

BIOforum

FORSCHUNG UND ENTWICKLUNG



20. Jahrgang
DEZEMBER

12/97

Biotechnica '97

Das vorhandene Potential
nicht ausgeschöpft

ADS-Anwendertreffen

Wie läßt sich die Aufbereitung
biologischer Proben optimieren und
automatisieren?

Zytokompatibilität

Zellkulturen stellen eine Alternative zu
Tierversuchen dar

Flüssig-Festphasenextraktion

On-line-Verfahren zur Bestimmung von
Arzneistoffen

Zellbiologie

Quantitative und qualitative
Bestimmung der Apoptose

Streßprotein IgE

Eines der ersten Warnsignale für eine
Fehlfunktion im Körper?

Titelstory

Highlights der modernen Bilddokumen-
tation präsentiert von Mitsubishi Electric

GIT VERLAG



Dr. Reinhold Kiehl
Diplomarbeit im Max-Planck-
Institut für Medizinische
Forschung, Heidelberg, dort
1976 Promotion.
Seit 1995 Geschäftsführer
der Reinhold Kiehl Labor- und
Forschungs GmbH

Labor- und Forschungs GmbH
Institute for Molecular
Medicine/Biology
Salitterweg 1
D-93437 Furth im Wald

Regulation der IgE-Synthese, Proliferation und Entwicklung von Aids

Die Regulation der IgE-Synthese durch verschiedene Faktoren, eingeschlossen gIFN und Cytokine, ist ein hoch komplexes Stoffwechselgeschehen, so daß man sich die Konsequenz einer Mißregulierung, z. B. Entzündungsreaktionen bei der allergischen Auslösung von Neurodermitis, bisher schwer vorstellen konnte. Resultate zur Schwefelchemie von lebenden Zellen führen jetzt zu einem besseren Einblick in das molekulare Geschehen, das mit Änderungen der IgE-Konzentration bei Patienten einhergeht: Das Streßprotein IgE ist vermutlich eines der ersten Warnsignale für eine Fehlfunktion im Körper.

The regulation of IgE synthesis by various factors, including gIFN and cytokines, is a highly complex event and their consequences on inflammation were until now difficult to imagine. Earlier results concerning the sulfur chemistry in the living cell are now able to lead into a more open and detailed picture of the molecular events connected with alterations in the IgE-levels of living matters and their influence on inflammation. Then, ancient stress protein IgE is concluded to be an early warning signal for our body. It is connected to some wide spread immune diseases like atopic eczema/allergy, leukemia and Aids.

Einleitung

Die wichtigsten Faktoren für die direkte Regulation der IgE-Synthese in Zellkultursystemen sind gIFN und Il-4 [1, 2]. Diese Tatsache konnte jedoch an Atopischen-Ekzem-Patienten, d. h. in vivo, bis jetzt nicht bestätigt werden (unpublizierte Erfahrungswerte). Deshalb wurde die Regulation der IgE-Synthese direkt an den Blutproben von diesen Patienten untersucht. Die Resultate mit dem dabei entwickelten „in vivo assay“-System wurden inzwischen eingehend diskutiert [3-10].

Ergebnisse klinischer Studien

Patienten und Methoden: Die beteiligten Patienten waren gut charakterisiert und für mindestens einen Monat ohne Steroid- oder Antihistaminikabehandlung.

Die Messungen zur „in vivo“-IgE-Regulation wurden folgendermaßen durchgeführt: Patienten mit einem Gesamt-IgE-Wert von ungefähr 1.000 bis 2.000 U/ml gaben zu Beginn ihres Klinikaufenthaltes ihr Einverständnis für die Teilnahme an unserer Stu-

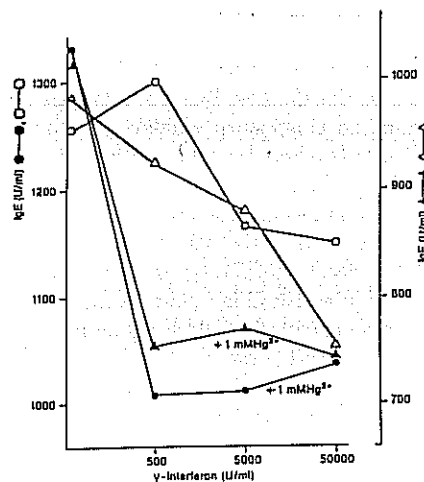


Abb. 1: Konzentrationsabhängige Variation der IgE-Synthese durch gIFN in der Abwesenheit oder Gegenwart von Hg²⁺

die. Heparin-Venenblut wurde um 9 Uhr morgens abgenommen und sofort weiter verarbeitet. 1-ml-Proben wurden unter Schütteln bei 37 °C für die entsprechenden Zeitintervalle (im standardisierten „in vivo

assay“ für 1/2 Stunde) inkubiert, die Reaktionen durch Zentrifugen gestoppt und der resultierende Überstand für die Messung des Gesamt-IgE benutzt. Ein möglicher Einfluß der benutzten Verbindungen/Arzneimittel auf das Assay-System selbst wurde nicht gefunden. Dieses wurde getestet mit entsprechenden Kontrollen (standardisierte IgE-Proben). Es wurden mindestens zwei identische Experimente pro Blutprobe bei einem Minimum von zwei verschiedenen Patienten durchgeführt, und alle Messungen wurden doppelt ausgeführt. Der Mittelwert der Standardabweichung lag zwischen 2 und 5 Prozent.

Material: Gentechnisch hergestelltes gIFN und Il-4 waren Geschenke von Bender (Wien) sowie IC-Chemikalien (Ismanning).

KEYWORDS

Keywords: X-Interferon, Cytokine, Immune Erkrankungen, Metall-Protease

x-interferon, cytokines, immune diseases, metalloprotease

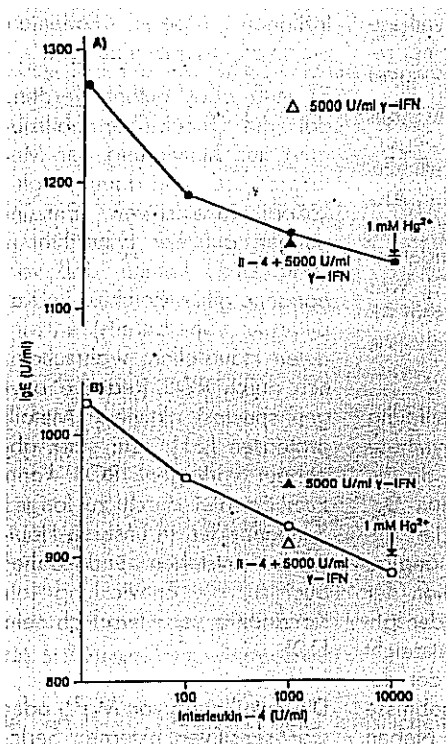


Abb. 2 (A und B): Konzentrationsabhängige Inhibierung der IgE-Synthese durch Interleukin-4 in Blutproben von 2 verschiedenen Patienten. Die standardisierte Hg²⁺-Sensitivität sowie zusätzliche g-IFN-Werte sind zum Vergleich ebenfalls angegeben.

Resultate: Die im zirkulierenden Blut gefundenen Konzentrationen/Aktivitäten der Leukozyten-Metallproteasen-Kollagenase und Gelatinase sowie die Konzentration von Lactoferrin zeigen bei den Patienten im Vergleich zu gesunden Personen keine pathologischen Veränderungen. Im Gegensatz dazu zeigen betroffene Hautareale, d.h. Areale unter akuter Entzündung, signifikant erhöhte Werte und gIFN-Moleküle werden durch die Metallproteasen (hauptsächlich durch die Leukozyten-Kolla-

genase) unter diesen Bedingungen beträchtlich abgebaut. 500 µM bis 1 mM des Metallproteasenaktivators Quecksilber (HgCl₂) ändern die Blut-IgE-Konzentrationen. Das Ausmaß der Änderungen ist von Patient zu Patient verschieden. Standardisierte Messungen (1 mM Hg²⁺, 37 °C, 30 Minuten Reaktionszeit) zeigen Differenzen bis zu 50%. 10 mM des Metallproteaseninhibitors EDTA steigern die IgE-Konzentration. 40 µg/ml des Serinproteaseninhibitors APMSF (Boehringer Mannheim) selbst sind ohne Einfluß auf die IgE-Konzentrationen, verhindern aber nichtsdestotrotz ein Ansteigen der IgE-Konzentration, normalerweise verursacht durch 10 mM EDTA.

10 bis 100 µg/ml Cycloheximid (Sigma, Deisenhofen), ein Inhibitor der Proteinsynthese, verringert die IgE-Konzentrationen.

Die mit Quecksilber erhaltenen Resultate suggerieren die Beteiligung irgendeiner Art von Thiol-Redox-Gleichgewicht auf die IgE-Konzentrationen [11], weshalb wir weitere Thiolgruppenreagenzien testeten: N-äthylmaleimid (NEM, Sigma, Deisenhofen) zeigte nur einen geringen Einfluß, im Kontrast dazu senkte 1 mM Diamid (Sigma, Deisenhofen) den IgE-Level sogar unter den durch 1 mM Hg²⁺ erhaltenen Level.

500 U/ml gIFN, eine von gIFN normalerweise bei gesunden Personen vorhandene Konzentration (Normalwert: 50 bis 500 U/ml) [12] sind fast ohne Effekt. Erst 100 mal höhere Konzentrationen von gIFN, für die Patienten gefährlich, reduzieren die IgE-Konzentration signifikant.

Dieses Verhalten ändert sich dramatisch durch die Addition von 1 mM Hg²⁺: 500 U/ml gIFN sind jetzt ausreichend, um die IgE-Level signifikant zu reduzieren (Abb.

1). 1 mM Zn²⁺ im Kontrast zu Hg²⁺ ist ohne Wirkung. Erste Versuche – auf der Suche nach einem Ersatz des toxischen Hg²⁺ – mit 1 mM Glutathion (reduziert oder oxidiert) waren relativ erfolglos.

Titrationen der Patientenblutproben mit steigenden Konzentrationen an IL-4 zeigen deutlich, daß dieses Cytokin die IgE-Level wirkungsvoll – schon unter physiologischen Konzentrationen (1.000 U/ml) im Gegensatz zu gIFN – verringert (Abb. 2).

UV-VIS-Messungen (Zweiwellenlängenmethode) an lysierten Blutproben von Atopischen-Ekzem-Patienten zeigen komplexe Spektren zwischen den Wellenlängen von 550 bis 575 nm. Die Peaks zwischen 560 und 568 nm (Abb. 3) scheinen gegenüber O₂, NADPH und gIFN sensitiv zu sein. Neben den Cytochromen der Plasmamembran NADPH-Oxidase [13] sind die mitochondrialen Atmungsketten-Cytochrome [14] die am wahrscheinlichsten reagierenden Komponenten.

Regulation der IgE-Synthese

Es ist klar, daß die Regulation der IgE-Synthese ein sehr komplexes Stoffwechselgeschehen unter Beteiligung sehr vieler verschiedener Faktoren darstellt, wobei die wichtigsten Faktoren in Zellsystems – wie anfangs erwähnt – gIFN und IL-4 sind.

Regulationsfaktor Interferon: Über den Regulationsfaktor gIFN existiert ein umfangreiches verwirrendes Literaturangebot [15–19]. Es sollte hier vor allem betont werden, daß gIFN selbst kein Cytokin (wie fälschlicherweise oft geschrieben) ist, sondern im Wechselspiel mit Wachstumsfaktor, Erythropoetin und den Cytokinen das Zellwachstum und die Differenzierung reguliert [20].

Table 1: Heavy Metals in Blood and Urine, Me-proteases and Lactoferrin in Serum and Plasma of Atopic Eczema Patients and Healthy Control Persons

	Heavy metals blood			urina/DMPS ¹			dental amalgam fillings
	Hg, µg/l	Cu, mg/l	Zn, µg/dl	Hg, µg/l	Cu, µg/l	Zn, µg/l	
Control persons (n)	0.8 ± 0.5 (19)	1.18 ± 0.3 (19)	88 ± 11 (19)	10.1 ± 3.1 (7)	232 ± 102 (7)	660 ± 286 (7)	7 ± 5 (19)
Atopic eczema patients (n)	1.2 ± 0.9 (26)	1.35 ± 0.4 (26)	101 ± 20 (26)	29.6 ± 28.1 (38)	550 ± 430 (38)	2250 ± 2170 (38)	6 ± 5 (26)
Normal value, Daudeker, Moyer	< 0.2 – 3.0	0.8 – 1.55	70 – 127	< 50	< 500	> 2000	0
Significance student t test	NS ²	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	collagenase, ng/ml		gelatinase, ng/ml	lactoferrin, ng/ml			
	serum		serum	serum		heparin-plasma	
Control persons (n)	a) 46 ± 14 (7)	8 ± 7 (7)	1757 ± 761 (7)	204 ± 80 (7)	432 ± 123 (7)	100 ± 67 (7)	
	b) ³ 46 ± 24 (13)	9.2 ± 8 (20)	1721 ± 813 (13)	234 ± 78 (20)	418 ± 232 (13)	84 ± 49 (20)	
Atopic eczema patients (n)	46 ± 34 (6)	10.5 ± 9 (13)	1685 ± 865 (6)	264 ± 77 (13)	404 ± 341 (6)	68 ± 30 (13)	
Significance student t test	NS	NS	NS	NS	NS	NS	

¹ DMPS = dimercaptopropionatesulfonate, ² NS = not significant, ³ control persons plus atopic patients

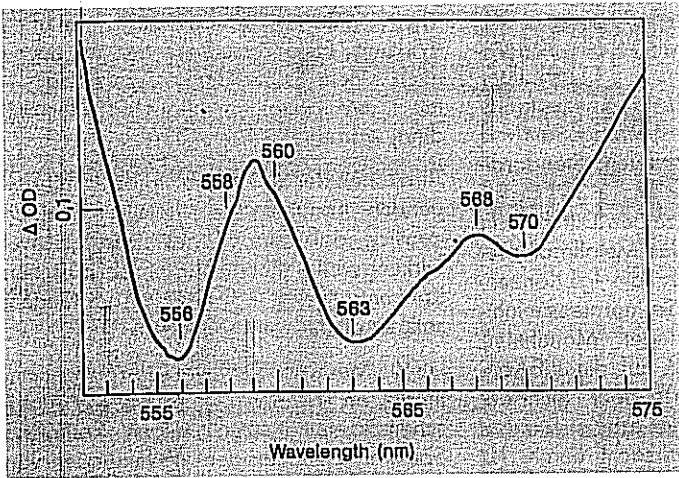


Abb. 3: Zweiwellenlängenspektrum von lysierten Blutproben.

gIFN (100 bis 250 U/ml) blockiert in Zellkultursystemen innerhalb einer Inkubationszeit von 2 bis 9 Tagen eine Il-4 (Unter Sättigung mit 200 bis 300 µg/ml) induzierte IgE-Synthese. Die Synthese von IgG, IgM und IgA wird durch gIFN in der Gegenwart sowie Abwesenheit

von Il-4 nicht beeinflusst. Es konnte weiter gezeigt werden, daß die laufende IgE-Produktion durch Cycloheximid (50 µg/ml) blockiert wird, was beweist, daß die „de novo“ IgE-Synthese gemessen wurde. Es wurde von dieser Forschungsgruppe der Schluß gezogen,

daß eine vermehrte Synthese von Il-4 zusammen mit einer reduzierten Produktion von gIFN zum hohen Level an IgE beiträgt. Versuche, die Gegenwart von Il-4 in diesen Zellkulturen sowie in den von den Atopischen-Ekzem-Patienten gespendeten Blutzellen nachzuweisen, schlugen fehl [2], was in Anbetracht der in diesem Artikel gezeigten Ergebnisse leicht verständlich wird.

Die physiologische Beteiligung von gIFN an der IgE-Synthese wurde in Frage gestellt, da die in Zellkulturen erhaltenen Daten suggerieren, daß die Signale für die gIFN-unabhängige Il-4- und CD40-Stimulation der IgE-Synthese dem Weg der IgE-Produktion „in vivo“ entspricht [17]. Die Summierung der dabei gewonnenen Ergebnisse macht aber eines klar: Neben der Beteiligung an allergischen Erkrankungen ist gIFN an verschiedenen Krankheiten beteiligt; wie schon erwähnt, einschließlich der Entwicklung von Aids [18].

trationen unserer Patienten nicht verantwortlich zu sein.

Es muß aber betont werden, daß die Quecksilbermobilisierung zur Aktivierung der Metallproteasen und damit zu glukokortikoid-sensitiven Entzündungen auf der Haut führen kann. Dazu kommt, daß vorhandene gIFN-Moleküle im Kapillarblut von (bereits) entzündeten Hautstellen, wahrscheinlich durch ROS (reactive oxygen species) aktivierte Metallproteasen [21], sehr stark abgebaut vorliegen. ROS kann zum Beispiel durch zu langes Sonnenbaden in unseren Hautzellen entstehen und daher auch für die Entwicklung von Karzinoma verantwortlich sein [10].

Die Beteiligung von Mg²⁺- oder Ca²⁺-sensitiven externen Serinresten am Signalübertragungsweg, der zur Variation des IgE-levels führt, wird durch die APMSF/EDTA-Titrations bewiesen.

Die Reduktion der IgE-Konzentrationen durch Cycloheximid zeigt, daß die im Blut der Patienten laufende IgE-Synthese in den B-Zellen blockiert wird und demonstriert damit eindrucksvoll unserer Messung der „de novo“-IgE-Synthese.

Dithiol/Disulfid-Austausch, Redoxzustand: Die Beteiligung eines Dithiol/Disulfid-Austausch-Mechanismus/Redoxzustandes in der Regulation der IgE-Synthese sollte durch die Titrations mit Hg²⁺, NEM, Diamid, gIFN (± Hg²⁺, ± Zn²⁺) und Il-4 bewiesen sein. Wichtig ist, speziell noch einmal darauf hinzuweisen, daß Il-4 antagonistisch zu gIFN wirkt, und zwar in Blutproben und Zellkultursystemen in entgegengesetzte Richtungen!

Die Wechselwirkung von Kortformation mit Redoxzustand bei schon vorhandener gIFN-Konzentration in den Patienten bestimmt die stark variierenden IgE-Werte in den Blutproben von eben diesen Patienten bei Addition von Hg²⁺ (Abb. 4). Wir benutzen „in vivo“-Bedingungen für unsere Experimen-

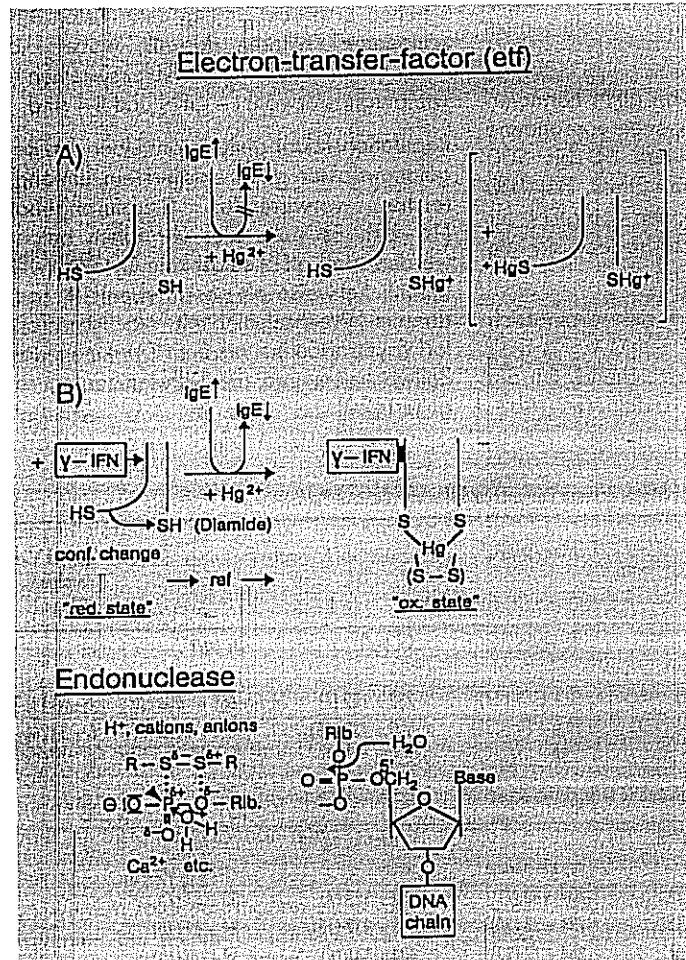


Abb. 4: Reduzierter und oxidierter Zustand des Elektronen-Transport-Faktors (etf). Möglicher Mechanismus des DNA-Abbaus durch die Endonuclease.

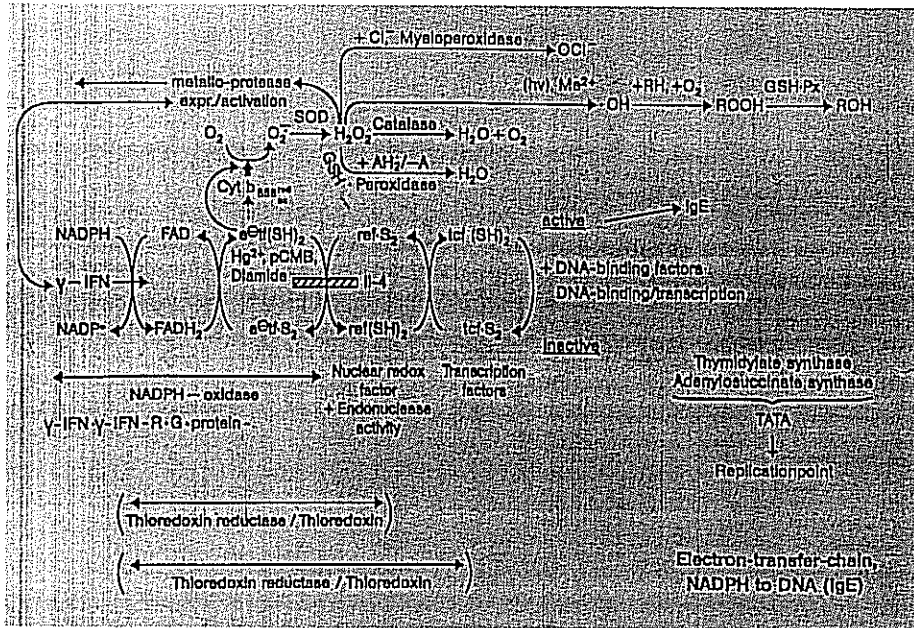


Abb. 5: Elektronen-Transport-Kette, NADPH bis zur DNA (IgE).

te, während Zellkulturen unter künstlichen Bedingungen mit der Hilfe von mitogenstimulierten B-Zell-Proliferationen wachsen – ein Fakt, der die verschiedenen Resultate, gewonnen in diesen unterschiedlichen Systemen, zu erklären vermag. Die fast ohne

Wirkung „verpuffenden“ Glutathion-Titrations demonstrieren zudem, daß die beteiligten Thiolgruppen sich innerhalb der IgE synthetisierenden B-Zellen befinden, und die weiteren Titrations widerlegen eine direkte Beteiligung von Glutathion an

IgE-Synthese und Proliferation [7, 10, 22]. Der unbekannte Elektronen-Transport-Faktor (eif) (Abb. 4) ist höchstwahrscheinlich ein Eisen-Schwefel (FeS)-Protein (Rieske?, Abb. 6) [10, 23–25] und auch in Relation zu BSE, Creutzfeld-Jacob oder ähnlicher Erkrankungen zu sehen [26].

gIFN reguliert den Elektronentransport: Die beteiligten Elemente an dem Signalübertragungsweg von gIFN oder Il-4 bis zur IgE-Synthese sind höchstwahrscheinlich deren Rezeptoren, (ein) cytosolische(s) G-Protein(e), NADPH-Oxidase/Elektronen-Transport-Faktor (eif), Redoxfaktor (ref, Nukleare Transkriptionsfaktoren sowie Endonuklease (Abb. 5+6)). Die total reduzierte Elektronentransportkette, NADPH zu DNA (IgE), zeigt eine hohe Syntheserate für IgE-Antikörper (eine niedere für O₂-Radikale). Im Gegensatz dazu ist eine total oxidierte Kette nicht in der Lage, IgE-Moleküle zu synthetisieren (aber O₂-) und, das Risiko für mitogenstimulierte Proliferationen (Leukämie) ist extrem hoch.

Im Kontrast und Einklang zu den Berichten [20, 27, 28] ist der oxidierte Zustand von ref-1 ein Disulfid und verantwortlich für die katalytische Endonuklease-Aktivität. gIFN

Centricon® Plus
Zentrifugen-Filtereinheiten

**Der schnellste Weg
von
hier nach hier ...**

**führt
hier
durch**

Hoher Durchsatz mit hoher Rückgewinnung

Mit den neuen Centricon Plus-80 Zentrifugen-Filtereinheiten lassen sich 80 ml einer Proteidlösung auf 300 µl in weniger als 30 Minuten und mit einer Rückgewinnung von 95%* aufkonzentrieren. Diese neuartige Einheit verbindet entweder eine „high-flow“ Blomax™ Membran oder eine YM Membran für geringe Proteinbindung mit der Möglichkeit eines Umkehrzentrifugationsschrittes. Mit dieser Einheit können Sie in weniger als 1 Stunde das 3-fache (240 ml) des Probevolumens filtrieren und dabei Konzentrationsfaktoren von 800x erzielen. Für kleinere Probevolumina bietet die neue Centricon Plus-20 Zentrifugen-Filtereinheit die gleiche Leistungsfähigkeit.

* Blomax-B, 0,1 mg/ml BSA

Ihr erster Schritt bei der Aufreinigung

Ist die Ammoniumsulfat Präzipitation Ihr erster Schritt bei der Proteinaufreinigung? Dann kann die Centricon Plus Filtereinheit durch Vorkonzentrieren der Probe diesen Arbeitsschritt beschleunigen und optimieren – oder ihn komplett ersetzen. Bei der Ultrafiltration gelangen Salze durch die Membran hindurch, d.h. Reinigung und Aufkonzentrierung erfolgen in gleichem Maße. Wird die Probe mit mehr Pufferlösung versehen, kann eine vollständige Dialyse, die mehrere Stunden oder sogar Tage dauern könnte, ersetzt werden. Und, im Gegensatz zu Rührzellen, müssen Centricon Plus Einheiten weder zusammengebaut noch gereinigt werden.

Dazu kommt noch die technische Unterstützung, die Millipore bietet. Wir empfehlen Ihnen gerne den richtigen Filter und das passende Protokoll.

MILLIPORE

Millipore GmbH, Hauptstr. 87, 65760 Eschborn
Telefon: 0 61 96 / 4 94-0, Fax: 0 61 96 / 4 94-163
e-mail: Info&Bestellungen@millipore.com
http://www.millipore.com/amicon

amicon
MILLIPORE

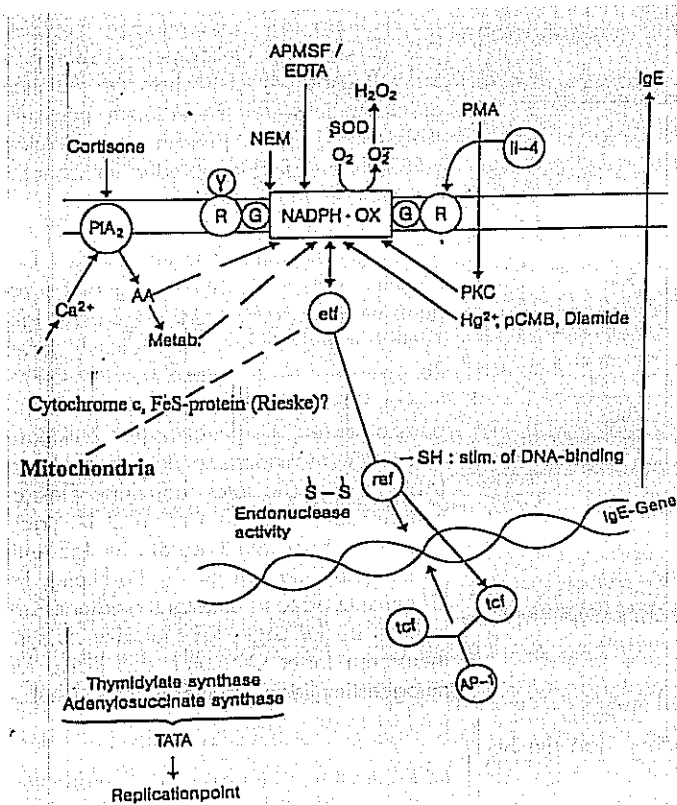


Abb. 6: Regulation der IgE-Synthese. g = gIFN.

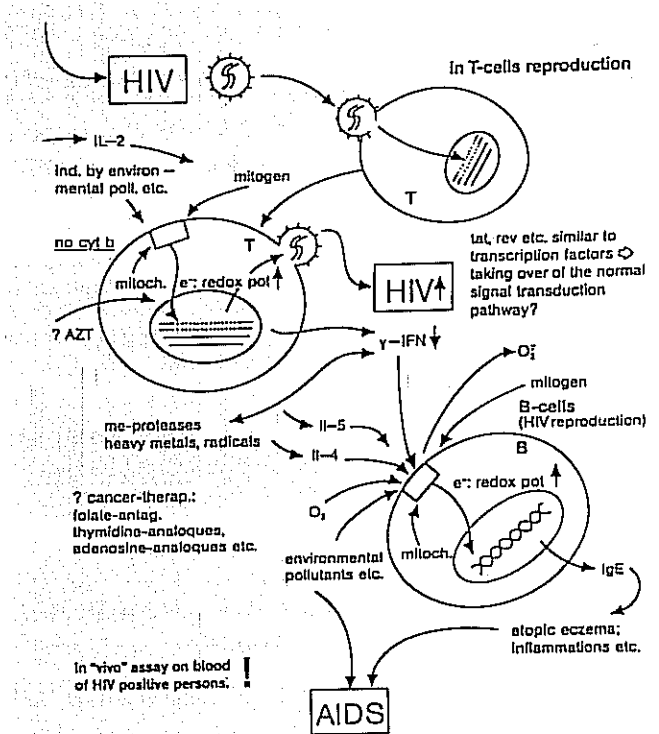
hat einen bifunktionalen Effekt an der Proteinsynthese. Die IgE-Synthese wird stimuliert oder inhibiert in Abhängigkeit von frischen Blutproben oder Zellkulturen beziehungsweise Inkubationszeiten. Translationsinhibierende Wege werden aktiviert durch gIFN-Behandlung der Zellen. Dabei werden inaktive Endonucleasen in aktive Enzyme, die vermutlich katalytische Disulfide tragen, umgewandelt. gIFN sollte dann normalerweise während kurzer Zeitintervalle Redoxsignale übertragen (frische Blutproben), während innerhalb von längeren Intervallen (Zellkulturen) der oxidierte Redoxfaktor die Translationsaktivitäten bestimmt [6].

Unspezifisches IgE ist ein Streßprotein: Die Adaption von Zellen an Streßbedingungen schließt die gIFN- und IL-4-kontrollierte Synthese von IgE-Antikörpern ein. Umweltschadstoffe (Formaldehyd, Sulfid/SO₂, Isocyanate und Anhydride), die verantwortlich gemacht werden für das Auftreten von Atopischem Ekzem [29], sind in der Lage, irreversibel mit dem

beteiligten essentiellen Dithiol/Disulfid-Redoxgleichgewicht zu reagieren. CO durch Bindung an die NADPH-Oxidase [30], verhindert die Reduktion von Sauerstoff und verschiebt dabei die Elektronen-Transportkette in den reduzierten Zustand mit erhöhter Wahrscheinlichkeit zur IgE-Synthese.

B-Zellen haben einen immensen Bedarf an Energie. Ihr Treibstoff ist dabei hauptsächlich Glutamin [31] und der Prozeß der Aktivierung und Regulation ist an eine laufende mitochondriale Energieproduktion gekoppelt [32]. Alle Verbindungen, die diese Energiebildung beeinflussen [10, 20], eingeschlossen nucleotide analoge, verändern dann zwangsläufig auch den IgE-Level. Störungen der Haut- und Darmflora (C. albicans), Essen (Zucker) genauso wie psychischer Streß (Noradrenalin), sind die wichtigsten auslösenden Faktoren von allergischen Symptomen [33-39].

Noch einmal ist zu betonen: Die Gesamt- (unspezifische plus spezifische) IgE-Konzentrationen sind normalerweise 10²



The most probable mechanism for the pathogenesis of AIDS.

Abb. 7: Der wahrscheinlichste Mechanismus für die Pathogenese von Aids.

bis 10³mal höher als die gemessenen spezifischen allein. Das erste Auftreten von spezifischen IgE-Antikörpern könnte dann rein zufällig sein und erinnert an Autoimmunerkrankungen. Die Pathogenese des Atopischen Ekzems und von Leukämie (Proliferation) sind in Bezug auf die Entwicklung von Aids zu sehen (Abb. 7).

Klinische Besserung der Hauterscheinungen: Die bei unseren Patienten mit Beschwerdefreiheit verbundene klinische Besserung beruht zum einen auf der intensiven antibakteriellen und antimykotischen Sanierung der Haut- und Darmherde mit anschließender Pflege der Dermis mit Harnstoff- und Vitamin-sowie zinkhaltigen Externa, zum anderen auf der Ernährung mit hypoallergener und individuell angepaßter Rotationsdiät frei von allergieverursachenden Stoffen [38, 39].

Notwendigkeit einer neuen Strategie

Die Strategie für die Diagnose und Therapie von Atopischem Ekzem, Leukämie sowie Aids

sollte folgendermaßen aussehen:

1. „in vivo“-Titration des beteiligten Redoxgleichgewichtes mit Hg₂⁺, gIFN und IL-4,
2. Messung der aktiven beteiligten gIFN und Cytokin (IL-4, IL-2 inkl.) Konzentrationen im Plasma mit entsprechenden Assays (welche entwickelt werden müssen),
3. Supplementierung mit den individuellen richtigen Konzentrationen von aktivem gIFN sowie Cytokinen,
4. Vermeidung von Umweltschadstoffen und, falls nicht möglich, Änderung des beteiligten Redoxgleichgewichtes mit entsprechenden Pharmaka (welche entwickelt werden müssen).

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. H. Tschesche, Prof. E. Siess sowie Frau C. Cavanna und Frau E. Dirschlerl.

Literatur beim Autor

Weitere Informationen über Kenn-Nr. 762

Literatur

[1] Vercelli, D., Jubava, H.H. und Geha, R.S. (1989): A two signal model for the induction of IgE synthesis in humans. Pharmacia Allergy Research Foundation, Award Book, Johansson S.G.O. Ed. 13-17.

[2] Rousset, F., Pene, J., Chretien, J., Briere, F., Souillet, G. und de Vries, J.E. (1989): The role of IL-4, gIFN and ~~IFN~~ in the regulation of IgE synthesis by peripheral blood lymphocytes of atopic and allergic children in vitro. Pharmacia Allergy Research Foundation, Award Book, Johansson, S.G.O., E. 25-33.

[3] Kiehl, R. (1994): IgE-Regulation by Dithiol/Disulfide Interchange: In „vivo“ study on blood of atopic eczema patients superior to cell culture systems. 13. Vortrags- tagung der GDCh, Fachgruppe Biochemie, Darmstadt, 16.-18. März 1994, Abstrakt p. 2,6 und Analytica Conference, München, Abstrakt book p. 195-196.

[4] Kiehl, R. (1994): Sulfur associated redox reactions, involvement in signal transduction and phosphate transfer - relevance for pathogenesis of diseases. Biol. Chem. H.-S. 275, S. 61.

[5] Kiehl, R. (1994): In „vivo“ study on blood of humans reliable for pharmacologists and other applicants: spare of animals and cell cultures. BIOTEC-MEDICA, Düsseldorf, Nov. 16 - 19, Abstrakt P 846.

[6] Kiehl, R. (1994): Total IgE as a monitoring/response tool to therapy. Int. Alk-Ciba Corning Joint Symposium: Advances in „in vitro Allergy Diagnosis“, Benzheim, Oct.28-29, Manuskript plus Vortrag.

[7] Kiehl, R. (1995): Glutathione: The essential factor for live functions. 4th Int. Congreß on Amino Acids, Vienna, August 7-11, Amino Acids 9(1), 20.

[8] Kiehl, R. (1995): IgE-Regulation, Proliferation and development of AIDS. Int. Conf. on New Appl. of Emerg. Mol. Diagn. for Infect. Diseases, Cambridge Healthtech Institute, London, June 26-27, Abstrakt book, P 11.

[9] Kiehl, R. (1995): IgE-Regulation, Proliferation and development of AIDS. A) Total IgE as monitoring/response tool to therapy. WASOG Joint Meeting, Kensington Town Hall, London, Oct. 15-20, Proceedings p.54, P/119.

[10] Kiehl, R. (1996): IgE-regulation, proliferation and development of AIDS: gIFN, interleukins, reactive oxygen species and total IgE as monitoring/response tools to therapy. Analytica Conference, München, Abstrakt book, P 144. Habilitationsschrift, Universität Regensburg, Med. Fakultät und Dr. Kiehl Labor und Forschungs GmbH; Regulation der IgE-Synthese und proliferation: stress protein IgE as early warning signal for our body. Clin. and Diagn. Virology, angenommen zur Publikation.

[11] Stiggall, D.L., Galante, J.M., Kiehl, R. und Hafeji, J. (1979): Involvement of a dithiol-containing protein in mitochondrial energy linked functions and its relation to coupling factor B and F₂. Biochim. Bio- und BSACI-Annual Meeting, Manchester, Sept 4-6, Book of Abstr. P/55

phys. Acta 196, 638-644.

[12] Horowitz, O. (1986): Methods in Enzymatic Analysis, Vol. 9, Proteins and Peptides: 239-247, Ed. Bergmeyer. H. U., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

[13] Foroozan, R., Ruedi, J.M. und Babior, B.M. (1992): The reduction of cytochrome b 558 and the activity of the respiratory burst oxidase from human neutrophils. J.Biol. Chem. 267, 24400-24407.

[14] Hafeji, J. (1985): The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. Ann. Review Biochem. 54, 1015-1069.

[15] Meager, A. (1990): Cytokines. Ed. Meager, A., Open University Press, Milton Keynes.

[16] Osterhoff, B. (1995): IFN γ -Elisa für die Cytokinforschung. Serva News, Fachinformation der Serva Heidelberg, Ausgabe 5, 17-19.

[17] Zhang, K., Clark, E.A. und Saxon, A. (1991): CD40 stimulation provides an IL-4-independent and IL-4-dependent differentiation signal directly to human B cells for IgE production. J. of Immunology 146, 1836-1842.

[18] Kirkpatrick, C.H. (1989): Biological response modifiers. Interferons, interleukins, and transfer factor. Ann. Allergy 62, 170-176.

[19] Unemori, E. N., Bair, M. J., Bauer, E.A. und Amento, E.P. (1991): Stromelysin expression regulates collagenase activation in human fibroblasts. J. Biol. Chem. 266, 23477-23482.

[20] Kiehl, R. (1996): Glutathione, the essential factor for mitochondrial energy linked functions. Habilitationsschrift, Universität Regensburg, Med. Fakultät und Dr. Kiehl Labor und Forschungs GmbH; sowie J.Mol.Biol., eingereicht.

[21] Palmgren, M.S., Shazo, R.D., Carter, R.M., Zimny, M.L. und Shah, S.V. (1992): Mechanism of neutrophil damage to human alveolar extracellular matrix: The role of serine and metalloproteases. J. of Allergy and Clin. Immun. 89, 905-915.

[22] Meister, A. (1994): Glutathione, ascorbate and cellular protection, Cancer research 54 (7 suppl), 1969s-1975s.

[23] Xanthoudakis, S., Miao, G., Wung, F., Pan, Y.-C.E. und Curran, T. (1992): Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. The EMBO Journal 11, 3323-3335.

[24] Storz, G., Tartaglia, L.A. und Ames, B.V. (1990): Transcriptional regulator of oxidative stress - inducible genes: direct activation by oxidation. Science 248, 189-194.

[25] Behrendt, H. (1989): Grundlagen der Allergie und mögliche Angriffspunkte für Umweltchemikalien. Allergologie 12, 95-99.

[26] Segal, A.W. (1989): The electron transport chain of the microbicidal oxidase of phagocytic cells and its involvement in the molecular pathology of chronic granulomatous disease. J.Clin. Invest. 83, 1785-1793.

[27] Ardawi, M.S.M. und Newsholme, E.A. (1985): Metabolism in lymphocytes and its importance in the immune response. Essays in Biochem. 21, 1-44.

[28] Cohen, H.J. und Chovanec, M.E. (1978): Superoxide production by digitonin-stimulated Guinea pig granulocytes. The effects of N-ethyl maleimide, divalent cations and glycolytic and mitochondrial inhibitors of the activation of the superoxide generating system. J.Clin. Invest. 61, 1088-1096.

[29] Ionescu, G., Kiehl, R., Wichmann-Kunz, F. und Leimbeck, R. (1990): Immunobiological significance of fungal and bacterial infections in atopic eczema. J. Adv. Med. 3 (1), 47-58.

[30] Ionescu, G., Kiehl, R., Ona, L. und Schuler, R. (1990): Abnormal fecal microflora and malabsorption phenomena in atopic eczema patients. J. Adv. Med. 3 (2), 71-91.

[31] Ionescu, G., Kiehl, R. und Ona, M. (1991): Immunologische Relevanz der Nahrung in der Pathogenese der Neurodermitis in Neurodermitis und Vollwerternährung. Karl F. Haug Verlag, Heidelberg, S. 60-74.

[32] Kiehl, R. und Ionescu, G. (1991): Sympathetic activity and immune response in atopic eczema. Ann. Meeting of the Eur. Ac. of Allergy and Clin. Immun. Zürich, Schweiz. med. Wschr., Suppl. 40/II, p. 61, P 2214.

[33] Kiehl, R., Ionescu, G. und Müller-Steinwachs, J. (1992): Autogenic training and norepinephrine levels in atopic eczema, allergic asthma and psoriasis. XVth Eur. Congr. of Allerg. und Clin. Immun., Paris. Allergy Suppl. 47 (12), p. 59.

[34] Kiehl, R., Ionescu, G., Manuel, Ph., Stern, L.P., Niemann, A. und Müller-Steinwachs, J. (1994): Klinische, immun- und lipomodulatorische Effekte einer Behandlung mit ungesättigten Fettsäuren bei atopischer Dermatitis. H+G Zeitschrift für Hautkrankheiten 69, 42-48.

[35] Kiehl, R. und Ionescu, G. (1993): Pathological changes in platelet histamine oxidases in atopic eczema. Mediators of Inflammation 2, 403-406. □

[23] Brandt, U., Yu, L., Yu, C.-A., Trumppower, B.L. (1993): Import of the „Rieske“-Iron-Sulfur protein into Mitochondria. J.Biol.Chem. 268, 8387-8390.

[24] Brandt, U., Yu, L., Yu, C.-A., Trumppower, B.L. (1993): J.Biol.Chem. 269, 12947-12953.

[25] Iwata, S., Ostermeyer, C., Ludwig, B., Michel, H. (1995): Structure of Bacterial cytochrome c oxidase at 2.8 Å resolution. Science 268, 1069-1074.

[26] Wüthrich, B. (1997): Zürich, Struktur des Prion-Proteines