): p. 523-5.
24. MacLennan, P.A., et al., *Inhibition of protein breakdown by glutamine in perfused rat skeletal muscle*. FEBS Lett, 1988. **237**(1-2): p. 133-6.

25. Lacey, J.M. and D.W. Wilmore, *Is glutamine a conditionally essential amino acid?* Nutr Rev, 1990. **48**(8): p. 297-309.
26. Ehrensvar, G., A. Fischer, and R. Stjernholm, *Protein metabolism of tissue cells in vitro; the chemical nature of some obligate factors of tissue cell nutrition.* Acta Physiol Scand, 1949. **18**(2-3): p. 218-30.
27. Rohde, T., et al., *Effects of glutamine on the immune system: influence of muscular exercise and HIV infection.* J Appl Physiol, 1995. **79**(1): p. 146-50.
28. Yaqoob, P. and P.C. Calder, *Glutamine requirement of proliferating T lymphocytes.* Nutrition, 1997. **13**(7-8): p. 646-51.
29. Wilmore, D.W. and J.K. Shabert, *Role of glutamine in immunologic responses.* Nutrition, 1998. **14**(7-8): p. 618-26.
30. Ardawi, M.S. and E.A. Newsholme, *Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat.* Biochem J, 1983. **212**(3): p. 835-42.
31. Brand, K., et al., *Metabolism of glutamine in lymphocytes.* Metabolism, 1989. **38**(8 Suppl 1): p. 29-33.
32. Newsholme, E.A., B. Crabtree, and M.S. Ardawi, *Glutamine metabolism in lymphocytes: its biochemical, physiological and clinical importance.* Q J Exp Physiol, 1985. **70**(4): p. 473-89.
33. Ardawi, M.S., *Glutamine and glucose metabolism in human peripheral lymphocytes.* Metabolism, 1988. **37**(1): p. 99-103.
34. Crawford, J. and H.J. Cohen, *The essential role of L-glutamine in lymphocyte differentiation in vitro.* J Cell Physiol, 1985. **124**(2): p. 275-82.
35. Spittler, A., et al., *Influence of glutamine on the phenotype and function of human monocytes.* Blood, 1995. **86**(4): p. 1564-9.
36. O'Riordain, M.G., et al., *Glutamine-supplemented total parenteral nutrition enhances T-lymphocyte response in surgical patients undergoing colorectal resection.* Ann Surg, 1994. **220**(2): p. 212-21.
37. Yaqoob, P. and P.C. Calder, *Cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells: differential sensitivity to glutamine availability.* Cytokine, 1998. **10**(10): p. 790-4.

38. Roitt, I.M., Brostoff, J., Male, D.K. (HRSG.), *Immunology*. 4th ed. 1996: Mosby. 416.
39. Aggarwal, B.B., Puri, R.K. (HRSG.), *Human cytokines: Their role in disease and therapy*. 1995, Cambridge, USA.
40. Thomson, A.H., *The cytokine handbook*. 1998, London, Großbritannien.
41. *Nomenclature for secreted regulatory proteins of the immune system (interleukins): update. IUIS/WHO Standing Committee on Interleukin Designation*. Bull World Health Organ, 1997. **75**(2): p. 175.
42. Morgan, D.A., F.W. Ruscetti, and R. Gallo, *Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows*. Science, 1976. **193**(4257): p. 1007-8.
43. Aarden, L.C., Brunner T.K., Cerottini, J.C. , *Revised nomenclature for antigen-nonspecific T cell proliferation and helper factors*. J Immunol, 1979. **123**(6): p. 2928-9.
44. Taniguchi, T., et al., *Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2*. Nature, 1983. **302**(5906): p. 305-10.
45. Gillis, S., et al., *T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity*. J Immunol, 1978. **120**(6): p. 2027-32.
46. Rao, B.M., et al., *Interleukin 2 (IL-2) variants engineered for increased IL-2 receptor alpha-subunit affinity exhibit increased potency arising from a cell surface ligand reservoir effect*. Mol Pharmacol, 2004. **66**(4): p. 864-9.
47. Waldmann, T.A., S. Dubois, and Y. Tagaya, *Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy*. Immunity, 2001. **14**(2): p. 105-10.
48. van Parijs, L., V.L. Perez, and A.K. Abbas, *Mechanisms of peripheral T cell tolerance*. Novartis Found Symp, 1998. **215**: p. 5-14; discussion 14-20, 33-40.
49. Lin, J. and A. Weiss, *T cell receptor signalling*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 2): p. 243-4.
50. Smith, K.A., *Interleukin-2: inception, impact, and implications*. Science, 1988. **240**(4856): p. 1169-76.

51. Taniguchi, T. and Y. Minami, *The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview*. Cell, 1993. **73**(1): p. 5-8.
52. Mingari, M.C., et al., *Human interleukin-2 promotes proliferation of activated B cells via surface receptors similar to those of activated T cells*. Nature, 1984. **312**(5995): p. 641-3.
53. Waldmann, T.A., et al., *Expression of interleukin 2 receptors on activated human B cells*. J Exp Med, 1984. **160**(5): p. 1450-66.
54. Itoh, K., et al., *The interplay of interleukin-10 (IL-10) and interleukin-2 (IL-2) in humoral immune responses: IL-10 synergizes with IL-2 to enhance responses of human B lymphocytes in a mechanism which is different from upregulation of CD25 expression*. Cell Immunol, 1994. **157**(2): p. 478-88.
55. Ferrante, A., *Activation of neutrophils by interleukins-1 and -2 and tumor necrosis factors*. Immunol Ser, 1992. **57**: p. 417-36.
56. Espinoza-Delgado, I., et al., *Interleukin-2 and human monocyte activation*. J Leukoc Biol, 1995. **57**(1): p. 13-9.
57. Bosse, M., et al., *Gene expression of interleukin-2 in purified human peripheral blood eosinophils*. Immunology, 1996. **87**(1): p. 149-54.
58. Levi-Schaffer, F., et al., *Identification of interleukin-2 in human peripheral blood eosinophils*. Immunology, 1996. **87**(1): p. 155-61.
59. Rand, T.H., et al., *Human eosinophils express functional interleukin 2 receptors*. J Clin Invest, 1991. **88**(3): p. 825-32.
60. Hoenstein, R., et al., *Interleukin-2 activates human peripheral blood eosinophils*. Cell Immunol, 2001. **210**(2): p. 116-24.
61. Nagler, A., L.L. Lanier, and J.H. Phillips, *Constitutive expression of high affinity interleukin 2 receptors on human CD16-natural killer cells in vivo*. J Exp Med, 1990. **171**(5): p. 1527-33.
62. Yron, I., et al., *In vitro growth of murine T cells. V. The isolation and growth of lymphoid cells infiltrating syngeneic solid tumors*. J Immunol, 1980. **125**(1): p. 238-45.
63. Mule, J.J., S. Shu, and S.A. Rosenberg, *The anti-tumor efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin 2 in vivo*. J Immunol, 1985. **135**(1): p. 646-52.

64. Lafreniere, R. and S.A. Rosenberg, *Adoptive immunotherapy of murine hepatic metastases with lymphokine activated killer (LAK) cells and recombinant interleukin 2 (RIL 2) can mediate the regression of both immunogenic and nonimmunogenic sarcomas and an adenocarcinoma.* J Immunol, 1985. **135**(6): p. 4273-80.
65. Rosenberg, S.A., et al., *Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer.* N Engl J Med, 1985. **313**(23): p. 1485-92.
66. Lee, R.E., et al., *Cardiorespiratory effects of immunotherapy with interleukin-2.* J Clin Oncol, 1989. **7**(1): p. 7-20.
67. Ognibene, F.P., et al., *Interleukin-2 administration causes reversible hemodynamic changes and left ventricular dysfunction similar to those seen in septic shock.* Chest, 1988. **94**(4): p. 750-4.
68. Fragasso, G., et al., *Impaired left ventricular filling rate induced by treatment with recombinant interleukin 2 for advanced cancer.* Br Heart J, 1994. **71**(2): p. 166-9.
69. Kragel, A.H., et al., *Myocarditis or acute myocardial infarction associated with interleukin-2 therapy for cancer.* Cancer, 1990. **66**(7): p. 1513-6.
70. Kruit, W.H., et al., *Cardiotoxicity as a dose-limiting factor in a schedule of high dose bolus therapy with interleukin-2 and alpha-interferon. An unexpectedly frequent complication.* Cancer, 1994. **74**(10): p. 2850-6.
71. Belldegrun, A., et al., *Effects of interleukin-2 on renal function in patients receiving immunotherapy for advanced cancer.* Ann Intern Med, 1987. **106**(6): p. 817-22.
72. Deutsche_Krebsgesellschaft, *Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinien.* 3. Auflage ed. 2002.
73. Minami, Y., et al., *The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes.* Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 245-68.
74. Waldmann, T., Y. Tagaya, and R. Bamford, *Interleukin-2, interleukin-15, and their receptors.* Int Rev Immunol, 1998. **16**(3-4): p. 205-26.

75. Rubin, L.A., et al., *Soluble interleukin 2 receptors are released from activated human lymphoid cells in vitro*. J Immunol, 1985. **135**(5): p. 3172-7.
76. Maeta, M., et al., *A progressive postoperative increase in the serum level of soluble receptors for interleukin-2 is an indicator of a poor prognosis in patients with gastric cancer*. Int J Mol Med, 1998. **1**(1): p. 113-6.
77. Kamihira, S., et al., *Significance of soluble interleukin-2 receptor levels for evaluation of the progression of adult T-cell leukemia*. Cancer, 1994. **73**(11): p. 2753-8.
78. Stasi, R., et al., *Detection of soluble interleukin-2 receptor and interleukin-10 in the serum of patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Identification of a subset at high risk of treatment failure*. Cancer, 1994. **74**(6): p. 1792-800.
79. Symons, J.A., et al., *Soluble IL-2 receptor in rheumatoid arthritis. Correlation with disease activity, IL-1 and IL-2 inhibition*. J Immunol, 1988. **141**(8): p. 2612-8.
80. Semenzato, G., et al., *Increased serum levels of soluble interleukin-2 receptor in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis*. J Clin Immunol, 1988. **8**(6): p. 447-52.
81. Pizzolo, G., et al., *Increased levels of soluble interleukin-2 receptor in the serum of patients with human immunodeficiency virus infection*. Diagn Clin Immunol, 1987. **5**(4): p. 180-3.
82. Kaden, J., B. Schutze, and G. May, *A critical analysis of soluble interleukin-2 receptor levels in kidney allograft recipients*. Transpl Int, 1996. **9 Suppl 1**: p. S63-7.
83. Perkins, J.D., et al., *Soluble interleukin-2 receptor level as an indicator of liver allograft rejection*. Transplantation, 1989. **47**(1): p. 77-81.
84. Zucchelli, G.C., et al., *Increased circulating concentrations of interleukin 2 receptor during rejection episodes in heart- or kidney-transplant recipients*. Clin Chem, 1990. **36**(12): p. 2106-9.
85. Caligiuri, M.A., et al., *Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors*. J Exp Med, 1990. **171**(5): p. 1509-26.

86. Old, L.J., *Tumor necrosis factor*. Sci Am, 1988. **258**(5): p. 59-60, 69-75.
87. Beutler, B. and G.E. Grau, *Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases*. Crit Care Med, 1993. **21**(10 Suppl): p. S423-35.
88. Lin, E., S.E. Calvano, and S.F. Lowry, *Inflammatory cytokines and cell response in surgery*. Surgery, 2000. **127**(2): p. 117-26.
89. Beutler, B., *TNF in pathophysiology: biosynthetic regulation*. J Invest Dermatol, 1990. **95**(6 Suppl): p. 81S-84S.
90. Kinkhabwala, M., et al., *A novel addition to the T cell repertory. Cell surface expression of tumor necrosis factor/cachectin by activated normal human T cells*. J Exp Med, 1990. **171**(3): p. 941-6.
91. Grimble, R.F., et al., *The ability of fish oil to suppress tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells in healthy men is associated with polymorphisms in genes that influence tumor necrosis factor alpha production*. Am J Clin Nutr, 2002. **76**(2): p. 454-9.
92. Cuenca, J., et al., *Genetic polymorphism at position-308 in the promoter region of the tumor necrosis factor (TNF): implications of its allelic distribution on susceptibility or resistance to diseases in the Chilean population*. Biol Res, 2001. **34**(3-4): p. 237-41.
93. Lv, K., et al., *Effects of a Single Nucleotide Polymorphism on the Expression of Human Tumor Necrosis Factor-alpha*. Scand J Immunol, 2006. **64**(2): p. 164-9.
94. Westendorp, R.G., et al., *Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease*. Lancet, 1997. **349**(9046): p. 170-3.
95. van der Poll, T. and S.J. van Deventer, *Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis*. Infect Dis Clin North Am, 1999. **13**(2): p. 413-26, ix.
96. Knight, J.C. and D. Kwiatkowski, *Inherited variability of tumor necrosis factor production and susceptibility to infectious disease*. Proc Assoc Am Physicians, 1999. **111**(4): p. 290-8.
97. Maini, R.N. and P.C. Taylor, *Anti-cytokine therapy for rheumatoid arthritis*. Annu Rev Med, 2000. **51**: p. 207-29.

98. Murch, S.H., et al., *Serum concentrations of tumour necrosis factor alpha in childhood chronic inflammatory bowel disease*. *Gut*, 1991. **32**(8): p. 913-7.
99. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. *Nature*, 1993. **362**(6423): p. 801-9.
100. Kutukculer, N., et al., *Renal allograft rejection: the temporal relationship and predictive value of plasma TNF (alpha and beta), IFN-gamma and soluble ICAM-1*. *Transpl Int*, 1995. **8**(1): p. 45-50.
101. Thomas Karow, R.L.-R., *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 12. Auflage ed. 2004, Pulheim.
102. Loetscher, H., et al., *Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor*. *Cell*, 1990. **61**(2): p. 351-9.
103. Schall, T.J., et al., *Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor*. *Cell*, 1990. **61**(2): p. 361-70.
104. Smyth, M.J. and R.W. Johnstone, *Role of TNF in lymphocyte-mediated cytotoxicity*. *Microsc Res Tech*, 2000. **50**(3): p. 196-208.
105. Pfeffer, K., et al., *Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection*. *Cell*, 1993. **73**(3): p. 457-67.
106. Rothe, J., et al., *Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes**. *Nature*, 1993. **364**(6440): p. 798-802.
107. Erickson, S.L., et al., *Decreased sensitivity to tumour-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice*. *Nature*, 1994. **372**(6506): p. 560-3.
108. Peschon, J.J., et al., *TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation*. *J Immunol*, 1998. **160**(2): p. 943-52.
109. Strachan, T., Read, A.T. (HRSG.), *Molekulare Humangenetik*. 3. Auflage ed. 2005: Spektrum Akademischer Verlag.
110. John, S., et al., *Two novel biallelic polymorphisms in the IL-2 gene*. *Eur J Immunogenet*, 1998. **25**(6): p. 419-20.

111. Reynard, M.P., D. Turner, and C.V. Navarrete, *Allele frequencies of polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha, interleukin-10, interferon-gamma and interleukin-2 genes in a North European Caucasoid group from the UK*. Eur J Immunogenet, 2000. **27**(4): p. 241-9.
112. Scarel-Caminaga, R.M., et al., *Frequencies of the -330 (T --> G) IL-2 and -590 (T --> C) IL-4 gene polymorphisms in a population from south-eastern Brazil*. Eur J Immunogenet, 2002. **29**(4): p. 293-6.
113. Cox, E.D., et al., *Cytokine polymorphic analyses indicate ethnic differences in the allelic distribution of interleukin-2 and interleukin-6*. Transplantation, 2001. **72**(4): p. 720-6.
114. Hoffmann, S.C., et al., *Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes*. Transplantation, 2001. **72**(8): p. 1444-50.
115. Morgun, A., et al., *Interleukin-2 gene polymorphism is associated with renal but not cardiac transplant outcome*. Transplant Proc, 2003. **35**(4): p. 1344-5.
116. MacMillan, M.L., et al., *High-producer interleukin-2 genotype increases risk for acute graft-versus-host disease after unrelated donor bone marrow transplantation*. Transplantation, 2003. **76**(12): p. 1758-62.
117. Matesanz, F., et al., *Effects of the multiple sclerosis associated -330 promoter polymorphism in IL2 allelic expression*. J Neuroimmunol, 2004. **148**(1-2): p. 212-7.
118. Pawlik, A., et al., *IL1beta+3953 exon 5 and IL-2 -330 promoter polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol, 2005. **23**(2): p. 159-64.
119. Pawlik, A., et al., *IL-2 and TNF-alpha promoter polymorphisms in patients with acute kidney graft rejection*. Transplant Proc, 2005. **37**(5): p. 2041-3.
120. Jacob, C.O., et al., *Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor alpha: relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(3): p. 1233-7.

121. Wilson, A.G., F.S. di Giovine, and G.W. Duff, *Genetics of tumour necrosis factor-alpha in autoimmune, infectious, and neoplastic diseases*. J Inflamm, 1995. **45**(1): p. 1-12.
122. D'Alfonso, S. and P.M. Richiardi, *A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region*. Immunogenetics, 1994. **39**(2): p. 150-4.
123. Hamann, A., et al., *Genetic variability in the TNF-alpha promoter is not associated with type II diabetes mellitus (NIDDM)*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **211**(3): p. 833-9.
124. Ugliandolo, A.M., et al., *Identification of three new single nucleotide polymorphisms in the human tumor necrosis factor-alpha gene promoter*. Tissue Antigens, 1998. **52**(4): p. 359-67.
125. Wilson, A.G., et al., *Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product*. Hum Mol Genet, 1992. **1**(5): p. 353.
126. Wilson, A.G., et al., *An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles*. J Exp Med, 1993. **177**(2): p. 557-60.
127. Abraham, L.J., M.A. French, and R.L. Dawkins, *Polymorphic MHC ancestral haplotypes affect the activity of tumour necrosis factor-alpha*. Clin Exp Immunol, 1993. **92**(1): p. 14-8.
128. Pociot, F., et al., *Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF-alpha and TNF-beta by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus*. Eur J Immunol, 1993. **23**(1): p. 224-31.
129. Yazici, A.C., et al., *Lack of association with TNF-alpha-308 promoter polymorphism in patients with vitiligo*. Arch Dermatol Res, 2006.
130. da Sliva, B., et al., *Lack of association between the -308 polymorphism of the tumor necrosis factor-alpha gene and the insulin resistance syndrome*. J Investig Med, 2000. **48**(4): p. 236-44.
131. Tobon, G.J., et al., *Lack of association between TNF-308 polymorphism and the clinical and immunological characteristics of systemic lupus erythematosus and primary Sjogren's syndrome*. Clin Exp Rheumatol, 2005. **23**(3): p. 339-44.

132. Bouma, G., et al., *Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease.* Scand J Immunol, 1996. **43**(4): p. 456-63.
133. Abraham, L.J. and K.M. Kroeger, *Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease.* J Leukoc Biol, 1999. **66**(4): p. 562-6.
134. Endres, S., et al., *The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells.* N Engl J Med, 1989. **320**(5): p. 265-71.
135. Grimble, R.F., *Nutritional modulation of immune function.* Proc Nutr Soc, 2001. **60**(3): p. 389-97.
136. Gianotti, L., et al., *(Nutritional therapy in surgical patients: an update).* Minerva Anestesiol, 2003. **69**(4): p. 275-80.
137. Shabert, J.K., et al., *Glutamine-antioxidant supplementation increases body cell mass in AIDS patients with weight loss: a randomized, double-blind controlled trial.* Nutrition, 1999. **15**(11-12): p. 860-4.
138. Eagle, H., et al., *The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid.* J Biol Chem, 1956. **218**(2): p. 607-16.
139. Stein, W.H. and S. Moore, *The free amino acids of human blood plasma.* J Biol Chem, 1954. **211**(2): p. 915-26.
140. Askanazi, J., et al., *Muscle and plasma amino acids after injury: hypocaloric glucose vs. amino acid infusion.* Ann Surg, 1980. **191**(4): p. 465-72.
141. Muhlbacher, F., et al., *Effects of glucocorticoids on glutamine metabolism in skeletal muscle.* Am J Physiol, 1984. **247**(1 Pt 1): p. E75-83.
142. Newsholme, P. and E.A. Newsholme, *Rates of utilization of glucose, glutamine and oleate and formation of end-products by mouse peritoneal macrophages in culture.* Biochem J, 1989. **261**(1): p. 211-8.

143. Shabert, J.K. and D.W. Wilmore, *Glutamine deficiency as a cause of human immunodeficiency virus wasting*. Med Hypotheses, 1996. **46**(3): p. 252-6.
144. Jepson, M.M., et al., *Relationship between glutamine concentration and protein synthesis in rat skeletal muscle*. Am J Physiol, 1988. **255**(2 Pt 1): p. E166-72.
145. Hammarqvist, F., et al., *Addition of glutamine to total parenteral nutrition after elective abdominal surgery spares free glutamine in muscle, counteracts the fall in muscle protein synthesis, and improves nitrogen balance*. Ann Surg, 1989. **209**(4): p. 455-61.
146. Newsholme, P., *Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection?* J Nutr, 2001. **131**(9 Suppl): p. 2515S-22S; discussion 2523S-4S.
147. Ardawi, M.S. and E.A. Newsholme, *Maximum activities of some enzymes of glycolysis, the tricarboxylic acid cycle and ketone-body and glutamine utilization pathways in lymphocytes of the rat*. Biochem J, 1982. **208**(3): p. 743-8.
148. Ziegler, T.R., et al., *Clinical and metabolic efficacy of glutamine-supplemented parenteral nutrition after bone marrow transplantation. A randomized, double-blind, controlled study*. Ann Intern Med, 1992. **116**(10): p. 821-8.
149. Wischmeyer, P.E., *Clinical applications of L-glutamine: past, present, and future*. Nutr Clin Pract, 2003. **18**(5): p. 377-85.
150. Alverdy, J.C., *Effects of glutamine-supplemented diets on immunology of the gut*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1990. **14**(4 Suppl): p. 109S-113S.
151. Fahr, M.J., et al., *Harry M. Vars Research Award. Glutamine enhances immunoregulation of tumor growth*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1994. **18**(6): p. 471-6.
152. Ogle, C.K., et al., *Effect of glutamine on phagocytosis and bacterial killing by normal and pediatric burn patient neutrophils*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1994. **18**(2): p. 128-33.
153. Callard, R. and A. Gearing, *The Cytokine Facts Book*. 1994, London: Academic Press.

154. Szondy, Z. and E.A. Newsholme, *The effect of glutamine concentration on the activity of carbamoyl-phosphate synthase II and on the incorporation of (3H)thymidine into DNA in rat mesenteric lymphocytes stimulated by phytohaemagglutinin*. *Biochem J*, 1989. **261**(3): p. 979-83.
155. Griffiths, M. and D. Keast, *The effect of glutamine on murine splenic leukocyte responses to T and B cell mitogens*. *Immunol Cell Biol*, 1990. **68 (Pt 6)**: p. 405-8.
156. Yaqoob, P. and P.C. Calder, *Glutamine requirement of proliferating T lymphocytes*. *Biochem Soc Trans*, 1996. **24**(1): p. 78S.
157. Chang, W.K., K.D. Yang, and M.F. Shaio, *Effect of glutamine on Th1 and Th2 cytokine responses of human peripheral blood mononuclear cells*. *Clin Immunol*, 1999. **93**(3): p. 294-301.
158. Milewski, P.J., et al., *Intracellular free amino acids in undernourished patients with or without sepsis*. *Clin Sci (Lond)*, 1982. **62**(1): p. 83-91.
159. Crispin, J.C. and J. Alcocer-Varela, *Interleukin-2 and systemic lupus erythematosus--fifteen years later*. *Lupus*, 1998. **7**(4): p. 214-22.
160. Wong, W.M., et al., *Rheumatoid arthritis T cells produce Th1 cytokines in response to stimulation with a novel trispecific antibody directed against CD2, CD3, and CD28*. *Scand J Rheumatol*, 2000. **29**(5): p. 282-7.
161. Kutukculer, N., S. Caglayan, and F. Aydogdu, *Study of pro-inflammatory (TNF-alpha, IL-1alpha, IL-6) and T-cell-derived (IL-2, IL-4) cytokines in plasma and synovial fluid of patients with juvenile chronic arthritis: correlations with clinical and laboratory parameters*. *Clin Rheumatol*, 1998. **17**(4): p. 288-92.
162. Kroeger, K.M., K.S. Carville, and L.J. Abraham, *The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription*. *Mol Immunol*, 1997. **34**(5): p. 391-9.
163. Wilson, A.G., et al., *Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(7): p. 3195-9.
164. Louis, E., et al., *Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated*

- whole blood cell culture in healthy humans.* Clin Exp Immunol, 1998. **113**(3): p. 401-6.
165. McGuire, W., et al., *Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria.* Nature, 1994. **371**(6497): p. 508-10.
166. Moffatt, M.F. and W.O. Cookson, *Tumour necrosis factor haplotypes and asthma.* Hum Mol Genet, 1997. **6**(4): p. 551-4.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Die Aminosäure Glutamin mit zwei Stickstoffseitenketten.	11
Abbildung 2.1: Arbeitsablauf DNA Extraktion.	42
Abbildung 2.2: Sequenzdatei für den TNF- α -SNP an Position -308. Schwarze Markierung: Positionen der Primer. Graue Markierung: Position der Sonde. Der SNP ist hier fett dargestellt.	44
Abbildung 2.3: Sequenzdatei für den IL-2-SNP an Position -330. Schwarze Markierung: Positionen der Primer. Graue Markierung: Position der Sonde. Der SNP ist hier fett dargestellt.	45
Abbildung 2.4: Screenshot eines Fluoreszenzmusters einer Typisierung mit dem TaqMan.	46

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Beispiele für Glutaminlösungen zur Infusion bei erhöhtem Glutaminbedarf.	10
Tabelle 1.2: Klassifikation der Zytokine nach Funktionen.	19
Tabelle 2.1: Elutionsbedingungen des binären Gradientenelutionssystems zur Analyse von Glutamin. Zur Verwendung kommen zwei vorgemischte Methanol-Acetatpuffer. I PSI = 6894,76 Pa.	36
Tabelle 2.2: Primer und Sonden für die Typisierung der Polymorphismen IL-2 und TNF- α .	47
Tabelle 3.1: Probandencharakteristika.	49
Tabelle 3.2: IL-2 Freisetzung mit und ohne Glutaminsupplementierung im Vollblut nach Stimulation mit PMA und Ionomycin.	50
Tabelle 3.3: Verteilung von IL-2 Genotypen in der Studienpopulation in Relation zur IL-2 Freisetzung im Vollblut nach Stimulation mit PMA und Ionomycin ohne Glutaminsupplementierung.	51
Tabelle 3.4: IL-2 Freisetzung im Vollblut nach Stimulation mit PMA und Ionomycin in Relation zu IL-2 Genotypen ohne Glutaminsupplementierung und die Veränderung nach Glutamingabe.	52
Tabelle 3.5: TNF- α Freisetzung mit und ohne Glutaminsupplementierung im Vollblut nach Stimulation mit PMA und Ionomycin.	54
Tabelle 3.6: Verteilung von TNF- α Genotypen in der Studienpopulation in Relation zur TNF- α Freisetzung im Vollblut nach Stimulation mit PMA und Ionomycin ohne Glutaminsupplementierung.	55
Tabelle 3.7: TNF- α Freisetzung im Vollblut nach Stimulation mit PMA und Ionomycin in Relation zu TNF- α Genotypen ohne Glutaminsupplementierung und die Veränderung nach Glutamingabe.	56
Tabelle 4.1: IL-2 und TNF- α Konzentrationen nach achtstündiger Stimulation mit PMA und Ionomycin.	66
Tabelle 4.2: Allelfrequenzen verschiedener Studien für den IL-2-330 SNP.	74
Tabelle 4.3: Allelfrequenzen verschiedener Studien für den TNF- α -308 SNP.	74

10. Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

11. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

PD Dr. med. Jörg Engel für die Überlassung des Themas, für die Möglichkeit zur wissenschaftlichen Mitarbeit in der Klinik für Anaesthesiologie, Intensivmedizin & Schmerztherapie und für seine Unterstützung in sämtlicher Hinsicht.

Dr. med. Katja Weismüller für ihre kompetente und freundliche Betreuung.

Dr. med. Simon Little für die Hilfe bei der Lösung schwieriger Probleme.

Frau Gabriele Haley und Prof. G. Bein aus dem Institut für Immunologie, ohne deren Hilfe ich fast das Handtuch geschmissen hätte.

Ann-Katrin Kleinhenz und Dr. med. Antonio Krüger für ihre spontane und überaus kollegiale Hilfsbereitschaft.

Den Probanden für ihre Bereitschaft zur Teilnahme an dieser Studie.

12. Curriculum Vitae

Thorben Müller, Arzt, 27 Jahre alt
geboren am 14.01.1981 in Flensburg

Schule

1987 - 1991	Grundschule Langballig
1991 - 2000	Kurt-Tucholsky-Schule Flensburg
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

2001 - November 2007	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
April 2003	Physikum
November 2007	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung Approbation als Arzt

Beruf

seit Februar 2008	Assistenzarzt in der Abteilung für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Universitätsklinikum Gießen-Marburg GmbH, Standort Marburg
-------------------	--