

Aus dem Institut für
Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Molekulare Diagnostik
Standort Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. Harald Renz

des Fachbereichs Medizin
der
Philipps-Universität Marburg

Methodenvergleich zur Messung von Zytokinen im Rahmen großer epidemiologischer Studien

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

von
Martin Bomert
aus Münster



vorgelegt dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg

Marburg 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am 24. September 2013

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. M. Rothmund
Referent: Prof. Dr. med. H. Renz
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. G. Schratt

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Epidemiologie	2
1.2	Die Hygienehypothese	4
1.3	Mechanismen der Allergieentstehung	7
1.3.1	Hypersensibilität vom Typ I	7
1.4	Das TH1- / TH2- Konzept	9
1.4.1	Differenzierung der T-Helfer-Zellen	10
1.4.2	Effektorzytokine	13
1.4.3	regulatorische T-Zellen (T-reg) und T-Helfer-17-Zellen	14
1.5	Toll-like-Rezeptoren und Induktion von Zytokinproduktion <i>in vitro</i>	16
1.6	Die PASTURE- / EFRAIM- Studie	18
1.6.1	Studiendesign	19
1.7	Ziele der Arbeit	20
2	Material und Methoden	23
2.1	Probengewinnung und -stimulation	23
2.1.1	Vorbereitung der Stimuli	23
2.1.2	Probenstimulation	24
2.2	Messung mittels ELISA	25
2.3	Messung mittels Cytometric Bead Array (CBA)	27
2.4	BD FACSArray Bioanalyzer	30
2.5	Versuchsaufbauten und statistische Berechnungen	32
2.5.1	Interne Validierung des CBA	32
2.5.2	Übereinstimmung von CBA und ELISA	32
3	Ergebnisse	35
3.1	NIBSC-Standards	35
3.2	Interne Validierung des CBA	36
3.2.1	Probenverschleppung	36
3.2.2	Kalibrationsstabilität	37
3.2.3	Analytische Sensitivität	40
3.2.4	Funktionelle Sensitivität	41
3.2.5	Präzision	42
3.2.6	Wiederfindung	48
3.2.7	Verdünnungslinearität	50

3.3	Übereinstimmung von CBA und ELISA	53
3.3.1	Regressionsanalyse	54
3.3.2	Bland-Altman-Blots	57
4	Diskussion	60
4.1	Vor- und Nachteile der CBA-Methode	60
4.2	Güte der CBA-Messungen und Vergleich zum ELISA	63
4.3	Vergleich der Messergebnisse CBA - ELISA	66
4.4	Schlussfolgerungen für den Methodenwechsel innerhalb der PASTURE- / EFRAIM - Studie	70
4.5	Ausblick	71
5	Zusammenfassungen	73
5.1	Zusammenfassung	73
5.2	Abstract	74
A	Abkürzungsverzeichnis	I
B	Literaturverzeichnis	III
C	Abbildungsverzeichnis	X
D	Tabellenverzeichnis	XI
E	Liste der Materialien	XII
F	Verzeichnis akademischer Lehrer	XVII
G	Danksagungen	XVIII

1 Einleitung

Allergien stellen ein wachsendes Problem unserer Gesellschaft dar, denn die Prävalenz der allergischen Erkrankungen steigt weltweit an. Auch wenn die Allergien sich auf vielfältige Weise manifestieren, so liegt ihnen jedoch eine gemeinsame Ursache zugrunde: eine Hypersensibilität gegen eigentlich harmlose Umweltstoffe (Allergene). Die molekularen und zellulären Mechanismen der Erkrankungsmanifestation sind recht gut verstanden, aber die eigentlichen Ursachen, ihre jeweilige Gewichtung und die steigende Prävalenz sind noch weitestgehend unbekannt und Gegenstand intensiver Forschung (VON MUTIUS und SCHMID, 2006).

In allergischen Erkrankungen manifestiert sich eine atopische Sensibilisierung. Atopisch veranlagte Personen haben eine angeborene Neigung, IgE-Antikörper gegen Allergene zu bilden, was dann zu den jeweiligen Symptomen führt. Zu ihnen zählen lokale Reaktionen wie Neurodermitis, die allergische Rhinokonjunktivitis, das allergische Asthma bronchiale, allergisch bedingte Ekzeme, Urtikaria, gastrointestinale Beschwerden und systemische allergische Reaktionen wie die Anaphylaxie (LARCHE et al., 2006).

Das allergische (oder auch extrinsische) Asthma bronchiale ist sowohl eine der bekanntesten als auch eine der häufigsten allergischen Erkrankungen. Es ist definiert als chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege. Diese Entzündung wird bei entsprechend veranlagten Personen durch den Kontakt mit Allergenen ausgelöst und führt im Verlauf zu einer Verkrampfung der Bronchialmuskulatur, einer vermehrten Schleimsekretion und Ödembildung. Diese Obstruktion der Atemwege führt dann zu den typischen Symptomen. Diese umfassen anfallsweise Luftnot, pfeifende Atmung, sowie Husten und Engegefühl auf der Brust (LEMANSKE und BUSSE, 2010).

In den meisten Fällen sind die Beschwerden reversibel, bei chronischen Krankheitsverläufen kann es jedoch zu Umbauvorgängen an der Lunge kommen, die zu dauerhaften Funktionseinschränkungen führen.

1 Einleitung

Gesundheitsökonomisch spielen die allergischen Erkrankungen zunehmend eine wichtige Rolle. Für die Vereinigten Staaten wird von ca. 6 Milliarden Dollar jährlicher Behandlungskosten ausgegangen (ANANDAN et al., 2010). Insgesamt betragen die Kosten allergischer Erkrankungen im Jahr 1996 für die Bundesrepublik Deutschland 6,9 Mrd. DM. Der Hauptanteil von rund 74% entfiel auf das allergische Asthma.

Die Kosten, die in der Gesellschaft entstehen, können in direkte und indirekte Kosten unterteilt werden. Die direkten Kosten entstehen durch Verbrauch von Gesundheitsgütern und -leistungen. So betragen 1996 die Gesamtkosten für ambulante und stationäre Versorgung, sowie für Medikamente rund 4,1 Mrd. DM (HOFFMANN, 2000).

Die indirekten Kosten entstehen bei Ressourcenverlust durch Mortalität, Invalidität und Arbeitsunfähigkeit. 99% der 1996 registrierten 5407 Todesfälle aufgrund allergischer Erkrankungen sind auf Asthma zurückzuführen. Durch die hierdurch verlorenen Erwerbstätigkeitsjahre entstanden 1995 indirekte Kosten von rund 417,8 Mio. DM (HOFFMANN, 2000).

Ein weit größeres Ausmaß nehmen die Kosten durch Frühberentung und Arbeitsunfähigkeit ein. Die atopischen Erkrankungen waren 1996 für rund 1% aller Frühberentungen aufgrund verminderter Erwerbstätigkeit verantwortlich. Der finanzielle Gesamtverlust wurde auf rund 1,3 Mrd DM geschätzt. Die aufgrund von Allergien 1995 verlorenen 6,074 Mio. Arbeitstage verursachten Kosten von 984 Mio. DM (HOFFMANN, 2000).

1.1 Epidemiologie

Das Vorkommen von Asthma und Allergien hat in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen (ASHER et al., 2006; JANSON et al., 2001). Geschätzt ein Viertel der Bevölkerung in den industrialisierten Ländern ist von IgE-vermittelter Hypersensitivität betroffen (FLOISTRUP et al., 2006). Für Asthma wurden in Deutschland Inzidenzraten von 1,2% bei 6- bis 8-jährigen und 0,4% bei 8- bis 10-jährigen berichtet. International geht man von einer mittleren Inzidenzrate bei Kindern von 0,8% pro Jahr aus (HOFFMANN, 2000).

In den beiden deutschen Zentren der ISAAC (International Study of Asthma and All-

1 Einleitung

ergies in Childhood) - Studie, Münster und Greifswald, wurde eine Jahresprävalenz asthmatischer Symptome von ca. 8% für die 6- bis 7-jährigen und von knapp 14% für die 13- bis 14-jährigen herausgefunden (BEASLEY et al., 1998). Eine Reihe nationaler Studien bezifferte die Lebenszeitprävalenz für Asthma bei Kindern im Mittel auf 2%, wobei sich ein West-Ost-Gefälle abzeichnet. So beträgt die Lebenszeitprävalenz von Asthma bei Kindern 1,1 bis 4,3% im Osten und 0,9 bis 7,1% im Westen (HOFFMANN, 2000).

Die beiden deutschen Studienzentren der ECRHS (European Community Respiratory Health Survey) - Studie zeigen für Erwachsene im Alter von 20 bis 44 Jahren eine Jahresprävalenz von 2,1 bis 4,4%, an, Asthma zu leiden (HOFFMANN, 2000; JANSON et al., 2001).

Für die allergische Rhinokonjunktivitis schwanken die Prävalenzangaben teils stark. So nimmt die Prävalenz für Heuschnupfen im Laufe der Kindheit und Jugend zu. Bis zum sechsten Lebensjahr schwanken die Angaben zwischen 1 bis 6%, bei den 6-jährigen sind es im Durchschnitt 1,7% (West: 2,0%, Ost: 1,4%). Im Alter von 9 bis 11 Jahren liegen die Angaben zwischen 2 und 14%, im Durchschnitt 5,6% (West: 8,6%, Ost: 2,6%). Höchstwerte erreichen die Angaben für Kinder im Alter von 12 bis 15 Jahren mit durchschnittlich 16,7% (West: 21,5%, Ost: 11,9%) (HOFFMANN, 2000). In den beiden ECRHS-Studienzentren fand man für den Heuschnupfen bei Erwachsenen eine durchschnittliche Jahresprävalenz von 18,2% heraus. Wobei auch hier ein deutlicher Unterschied zwischen Ost (Erfurt: 13,3%) und West (Hamburg: 23,1%) festgestellt werden konnte (HOFFMANN, 2000).

Die Lebenszeitprävalenz der atopische Dermatitis (Neurodermitis) beläuft sich Studien der 90er Jahre zufolge für die 6-jährigen auf 12,4% (Sachsen-Anhalt: 15,5%, Nordrhein-Westfalen: 9,3%). Die im Rahmen der ISAAC-Studie untersuchten deutschen Kinder von 5 bis 8 Jahren zeigen eine Lebenszeitprävalenz von 12,3% (Münster: 14,7%, Greifswald: 9,9%), die Kinder von 12 bis 15 Jahren von 8,3% (Münster: 10,6%, Greifswald: 5,9%). Die Lebenszeitprävalenz von jungen Erwachsenen im Alter von 18 bis 35 Jahren wird mit 4,7% angegeben (HOFFMANN, 2000).

Im Hinblick auf das weltweite Vorkommen von atopischen Symptomen und allergischen Erkrankungen haben die ISAAC-Studie für Kinder und die ECRHS-Studie für Erwachsene ähnliche Ergebnisse erbracht (PEARCE et al., 2000).

Es gibt ein starkes Gefälle der Prävalenzraten für Asthma, Atopie und bronchialer Hyperreaktivität (BHR) bei Erwachsenen von englischsprachigen Regionen hin zu

1 Einleitung

osteuropäischen und mediterranen Regionen (JANSON et al., 2001). Auch die ISAAC-Studienzentren in osteuropäischen Ländern weisen die niedrigsten Prävalenzraten für Asthma, Heuschnupfen und Neurodermitis auf. Die höchsten Raten sind diffus verteilt, für Asthmasymptome jedoch einzig auf die englischsprachigen Länder konzentriert. In Großbritannien beträgt die Prävalenz durchschnittlich 30% (BEASLEY et al., 1998).

Es fallen jedoch nicht nur unterschiedliche Allergieprävalenzen zwischen verschiedenen Ländern, beziehungsweise Kontinenten auf, sondern auch zwischen Regionen und Städten innerhalb eines Landes. Deutschland bot nach der Wiedervereinigung 1990 ideale Bedingungen für Vergleiche zwischen genetisch ähnlichen Populationen, die aber 40 Jahre lang unter verschiedenen Lebensverhältnissen gelebt haben und anderen Umweltbedingungen ausgesetzt waren.

Bei 9 bis 11 Jahre alten Kindern konnte eine Studie für München eine signifikant höhere Prävalenz für Asthma (9,3%) und Heuschnupfen (8,6%) zeigen, als für Leipzig und Halle (7,2% und 2,7%) (NICOLAI und VON MUTIUS, 1996). Ähnliche Unterschiede zwischen Ost- und Westdeutschland konnten auch für Erwachsene von 25 bis 69 Jahren gezeigt werden (NICOLAI et al., 1997).

Der Unterschied zwischen den alten und den neuen Bundesländern wird jedoch seit der Wiedervereinigung immer geringer. So steigt die Prävalenz der atopischen Erkrankungen bei nach 1990 geborenen Kindern in den neuen Bundesländern stark an (HEINRICH et al., 2002). Die Annäherung der Prävalenzen von Asthmasymptomen und bronchialer Hyperreaktivität wurde auch durch die beiden deutschen ECRHS-Studienstandorte Hamburg und Erfurt anhand von 22 bis 44-jährigen Erwachsenen bestätigt. Die Studie legt des Weiteren den Verdacht nahe, dass in der Kindheit wirkende Innenraum-Faktoren einen stärkeren Einfluss auf die Entwicklung von Asthma und Atopie haben, als eine langjährige Exposition gegenüber Schwefeldioxid und Staubpartikeln, wie es in den ostdeutschen Studienstandorten der Fall war (NOWAK et al., 1996).

1.2 Die Hygienehypothese

Es werden gegenwärtig vielfältige Faktoren der Allergieentstehung diskutiert. Viele genetische Faktoren scheinen einen Beitrag zur Allergieentstehung zu leisten, das

1 Einleitung

komplexe Zusammenspiel der durch die beschriebenen Gene kodierten Proteine ist jedoch noch nicht verstanden (HOFFMANN, 2000). Des Weiteren vermögen genetische Faktoren allein die rapide Zunahme der Prävalenz atopischer Erkrankungen in den letzten Jahrzehnten nicht zu erklären. Es müssen also auch Umweltfaktoren diskutiert werden, die zusätzlich zum Genotyp wirken und somit für Allergien prädisponieren oder davor schützen (GARN und RENZ, 2007). Hierfür sprechen unter anderem die bereits erwähnten epidemiologischen Studien, die Ost- und Westdeutschland nach der Wiedervereinigung verglichen haben und in diesen genetisch sehr ähnlichen Populationen eine unterschiedliche Prävalenz atopischer Erkrankungen fanden (NOWAK et al., 1996). Nach der Wiedervereinigung glichen sich die Lebensbedingungen und in einem langsamen Prozess auch die Prävalenzraten an (HEINRICH et al., 2002).

Es scheint somit ein Zusammenhang zwischen der westlichen Lebensweise und dem Auftreten von Allergien zu geben. Bereits 1989 postulierte Strachan, dass die moderne Lebensweise mit hohem Hygienestandard und kleineren Familien zu einer Verminderung der gegenseitigen Ansteckung mit Infektionserkrankungen und in der Folge zu erhöhtem Auftreten atopischer Erkrankungen führt (STRACHAN, 1989). Diese Annahme ist als *Hygienehypothese* der Allergieentstehung bekannt.

Diverse Studien haben epidemiologische oder mikrobiologische Beweise für diese Theorie einer relativen Sterilisation der Lebensumgebung und daraus folgenden Prädisposition für Allergien gefunden (GARN und RENZ, 2007). Innerfamiliär wirkt sich eine hohe Anzahl an Geschwistern protektiv auf das Auftreten von Neurodermitis und Heuschnupfen aus. Als Ursache wird eine höhere Infektionsrate durch hauptsächlich ältere Geschwister angenommen (STRACHAN, 1997). In gleicher Weise ist das frühe Besuchen einer Kindertagesstätte mit einem geringeren Risiko assoziiert, an Asthma und stenosebedingter, keuchender Atmung (s.g. „wheezing“) zu leiden (CELEDON et al., 2003).

In einer schwedischen Studie wurde herausgefunden, dass Kinder, die im ersten Lebensjahr Kontakt zu Haustieren hatten, im Schulalter weniger oft unter allergischer Rhinokonjunktivitis und Asthma litten als die Vergleichsgruppe. Außerdem waren Kinder mit Kontakt zu Katzen während des ersten Lebensjahres weniger oft gegen Katzenhaare sensibilisiert (HESSELMAR et al., 1999). Auch ein anthroposophischer Lebensstil ist mit einem geringeren Atopierisiko assoziiert. Dies wird auf die sehr naturverbundene Lebensweise, die Ernährung und die restriktive Antibiotikanutzung zurückgeführt (ALM et al., 1999).

1 Einleitung

Vor dem Hintergrund der Hygienehypothese wurden in einer Reihe von epidemiologischen Studien Kinder aus ländlichem, bäuerlichen Milieu mit Kindern städtischer Herkunft verglichen. Es sollte gezeigt werden, dass das mikrobielle Milieu in der Umgebung der ländlich aufwachsenden Kinder zu weniger allergischen Erkrankungen führt. In der schweizer SCARPOL (Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air pollution) - Studie wurden die Kinder von Landwirten mit Kindern von Eltern anderer Berufe aus der nahen Umgebung verglichen. Man fand bei den Kindern der Landwirte ein deutlich geringeres Risiko, allergische Erkrankungen zu entwickeln (BRAUN-FAHRLANDER et al., 1999). Eine Studie aus Bayern konnte diesen Effekt bestätigen und fand besonders bei Kindern von Vollzeit-Landwirten, insbesondere mit Nutztierhaltung, niedrigere Prävalenzraten atopischer Erkrankungen als in der Vergleichsgruppe (VON EHRENSTEIN et al., 2000).

Die ALEX (ALlergy und EndotoXin) - Studie untersuchte Kinder aus ländlichen Gebieten in Bayern, Österreich und der Schweiz auf ihre Zytokinproduktion, atopische Erkrankungen und Sensibilisierung. Zusätzlich wurden Proben aus den Schlafstätten der Kinder entnommen und auf bakterielle Endotoxine untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Kinder weniger an allergischen Erkrankungen litten und eine niedrigere Zytokinproduktion (IL-10, IL-12, IFN- γ und TNF- α) aufwiesen, je mehr Endotoxine gefunden wurden. Bei Kindern, die in bäuerlichem Umfeld aufgewachsen sind, trat dieser Effekt besonders deutlich auf, was die Vermutung nahe legt, dass frühzeitiger, reger Kontakt mit Endotoxinen zu einer Toleranz gegenüber potentiellen Allergenen beiträgt (BRAUN-FAHRLANDER et al., 2002).

Die gleiche Studie belegte, dass Kinder, die im ersten Lebensjahr Kontakt zu Tierställen und unpasteurisierter Milch hatten, ebenfalls signifikant niedrigere Prävalenzraten für Asthma, Heuschnupfen und atopische Sensibilisierung aufwiesen (VON MUTIUS und SCHMID, 2006). Die gegenwärtige Version der Hygienehypothese beinhaltet somit nicht nur den Einfluss von mikrobiellen Organismen auf die Entstehung von Allergien, sondern auch ihre Interaktion mit verschiedenen Nahrungsmitteln (FREI et al., 2012).

1.3 Mechanismen der Allergieentstehung

Allergien sind ein Sammelbegriff für unterschiedliche Symptome, die bei einer pathologisch veränderten Reaktion auf bestimmte Antigene auftreten. Im Gegensatz zu einer normalen Immunisierung oder Toleranz der Fremdstoffe, kommt es zu einer überschießenden Immunantwort. Die eigentlich harmlosen Umweltantigene, die zu einer allergischen Reaktion führen, werden Allergene genannt und umfassen zum Beispiel Pollen, Hausstaubmilbenkot, Tierhaare, Medikamente oder Nahrungsmittelbestandteile (MURPHY et al., 2009, S. 699).

Coombs und Gell teilten die Hypersensibilität klassisch nach ihrem pathophysiologischen Mechanismus in die Typen I bis IV ein. Die IgE-vermittelte Allergie vom Typ-I „Soforttyp“ gehört zu den antikörpervermittelten Allergien (ebenso wie die Typen II und III), die vom Typ IV ist zellvermittelt (via CD8⁺ zytotoxische T-Zellen). Die Hypersensibilität vom Typ I ist als Auslöser des allergischen Asthma, der Rhinokonjunktivitis und der Neurodermitis im Kontext der PASTURE-/EFRAIM- Studie die wichtigste Form und wird im Folgenden näher betrachtet.

1.3.1 Hypersensibilität vom Typ I

Die Typ-I-Hypersensibilität ist durch Antikörper der Klasse IgE vermittelt und wird als Reaktion vom Soforttyp bezeichnet, da die Symptome sehr schnell nach Allergenexposition auftreten. Die allergische Reaktion kann aus didaktischen Gründen in eine Sensibilisierungsphase und eine Effektorphase eingeteilt werden. *In vivo* treten beide Phasen in der Regel gleichzeitig auf (AVERBECK et al., 2007). Abbildung 1.1 verdeutlicht die folgenden Mechanismen.

Sensibilisierungsphase

Kommt der Mensch mit einem Allergen über die Haut, die Atemwege oder den Gastrointestinaltrakt in Kontakt, so wird es von antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie beispielsweise den Dendritischen Zellen, aufgenommen und intrazellulär prozessiert. Daraufhin werden die Fragmente des Allergens an die „major histocompatibility complexes (MHC)-II“ Moleküle gebunden und den CD4⁺ T-Lymphozyten (T-Helferzellen,

1 Einleitung

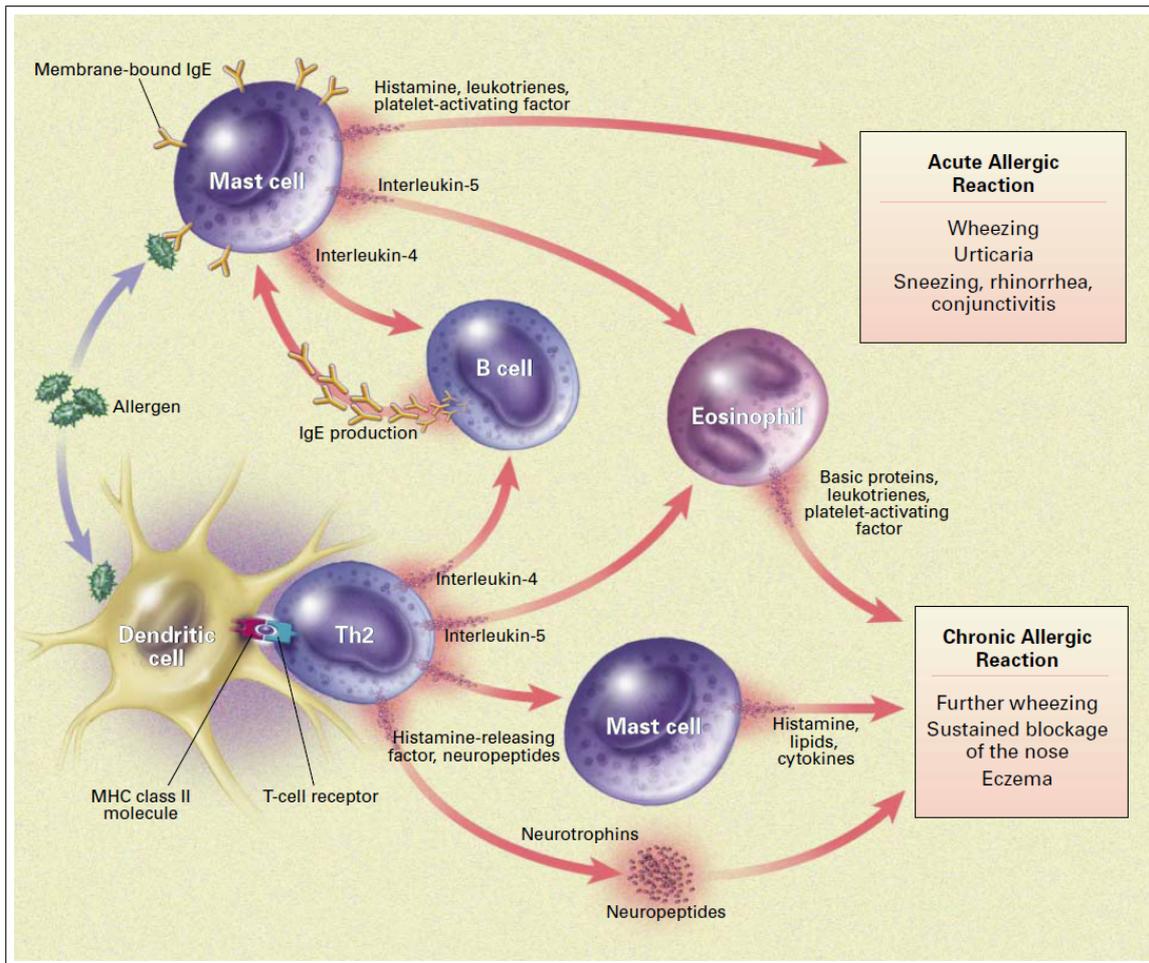


Abbildung 1.1: Entstehung akuter und chronischer allergischer Reaktionen
Abbildung (KAY, 2001)

T_H) präsentiert. Unter dem Einfluss der Zytokine IL-4 und IL-6 differenziert sich die $CD4^+$ T_H0 -Zelle aus zur T_H2 -Zelle. T_H2 -Zellen interagieren mit B-Lymphozyten und lassen sie so zu Immunglobulin (Ig)E produzierenden Plasmazellen ausdifferenzieren. In diesem Zusammenhang spielen die Zytokine IL4, IL-5, IL-10 und IL-13 eine entscheidende Rolle (s.u.). Das gebildete IgE bindet an hochaffine $F_{c\epsilon}$ -Rezeptoren auf Mastzellen und basophilen Granulozyten. In diesem Stadium kommt es noch zu keiner allergischen Reaktion, der Organismus ist allerdings nun gegen das Allergen sensibilisiert (AVERBECK et al., 2007; MURPHY et al., 2009, S. 701-712).

Effektorphase

Kommt es zu einer erneuten Konfrontation des Organismus mit dem Allergen, gegen das bereits Immunglobuline gebildet wurden, so bindet das Allergen direkt an das IgE,

1 Einleitung

das sich auf den Mastzellen und Basophilen befindet. Es findet eine Quervernetzung der F_{ce} -Rezeptoren statt, was in der Frühphase zur Abgabe von Entzündungsmediatoren aus den Zellen führt. Darunter fallen biogene Amine und Proteoglycane, die sich bereits fertig synthetisiert in Granula im Zytoplasma befinden.

Histamin ist ein flüchtiges Amin, das eine Kontraktion glatter Muskulatur in Lunge und Intestinum, sowie erhöhte Gefäßpermeabilität bewirkt. Proteoglycane beeinflussen die extrazelluläre Matrix und spielen für die lokale Freisetzung und Verfügbarkeit von Histamin, Zytokinen und Enzymen eine wichtige Rolle.

In der Spätphase wirken neu synthetisierte Lipide wie Prostaglandine und Leukotriene, die einerseits die lokale Entzündung unterhalten und andererseits besonders stark bronchokonstriktorisch wirken. Zytokine wie $TNF-\alpha$, IL-4 und IL-5 unterhalten ebenfalls die Entzündung und wirken chemotaktisch insbesondere auf basophile Granulozyten und T_H2 -Zellen, welche bei Allergenpersistenz einen chronischen Verlauf der Entzündung unterstützen (AVERBECK et al., 2007; MURPHY et al., 2009, S. 713-735). Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass die Überexpression so genannter Neurotrophine während eines entzündlichen Vorgangs, gerade in der Lunge, unabhängig von seiner ursprünglichen Ursache, die Immunreaktion unterhalten (RENZ, 2004).

1.4 Das TH1- / TH2- Konzept

Gegenwärtig wird intensiv an möglichen Faktoren geforscht, die die Entwicklung von Allergien und Asthma beeinflussen. Es werden neue Zelluntergruppen charakterisiert, die an den bisher bekannten Pfaden modulierend eingreifen. An der Allergieentstehung sind sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem beteiligt (VON MUTIUS und VERCELLI, 2010).

Die immunologischen Mechanismen, welche die Grundlage der Hygienehypothese bilden, umfassen T_H1 - und T_H2 -Zellen, andere T-Helferzellsubtypen wie die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) und veränderte Dendritische Zellen (WAMBRE et al., 2012).

Aus einer naiven $CD4^+$ T-Zelle (T_H0 -Zelle) können zwei Hauptarten von T-Zellen entstehen. Die T_H1 -Zelle bewirkt eine zellvermittelte Immunantwort, die T_H2 -Zelle eine humoral vermittelte Immunantwort. Das T_H1 -/ T_H2 - Konzept geht davon aus, dass die Balance zwischen den beiden Immunantworten bei Atopikern gestört und

1 Einleitung

zu Lasten einer vornehmlich T_H2 -vermittelten Immunantwort verschoben ist (GARN und RENZ, 2007).

1.4.1 Differenzierung der T-Helfer-Zellen

Das angeborene (unspezifische) Immunsystem stellt auf humoralem und zellulärem Weg die erste Verteidigung des Organismus gegen ein Pathogen dar. Dabei erkennen die Zellen des angeborenen Immunsystems Strukturen mit pathogenspezifischem Muster, die es im eigenen Organismus in dieser Form nicht gibt. Diese Strukturen werden als „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) bezeichnet. Die Rezeptoren, die die PAMPs erkennen, sind vergleichsweise unspezifisch und werden „pattern recognition receptors“ (PRR) genannt.

Weitaus spezifischer binden die Rezeptoren des erworbenen (spezifischen) Immunsystems. Die einzelnen Ketten der B-Zell-Rezeptoren (BCR) und der T-Zell-Rezeptoren (TCR) werden in den primären lymphatischen Organen durch somatische Rekombination der Gensegmente in zahllosen unterschiedlichen Kombinationen hergestellt. So gibt es theoretisch für jedes Antigen Lymphozyten mit passendem Rezeptor.

Einige Zellen des angeborenen Immunsystems interagieren mit den Zellen des erworbenen Immunsystems, um eine zweite, spezifischere Verteidigungswelle zu initiieren. Makrophagen und Dendritische Zellen (DCs) gehören zu den Antigenpräsentierenden Zellen (APC), die diese Aufgabe ausführen.

Charakteristisch für diese Zellen ist, dass sie in der Lage sind, Pathogene zu phagozytieren, diese intrazellulär zu prozessieren und dann Bruchstücke an MHC-II-Molekülen gebunden an ihrer Oberfläche zu präsentieren.

Treffen nun APC und T_H0 -Zelle in einem sekundären lymphatischen Organ aufeinander und bindet das präsentierte Antigen an den T-Zell-Rezeptor, so wird die T-Zelle aktiviert und beginnt zu proliferieren, falls weitere stimulatorische Signale auftreten. Unter autokriner Stimulation durch den Wachstumsfaktor IL-2 vermehrt sich die aktivierte T-Zelle, um dann je nach kostimulatorischen Molekülen und Zytokinmilieu zu einer T_H1 - oder T_H2 -Effektorzellpopulation auszudifferenzieren (IBELGAUFTS, 2009) (Abb: 1.2).

1 Einleitung

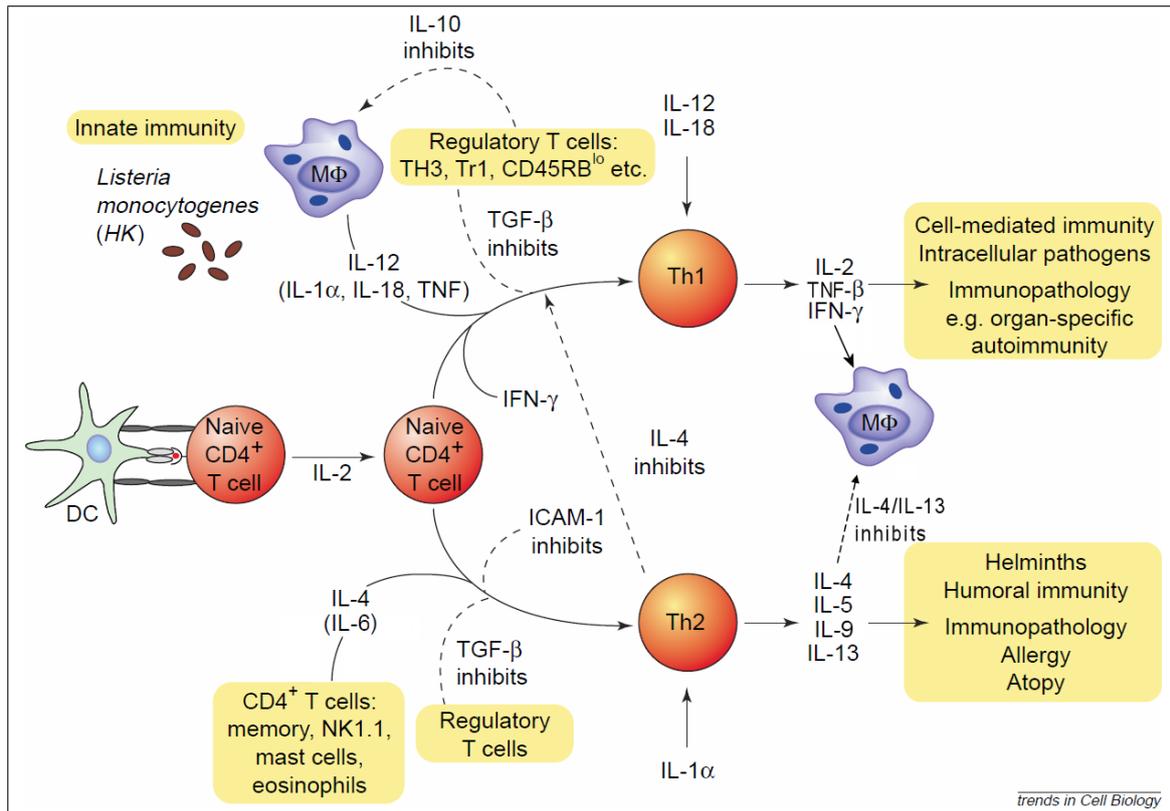


Abbildung 1.2: T_H-Zell-Differenzierung und beteiligte Zytokine
Abbildung abgeändert (O'GARRA und ARAI, 2000)

Bei der Initiierung der spezifischen Immunantwort entscheidet sich, welche T_H-Zellart dominiert. Handelt es sich um kleine Mengen Antigen und bindet es mit relativ geringer Affinität an den TCR, wird eine T_H2 dominierte Antwort erwartet. Im Umkehrschluss führen größere Menge Antigen, die mit hoher Affinität binden, zu einer T_H1-lastigen Immunantwort (KAY, 2001).

Die beiden T_H1- und T_H2-Populationen sind durch die von ihnen produzierten Zytokine definiert. Ein Teil dieser Zytokine kann die Ausdifferenzierung zur jeweils anderen Effektorzellart inhibieren. Während der Entwicklung enthalten die Populationen unterschiedlich weit ausdifferenzierte Zellen, die wenig Zytokine produzieren und sich durch geeignete Stimuli in die jeweils andere Richtung entwickeln können (O'GARRA und ARAI, 2000). Die T-Zell-Differenzierung wird in Abbildung 1.3 veranschaulicht.

Werden Makrophagen oder Dendritische Zellen (DCs) über eine bestimmte Gruppe ihrer pattern recognition receptors, die toll-like-Rezeptoren (TLRs) stimuliert, so bilden

1 Einleitung

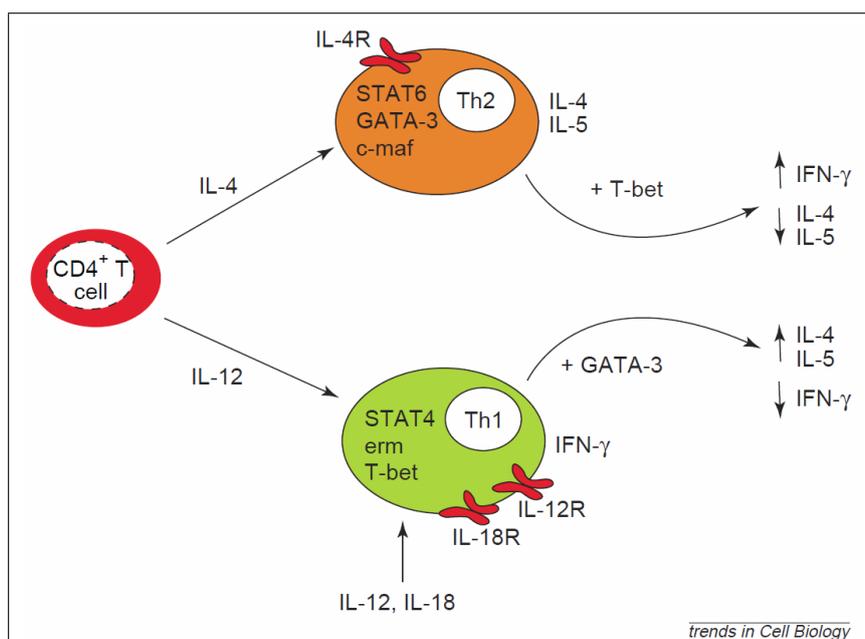


Abbildung 1.3: Regulation der T_H-Zell-Differenzierung durch Zytokine und Transkriptionsfaktoren
Abbildung (O'GARRA und ARAI, 2000)

sie diverse Zytokine. Einen großen Stellenwert nehmen **IL-12** und Typ-I-Interferone ein, welche bevorzugt zur T_H1-Differenzierung führen (FREI et al., 2012).

IL-12 ist ein heterodimeres Glykoprotein mit der Molekularmasse 70 kDa. Es ist das klassische T_H1 fördernde Zytokin. Die Bindung von IL-12 an seinen Rezeptor aktiviert die Transkriptionsfaktoren „signal transducer and activator of transcription (STAT)4“ und „T-box expressed in T cells (*T-bet*)“ in der T_H0-Zelle. Dies ist die Voraussetzung für die T_H1-Differenzierung (ROMAGNANI, 2004) und die Produktion der T_H1-typischen Zytokine **IFN-γ**, **IL-2** und **TNF-β** (Lymphotoxin) (IBELGAUFTS, 2009). Das Zytokin IL-18 unterstützt hierbei die IL-12 Wirkung im Hinblick auf eine gesteigerte IFN-γ Produktion (AGNELLO et al., 2003).

Der Transkriptionsfaktor *T-bet* unterdrückt die Produktion der T_H2-Zytokine IL-4 und IL-5 und vermag, in T_H2 Populationen eingebracht, diese in IFN-γ produzierende T_H1-Zellen umzuwandeln (ROMAGNANI, 2004).

Im Gegenzug führt die frühe Präsenz der Zytokine **IL-4** und **IL-6** zur T_H2-Differenzierung (AVERBECK et al., 2007).

Bindet IL-4 an seinen Rezeptor auf der T_H0-Zelle, so wird über den Transkriptionsfaktor *STAT6* der Transkriptionsfaktor *GATA-3* aktiviert. Dies inhibiert die IFN-γ-Produktion und erhöht die IL-4-Produktion. Des Weiteren reguliert *GATA-3* die Ex-

1 Einleitung

pression der T_H2 -typischen Zytokine **IL-5** und **IL-13** (ROMAGNANI, 2004). Somit spielen die Transkriptionsfaktoren *T-bet* und *GATA-3* als hauptsächliche Unterstützer der jeweiligen T_H -Zelldifferenzierung samt Zytokinproduktion, als auch als Wächter vor gegenteiligen Einflüssen eine Schlüsselrolle (O'GARRA und ARAI, 2000).

1.4.2 Effektorzytokine

T_H1 -Zytokine

IFN- γ ist der einzige Vertreter der Familie der Typ-II-Interferone. IFN- α , IFN- β , IFN- δ , IFN- ω und IFN- τ bilden die Gruppe der Typ-I-Interferone. IFN- γ reguliert die Expression des IL-12-Rezeptors herauf und vermag, das T_H2 -Zell Wachstum zu inhibieren und eine Rückdifferenzierung zu einem T_H1 -ähnlichen Phänotyp zu bewirken (O'GARRA und ARAI, 2000). Des Weiteren induziert es den Transkriptionsfaktor *T-bet*, was im Sinne eines positiven Feedbacks wiederum zu erhöhten IFN- γ -Werten führt (AGNELLO et al., 2003).

IFN- γ spielt nicht nur in der T_H1 -/ T_H2 -Differenzierung eine wichtige Rolle. Es aktiviert Monozyten und Makrophagen und führt bei B-Zellen zur Produktion der Immunglobuline IgG₁ und IgG₃ (AVERBECK et al., 2007). In Makrophagen stimuliert es die Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins **TNF- α** , sowie reaktiver Sauerstoff Radikale (IBELGAUFTS, 2009) und verbessert ihre Fähigkeit zur Phagozytose (AGNELLO et al., 2003).

IFN- γ scheint eine zentrale Rolle bei der Allergieprotektion zu spielen. Hohe IFN- γ -Spiegel bei der Geburt und im ersten Lebensjahr korrelieren negativ mit dem späteren Auftreten allergischer Erkrankungen. So unterdrückt ein hoher IFN- γ -Spiegel T_H2 -Immunantworten und unterstützt die Ausreifung der T_H1 -Immunantwort (VON MUTIUS und VERCELLI, 2010).

TNF- α ist an einer Vielzahl von Immunreaktionen beteiligt. Es ist an lokalen und systemischen Entzündungsreaktionen beteiligt, unter anderem durch Induktion der Produktion anderer entzündungsfördernder Zytokine. Es vermittelt Apoptose beispielsweise bei Tumor-Zelllinien, ist aber auch bei der Proliferation und Differenzierung von T- und B-Zellen behilflich (IBELGAUFTS, 2009). Bei Autoimmunkrankheiten, wie der rheumatoiden Arthritis ist **TNF- α** pathologisch erhöht und für die Destruktion des Gewebes mit verantwortlich (MCINNES und SCHETT, 2011).

T_H2-Zytokine

Die T_H2 Zytokine tragen zu allergietypischen Erscheinungen, wie der IgE-Produktion, der Präsenz von Eosinophilen und der Schleimproduktion der Luftwege oder des Gastrointestinaltraktes bei (WAMBRE et al., 2012).

IL-4 spielt eine wesentliche Rolle bei der Polarisierung CD4⁺ T-Zellen in Richtung T_H2 Phänotyp. Dies geschieht durch Herunterregulierung der Expression des IL-12 Rezeptors (O'GARRA und ARAI, 2000). IL-4 fördert die B-Zell Differenzierung und erhöht, wie auch **IL-13**, die MHC-II Expression auf B-Zellen, was das Immunsystem befähigt, auch auf geringe Antigenkonzentrationen zu reagieren (IBELGAUFTS, 2009). Zusammen mit IL-13 stimuliert es in Plasmazellen einen Isotypenswitch bei der Immunglobulinbildung zugunsten der bei atopischen Erkrankungen pathologisch erhöhten IgE Immunglobuline (AVERBECK et al., 2007). Dieser Vorgang kann durch **IL-9** unterstützt und durch IFN- γ antagonisiert werden (IBELGAUFTS, 2009). Des Weiteren inhibieren IL-13 und IL-4 die Synthese von pro-infamatorischen Zytokinen in Makrophagen (IBELGAUFTS, 2009).

IL-5 ist ein Wachstumsfaktor, der durch die Veranlassung der Entwicklung, Differenzierung, Rekrutierung und dem Überleben von eosinophilen Granulozyten die Entwicklung allergischer Vorgänge unterstützt (RENZ, 2004).

IL-9 spielt ebenfalls in der Entwicklung von Eosinophilen eine Rolle und fördert die Entwicklung von Mastzellen (KAY, 2001), welche in der Effektorphase der Typ-I-Allergien eine wichtige Rolle spielen (s.o.). Bei allergischem Asthma vermittelt es, zusammen mit IL-13, die Überreaktion der Atemwege und führt, gemeinsam mit IL-4 und IL-13, zur pathologisch hohen Schleimproduktion (KAY, 2001).

1.4.3 regulatorische T-Zellen (T-reg) und T-Helfer-17-Zellen

Jüngere Forschungsergebnisse weisen auf weitere Typen von T-Zellen hin, die wegen ihrer Fähigkeit, eine Immunantwort zu modulieren oder sogar zu unterdrücken, in den Fokus des Interesses gerückt sind. Von diesen regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) ist besonders eine CD4⁺/CD25⁺ und den Transkriptionsfaktor „forkhead box (FOX) p3“ exprimierende Population interessant.

Die CD25⁺ adaptiven T_{reg} differenzieren sich in der Peripherie durch Stimulation

1 Einleitung

der Zytokine **IL-10** und **IFN- γ** aus. Sie können durch verschiedene Mechanismen die T_H1 - und T_H2 -Zellen in unterschiedlicher Intensität unterdrücken (ROMAGNANI, 2004). Dies geschieht einerseits durch Abgabe der inhibitorisch wirkenden Zytokine IL-10 und TGF- β , aber auch durch davon unabhängige Mechanismen, wie den durch höhere Rezeptordichte bedingten Vorrang beim Konkurrieren um den T-Zell-Wachstumsfaktor IL-2 (NANDAKUMAR et al., 2009), Suppression anderer Zellen durch Zytolyse oder durch Modulation der Reifung und/oder Funktion der Dendritischen Zellen (VIGNALI et al., 2008).

IL-10 unterdrückt des Weiteren in seiner Wirkung direkt und indirekt die Aktivität von Mastzellen, Eosinophilen und Basophilen und verhindert den Isotypenswitch zu IgE in B-Zellen (NANDAKUMAR et al., 2009; WAMBRE et al., 2012). Es wird in geringer Konzentration auch von T_H -Zellen gebildet, was als eine Art Selbstschutz vor Überaktivierung verstanden werden kann (O'GARRA und ARAI, 2000).

Die Beschreibung des Zytokins **IL-17** im Rahmen der Immunmodulation führte zu der Einführung einer neuen T_H -Zell Subpopulation, den T_H17 -Zellen. Diese kleine Subpopulation scheint ebenfalls eine Rolle bei allergischen Erkrankungen zu spielen (WAMBRE et al., 2012). IL-17 ist Mitglied und Namensgeber einer Familie aus proinflammatorischen Regulatorzytokinen bei entzündlichen Vorgängen (PAPPU et al., 2008). Es stimuliert die Produktion proinflammatorischer Zytokine in Nicht-Immunzellen und Immunzellen, wie zum Beispiel Makrophagen. IL-17A und IL-17F aktivieren als Heterodimer über NF- κ B proinflammatorische Prozesse (ZHOU et al., 2010). Unter anderem regt IL-17 die Produktion von IL-6 an, was nachweislich T_{reg} -Zellen unterdrückt. T_H17 -Zellen scheinen somit ein Gegenspieler der T_{reg} zu sein (NANDAKUMAR et al., 2009).

Die oben beschriebenen molekularen und zellulären Mechanismen bieten zwei mögliche Erklärungen für die bei Atopikern dominierende T_H2 Immunantwort.

1. Die Balance zwischen T_H1 - und T_H2 -Zellen ist bei Atopikern gestört. Es ist bekannt, dass bei Neugeborenen physiologischerweise T_H2 -Immunantworten dominieren und dass durch den Kontakt mit Mikroorganismen, welche insbesondere über TLRs T_H1 dominierte Immunantworten auslösen, das Immunsystem reift (KAY, 2001).

Bleibt nun durch eine relativ sterile Umwelt dieser Kontakt mit Mikroorganismen

1 Einleitung

aus, so kann sich das Immunsystem nicht in der beschriebenen Art entwickeln („missing immune deviation“). Dies ist die immunologische Basis der Hygienehypothese (GARN und RENZ, 2007).

2. Da erwiesenermaßen T_{reg} -Zellen die Immunantwort modulieren, kommt auch eine pathologisch verminderte Suppression der T_H -Zellen als Ursache in Betracht. Diese Hypothese basiert auf epidemiologischen Beobachtungen, wie zum Beispiel der Tatsache, dass auch T_H1 -dominante Erkrankungen wie Typ-I-Diabetes in den westlichen Ländern zugenommen haben (ROMAGNANI, 2004) oder auch, dass der Kontakt zu Endotoxinen zu einer *reduzierten* IFN- γ -Produktion und T_H1 -Aktivität führen kann (BROOKS et al., 2013). Zusätzlich konnte eine erhöhte Anzahl von die T_H -Zell supprimierenden T_{reg} -Zellen bei Kindern von Müttern aus dem bäuerlichen Umfeld nachgewiesen werden (VON MUTIUS und VERCELLI, 2010).

Möglicherweise tragen beide Mechanismen zur Entstehung eines atopischen Phänotyps bei und bieten jeder für sich Ansätze, um der Allergieentstehung entgegenzuwirken. Sicher scheint jedoch, dass Interventionen zur Vermeidung der Entstehung von Atopie sehr früh, vielleicht sogar schon im Mutterleib, auf das sich entwickelnde Immunsystem einwirken müssen (VON MUTIUS und VERCELLI, 2010; FISHBEIN und FULEIHAN, 2012).

1.5 Toll-like-Rezeptoren und Induktion von Zytokinproduktion *in vitro*

Die Zellen der angeborenen Immunabwehr verfügen über so genannte pattern recognition receptors, damit in den Organismus eingedrungenes Fremdmaterial erkannt und phagozytiert werden kann. Die Antigenpräsentierenden Zellen (APC) präsentieren nun diese Antigene nicht nur via MHC-II-Rezeptor den T-Zellen, sondern schaffen auch ein Zytokinmilieu, welches die T-Zell-Differenzierung bestimmt.

In diesem Zusammenhang sind die Toll-like-Rezeptoren (TLRs) von großer Bedeutung. Von den bisher 13 verschiedenen Vertretern (10 im Menschen, 12 in der Maus (KUMAR

1 Einleitung

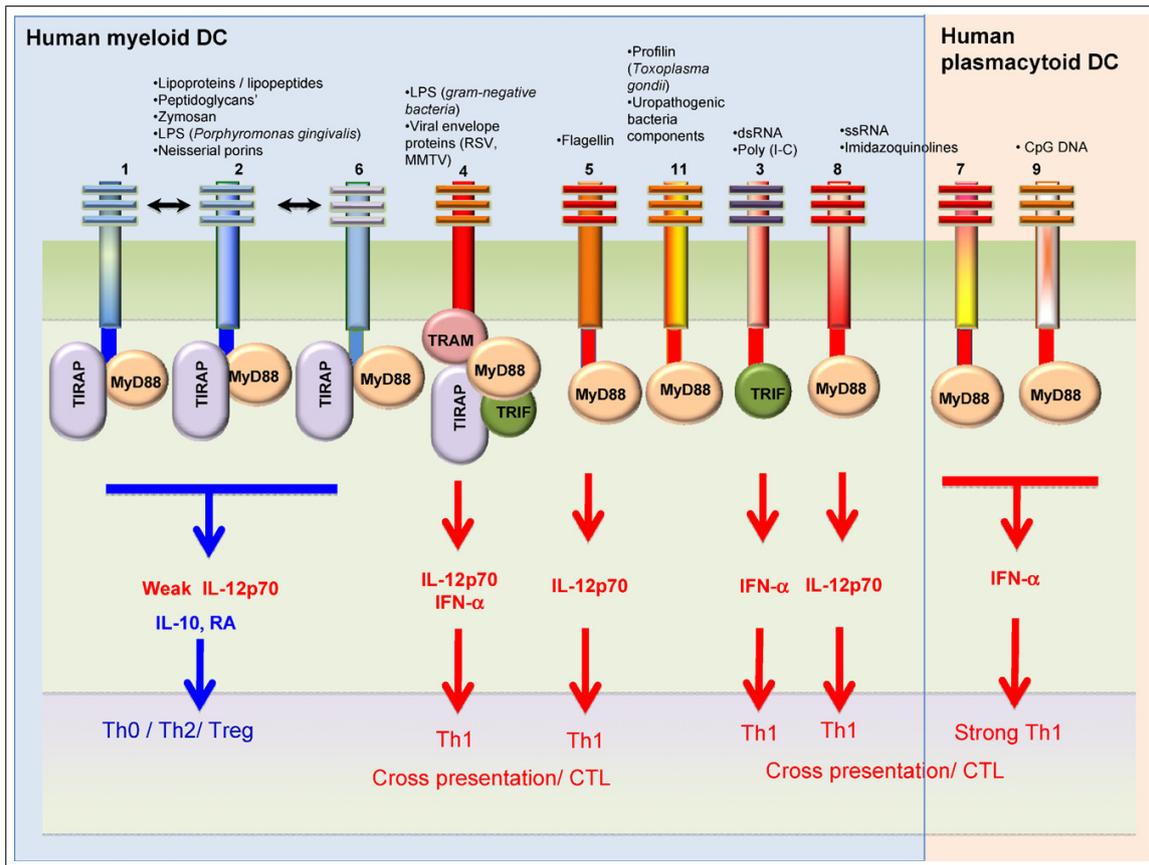


Abbildung 1.4: TLRs und ihre jeweiligen Liganden, intrazelluläre Signaltransduktion und induzierte T-Zell-Differenzierung
Abbildung (MANICASSAMY und PULENDRAN, 2009)

et al., 2011)) werden unterschiedliche pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) erkannt und in Abhängigkeit davon Zytokine produziert (siehe auch Abb: 1.4). Die TLRs 1, 2, 4, 5, und 11 werden an der Zelloberfläche exprimiert. Die TLRs 3, 7, 8, und 9 befinden sich intrazellulär im Endoplasmatischen Retikulum und in Endosomen oder Lysosomen, wo sie Strukturen viraler DNA erkennen (BAUER et al., 2007). In der Regel führt eine Aktivierung der APC über TLR zur Produktion von Zytokinen, die eine T_H1 -Differenzierung zur Folge haben (IL-12, IL-18, $IFN-\alpha$), beziehungsweise proinflammatorisch wirken ($TNF-\alpha$, IL-1, IL-6) (BAUER et al., 2007). Eine Ausnahme bilden die drei Toll-like-Rezeptoren TLR2, TLR1 und TLR6. Jeweils TLR2 + TLR1 und TLR2 + TLR6 funktionieren als Heterodimere (MANICASSAMY und PULENDRAN, 2009). Zu ihren Liganden zählen bakterielle Zellwandstrukturen wie Lipoteichonsäure (LTA) und Lipoprotein, aber auch Zellwandstrukturen von Pilzen (MANICASSAMY und PULENDRAN, 2009). Es ist möglich, dass Lipopolysaccharide (LPS)

1 Einleitung

einiger gramnegativer Bakterien und Peptidoglycan (PGN) grampositiver Bakterien zu den Liganden des TLR2 gehören, ein Effekt könnte jedoch auch auf Verunreinigung basieren (BAUER et al., 2007). Studien haben gezeigt, dass Stimulation mit TLR2 Liganden, wie dem synthetischen Lipopeptid Pam3CSK₄, eine starke IL-10 Produktion auslösen, die eher zu einer T_H2-, beziehungsweise T_{reg}-Zelldifferenzierung führt (MANICASSAMY und PULENDRAN, 2009).

LPS ist der klassische TLR4-Ligand und führt über IL-12 zur T_H1- Differenzierung (MANICASSAMY und PULENDRAN, 2009). TLR4 und TLR9 sind in Kindern aus bäuerlichem Umfeld heraufreguliert (FISHBEIN und FULEIHAN, 2012).

1.6 Die PASTURE- / EFRAIM- Studie

In der EFRAIM (Mechanisms of early protective exposures on allergy development)-Studie werden Stimuli eingesetzt, um *in vitro* die Leukozyten in Blutproben zu stimulieren, in messbarem Ausmaß Zytokine zu produzieren. Neben den bereits erwähnten TLR-Liganden LPS, PGN und Pam3CSK₄, wurden außerdem die Stimuli **Phorbol 12-Myristat 13-Acetat plus Ionomycin, Staphylococcal enterotoxin B** und **Phytohemagglutinin** genutzt.

Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (**PMA**) ist ein Phorbolester und aktiviert Proteinkinase C in den Zellen (LIU und HECKMAN, 1998). Zusätzlich wird **Ionomycin** verwendet, ein vom Bakterium *Streptomyces globatus* stammende Molekül, welches als Ionophore den benötigten intrazellulären Calciumspiegel erhöht (TOEPLITZ et al., 1979).

Staphylococcal enterotoxin B (**SEB**) ist ein so genanntes Superantigen, welches von dem Bakterium *Staphylococcus aureus* produziert wird. Es wirkt mitogen durch Bindung an den MHC-II-Rezeptor der T-Zellen und nicht an deren T-Zell-Rezeptor. Da es zwar unendlich viele verschiedene TCR gibt, aber nur sechs verschiedene MHC-II-Rezeptoren möglich sind, werden von Superantigenen eine große Anzahl an T-Zellen aktiviert (HERMAN et al., 1991).

Phytohemagglutinin (**PHA**) ist eine Familie verschiedener Isolektine der roten Feuerbohne und wirkt zellagglutinierend und mitogen auf Leukozyten (DI SABATO et al., 1987).

1.6.1 Studiendesign

Die Annahme, eine zu sterile Lebensumwelt begünstige das Auftreten allergischer Erkrankungen (Hygienehypothese), konnte durch diverse Querschnittsstudien untermauert werden. Darüber hinaus wies eine Vielzahl von Querschnittsstudien ein selteneres Auftreten von Asthma und allergischen Erkrankungen bei Kindern nach, die auf einem Bauernhof aufgewachsen sind. Als Hinweis für mögliche protektive Faktoren war der erhöhte Nachweis von Komponenten von bakteriellen Zellwänden mit dem Auftreten von allergischen Erkrankungen negativ korreliert (VON MUTIUS und SCHMID, 2006).

Die „Protection against Allergy: Study in Rural Environments (PASTURE)“- Studie wurde durchgeführt, um im Rahmen einer prospektiven Studie Expositionsfaktoren zu erfassen und in ihrer Wirkung hinsichtlich des Auftretens von Asthma und allergischen Erkrankungen zu untersuchen. Ein weiterer Schwerpunkt war die Untersuchung der genetischen und immunologischen Mechanismen der Allergieentstehung (VON MUTIUS und SCHMID, 2006).

Die 2002 begonnene Studie schloss Kinder aus fünf europäischen Ländern mit ein: Deutschland (Bayern), Österreich (Region Salzburg), die östliche Schweiz, Zentral Finnland (Kuopio) und Ostfrankreich (Besancon). 1133 werdende Mütter im dritten Trimenon ihrer Schwangerschaft konnten für die Studie gewonnen werden. Diese Kohorte wurde dann in exponierte und nicht exponierte Mütter eingeteilt. Standardisierte Fragebögen wurden kurz vor Ende der Schwangerschaft und zwei, zwölf, achtzehn und vierundzwanzig Monate nach der Geburt von den Müttern beantwortet. Die Fragebögen beinhalteten Fragen zur Gesundheit von Kind und Eltern, verschiedener landwirtschaftlicher Expositionen und zur Erfassung potentieller Confounder wie Passivrauchen oder die Familiengröße. Der Vater füllte in den ersten Lebensmonaten des Kindes ebenfalls einen Fragebogen aus. Im Zeitraum von zwei bis zwölf Monaten des Kindes führte die Mutter ein detailliertes Tagebuch zur Gesundheit, Ernährung und etwaiger landwirtschaftlicher Expositionen des Kindes. Zusätzlich wurde von beiden Eltern und den Kindern zum Zeitpunkt der Geburt und nach Ablauf eines Jahres eine venöse Blutprobe entnommen (VON MUTIUS und SCHMID, 2006).

1 Einleitung

Um zu untersuchen, ob gegebenenfalls eine Form der T_H-Zell- Differenzierung überwiegt, wurde an jedem Zeitpunkt der Blutentnahme bei den Kindern der T-Effektorzell-Status festgestellt. Zu diesem Zweck wurden die Blutproben mit einigen der oben genannten Stimuli in Zellkultur stimuliert und nach Ablauf von 24, beziehungsweise 48 Stunden aliquotiert, eingefroren und zur Messung per ELISA nach Marburg versandt. Das gemessene Muster der Zytokinkonzentrationen konnte nun mit den anderen Daten in Bezug gesetzt werden.

Nach dem ersten Lebensjahr wurde das Kind von einem Mediziner untersucht, wobei besonders auf eine etwaige Neurodermitis geachtet wurde. Waren Anzeichen vorhanden, wurde nach standardisiertem Protokoll der Schweregrad eingeschätzt (VON MUTIUS und SCHMID, 2006).

Die PASTURE-Studie war zu Beginn nur bis Ablauf des ersten Lebensjahres der Kinder finanziert; die Kinder sollten aber mindestens bis zu ihrem sechsten Lebensjahr begleitet werden. Die Studie wurde unter dem Akronym EFRAIM („Mechanisms of Early Protective Exposures on Allergy Development“) weitergeführt und die oben genannten Untersuchungen in regelmäßigen Abständen fortgeführt. Somit ist einerseits eine Verlaufsbeobachtung der Entwicklung des Immunsystems mit Bezug auf die erfassten Expositionen möglich, aber auch eine weitergehende Untersuchung des bereits gewonnenen Probenmaterials, wie zum Beispiel eine Fettsäurebestimmung in den Muttermilch-Proben (VON MUTIUS, 2009).

Die Blutentnahme zwecks Zytokinbestimmung erfolgte nun auch zu den Zeitpunkten „4,5 Jahre“ und „6 Jahre“.

1.7 Ziele der Arbeit

Zur Bestimmung der Zytokinkonzentrationen wurde die Messung aus Kulturüberstand stimulierter Blutzellen gewählt. Zur Messung wurde die gegenwärtig am besten etablierte Methode, der ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), gewählt (ELLINGTON et al., 2010; LENG et al., 2008). Die Zytokinbestimmung ist bereits mit dem Blut, welches nach der Geburt (Nabelschnurblut) (PFEFFERLE et al., 2010) und nach Ablauf des ersten Lebensjahres der Kinder entnommen wurde, durchgeführt worden. In beiden Fällen wurde das Blut jedes Studienteilnehmers mit den Stimuli

1 Einleitung

PMA+Ionomycin, LPS, und SEB stimuliert und der Kulturüberstand nach 24 und 48 Stunden gewonnen. Eine Kavität enthielt keinen Stimulus, weshalb diese Kontrolle im Folgenden als Stimulus: „Medium“ bezeichnet wird.

Der ELISA kann nur ein Zytokin pro Kavität messen. Des Weiteren waren sowohl Doppelmessungen als auch Messungen in Verdünnung nötig, um dem eingeschränkten Detektionsbereich der Methode Rechnung zu tragen.

Für die Erstellung des T-Effektorzell-Profiles nach viereinhalb und sechs Jahren wurde die Anzahl der Stimuli auf sieben und die Zahl der zu messenden Zytokine auf zehn erhöht. Die somit exponentiell ansteigende Anzahl der zu messenden Kavitäten war mit dem ELISA personell, logistisch und unter ökonomischen Aspekten nicht durchführbar. Auch ein Qualitätsverlust der Messergebnisse musste durch den Einsatz verschiedener Messpersonen befürchtet werden (LENG et al., 2008).

Aufgrund dieser Einschränkungen der ELISA-Methode wurde ein möglicher Wechsel auf eine andere Messmethode untersucht. Ein Wechsel auf eine andere Ebene, z.B. Messung der mRNAs per Multiplex Assay erschien wenig sinnvoll, zumal auch dort Einschränkungen und Probleme bestehen (DE JAGER et al., 2003).

Zur Messung der Zytokine aus Kulturüberstand wurde ein „multiplexed bead array assay“ (MBAA) der Bezeichnung „cytometric bead array“ (CBA) der Firma Becton Dickinson Biosciences für den Methodenwechsel untersucht. Mit dieser Messmethode sollten viele Zytokine in einer Kavität und Konzentrationen über einen größeren Konzentrationsbereich gemessen werden. Die Probenaufbereitung sollte einfacher und schneller als bei der ELISA-Methode sein.

Bis auf wenige Mechanismen beruht das neue Verfahren auf einer zum ELISA völlig unterschiedlichen Technik (siehe Abschnitt 2.2 und 2.3). Somit ergab sich die Frage, ob beide Methoden ähnliche Werte messen. Dies war gerade vor dem Hintergrund der prospektiven PASTURE-/EFRAIM-Studie von Interesse, da die Konzentrationswerte im Verlauf der Studie vergleichbar sein sollten. Aber auch die CBA-Assays an sich sollten einer internen Validierung unterzogen werden, um eigene Ergebnisse der Assay-Güte vor Ort zu haben (PRABHAKAR et al., 2004).

Zwar wird die ELISA-Methode als Gold-Standard in der Zytokinmessung angesehen und weit verbreitet genutzt, doch unterliegen die ELISA-Messergebnisse einer Reihe von Störfaktoren (BORG et al., 2002). Somit ist selbst zwischen zwei ELISA Kits unterschiedlicher Hersteller eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse nur mit Einschränkungen

1 Einleitung

möglich (LENG et al., 2008).

Messungen mittels ELISA stellen, ebenso wie die mittels CBA, somit nur eine Schätzung des unbekanntem wahren Wertes dar. Folglich stellt der Vergleich der Messergebnissen aus ELISA und CBA keine Kalibrierung des CBA im eigentlichen Sinne dar, sondern ist vielmehr eine Untersuchung über den Grad der Übereinstimmung der beiden Methoden (BLAND und ALTMAN, 1986).

In der Literatur gibt es verschiedene Beispiele für eine Etablierung, bzw. Validierung einer MBAA-Methode (ELSHAL und MCCOY, 2006). Zum Teil handelt es sich um Hersteller Kits, zum Teil um Reagenzien aus eigener Herstellung. Eine einheitliche Vorgehensweise fehlt bisher sowohl bei den zu testenden Gütekriterien selbst als auch bei der Testung auf ein Gütekriterium im speziellen, wodurch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschwert wird. Dies gilt insbesondere für Studien, die den Vergleich zwischen Multiplex Bead Arrays und ELISA untersuchen (PRABHAKAR et al., 2004).

Diese Arbeit umfasst das Funktionsprinzip, sowie eine klassische Testvalidierung der CBA-Methode und eine Gegenüberstellung der Ergebnisse zu bereits existierenden Ergebnissen des ELISAs.

Es wird die Vergleichbarkeit der Messergebnisse zwischen CBA und ELISA vor dem Hintergrund der PASTURE-/EFRAIM- Studie untersucht und die Vor- und Nachteile eines Methodenwechsels aufgezeigt.

Zusammenfassend werden folgende Hypothesen untersucht:

- Die CBA-Methode genügt allgemeinen Gütekriterien und generiert *vor Ort* stabile und verlässliche Messwerte.
- Die CBA-Methode ermöglicht eine bessere Durchführung von Hochdurchsatzverfahren als die ELISA-Methode bei vergleichbarer Messqualität.
- Die Messergebnisse beider Methoden von Proben aus dem Studienkollektiv sind miteinander vergleichbar.

2 Material und Methoden¹

2.1 Probengewinnung und -stimulation

Die Probengewinnung erfolgte standardisiert an den jeweiligen Studienstandorten. Das Nabelschnurblut wurde von den Hebammen direkt nach der Geburt aus der Umbilicalvene gewonnen, bei Raumtemperatur in das Studiencenter vor Ort gebracht und innerhalb von 72 Stunden zur Zytokinmessung weiterverarbeitet (s.u.) (PFEFFERLE et al., 2008; PFEFFERLE et al., 2010).

Zu den restlichen Zeitpunkten wurde aus einer peripheren Vene Blut in ein Lithium-Heparinat-Röhrchen (Volumen: 2,5 ml) entnommen. Die Röhrchen wurden bei Raumtemperatur gelagert und transportiert und mussten innerhalb von 72 Stunden am jeweiligen Studienstandort weiterverarbeitet werden (siehe Unterabschnitt 2.1.2, Probenstimulation).

Die Stimuli wurden zentral in Marburg bestellt, standardisiert vorverdünnt, aliquotiert und eingefroren. Mit Trockeneis gekühlt wurden diese sodann an die Studienstandorte verschickt (siehe Unterabschnitt 2.1.1, Vorbereitung der Stimuli).

2.1.1 Vorbereitung der Stimuli

Die Herstellung einer neuen Charge Stimuli erfolgte alle sechs Monate. Die in dieser Arbeit untersuchten Proben wurden mittels Stimuli verdünnt, die nach folgendem Schema hergestellt wurden. Eine Auflistung der genauen Herkunft findet sich in der *Liste der Materialien*.

¹die Liste der Materialien findet sich im Anhang E ab Seite XII

2 Material und Methoden

PMA 10 mg PMA wurden in 2 ml DMSO (Dimethyl Sulfoxid, Sigma, Deisenhofen) gelöst (5 mg/ml), dann wurde zwei mal eine 1:100 Verdünnung in RPMI (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) durchgeführt. Die entstandene Stock-Lösung mit der Konzentration 0,5 µg/ml wurde aliquotiert und eingefroren.

Ionomycin 1 mg Ionomycin wurde in 200 µl DMSO gelöst (5 mg/ml). Die Mischung wurde zu 800 µl RPMI hinzugegeben und danach erneut 1:10 mit RPMI verdünnt. Die entstandene Stock-Lösung (0,1 mg/ml) wurde aliquotiert und eingefroren.

LPS 10 mg LPS wurden in 10 ml RPMI gelöst (1 mg/ml). Die Mischung wurde im Verhältnis 1:100 mit RPMI verdünnt und die Stocklösung (10 µg/ml) aliquotiert und eingefroren.

SEB 1 mg SEB wurde in 10 ml RPMI gelöst (0,1 mg/ml). Eine 1:10 Verdünnung mit RPMI führte zu einer Stock-Konzentration von 10 µg/ml. Diese Lösung wurde aliquotiert und eingefroren.

PHA 5 mg PHA wurden in 10 ml RPMI gelöst (0,5 mg/ml). Diese Stock-Lösung wurde aliquotiert und eingefroren.

PGN 25 mg PGN wurden in 25 ml RPMI gelöst (1 mg/ml). Nach 15-minütigem vorsichtigen Schütteln wurde die Stock-Lösung aliquotiert und eingefroren.

Pam3CSK₄ 1 mg Pam3CSK₄ wurde in 1 ml RPMI gelöst (1 mg/ml). Diese Stock-Lösung wurde aliquotiert und eingefroren.

2.1.2 Probenstimulation

In ein 15 ml-Tube wurden 8,0 ml RPMI 1640 (GIBCO, beinhaltet 1% AB/AM (Antibiotikum/ Antimykotikum)) und 2,0 ml des Li-He-Blutes pipettiert (1:4-Verdünnung). Jeweils 500 µl dieses Gemisches wurden in die Kavitäten einer 24-well-Platte gegeben. Zusätzlich wurden 500 µl RPMI 1640, welches 1% AB/AM und 20% FCS (endotoxin-freies Fetal Calf Serum (FCS) Gold, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) beinhaltet, in jede Kavität gegeben. Im nächsten Schritt wurden die vorverdünnten

2 Material und Methoden

Stimuli mit je 10 µl pro Kavität hinzugefügt. Es ergaben sich somit folgende Endkonzentrationen der Stimuli in den Kavitäten:

Stimulus	Stock-Konzentration	Endkonzentration
1. Medium	—	—
2. PMA + Ionomycin	0,5 µg/ml + 0,1 mg/ml	5 ng/ml + 1 µg/ml
3. LPS	10 µg/ml	0,1 µg/ml
4. SEB	10 µg/ml	0,1 µg/ml
5. PHA	0,5 mg/ml	5 µg/ml
6. PGN	1 mg/ml	10 µg/ml
7. Pam3CSK	1 mg/ml	10 µg/ml

Die Platten wurden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und der Überstand teils nach 24, teils nach 48 Stunden gewonnen. Hierzu wurde der Inhalt der Kavitäten in Eppendorf Tubes pipettiert, welche fünf Minuten bei 800g zentrifugiert wurden. Der daraufhin gewonnene Überstand wurde aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. In regelmäßigen Abständen wurden die tiefgekühlten Proben nach Marburg versandt, wo zentral die ZytokinKonzentrationen gemessen wurden.

2.2 Messung mittels ELISA

Bei den Messungen zur Vergleichbarkeit der Messergebnisse von CBA und ELISA wurde ebenso verfahren, wie bei den regulären Zytokinmessungen im Rahmen der Studie. Es handelte sich hierbei um ein so genannten Sandwich-ELISA, bei dem der Analyt, hier das Zytokin, an einen Erstantikörper bindet, der am Boden und an den Seiten der Kavität verankert ist. Danach wurde ein Zweitantikörper hinzugegeben, der ebenso wie der Erste, an das Zytokin bindet. Ist nun an den Zweitantikörper ein Enzym gekoppelt, welches eine Farbumschlagreaktion katalysiert, so kann vom Ausmaß des Farbumschlags auf die Zweitantikörpermenge und somit auf die Zytokinmenge geschlossen werden. Die ELISA-Methode ist somit ein indirektes Messverfahren.

2 Material und Methoden

Gemäß *Standard Operating Procedure* (SOP) der Studie wurden ELISA Opt-EIA™-Kits der Firma BD Biosciences für die Zytokine IL-5, IL-10, IL-12p70 (im Folgenden IL-12), IFN- γ und TNF- α verwendet. Diese Kits beinhalten jeweils Erst- und Zweitantikörper, einen Standard, sowie das Enzymreagenz, welches den Farbumschlag katalysiert.

Der Erstantikörper (capture-antibody) wurde in folgenden Verhältnissen mit PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) verdünnt: IL-5, IL-10 und IFN- γ im Verhältnis 1:1000, IL-12 im Verhältnis 1:250 und TNF- α im Verhältnis 1:500. Dann wurde die 384-well-Mikrotiterplatte mit 50 μ l pro Kavität mit dem verdünnten Erstantikörper beschichtet. Die so präparierte Platte wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Kavitäten dreimal mit PBS und 0,1% Tween® 20 (Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe) gewaschen (Washer der Firma Tecan) und danach auf saugfähigem Papier ausgeschlagen.

Um ein unspezifisches Binden des zu messenden Antigens oder des Zweitantikörpers an die Platte zu verhindern, mussten freie Bindungsstellen besetzt werden. Zu diesem Zweck wurde jede Kavität mit 50 μ l PBS+10% FCS (endotoxinfreies Fetal Calf Serum Gold, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) beschickt und eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (350rpm) inkubiert.

Nach dreimaligem Auswaschen entsprechend dem oben beschriebenen Muster, wurden die Standards und die Proben mit je 50 μ l aufgetragen und für weitere zwei Stunden (bei Raumtemperatur auf dem Schüttler) inkubiert.

Jeder Standard wurde in sieben Verdünnungsstufen (im Verhältnis 1:2) je doppelt aufgetragen und der Mittelwert zur Konzentrationsbestimmung benutzt. Der Standard-Bereich von IL-5, IL-10 und IL-12 betrug 3,9 pg/ml bis 500 pg/ml und der von IFN- γ und TNF- α 7,8 pg/ml bis 1000 pg/ml. Verdünnt wurde jeweils mit PBS+10% FCS. Als Bezugsleerwert (Blank) dienten vier Kavitäten, die nur mit PBS+10% FCS befüllt waren.

Zur Messung von IL-5 und IL-12 wurden alle Proben unverdünnt aufgetragen. Zur Messung von IL-10 wurden alle Proben sowohl unverdünnt als auch mit PBS+10% FCS im Verhältnis 1:10 verdünnt aufgetragen. Zur Messung der Zytokine IFN- γ und TNF- α wurden die Proben unverdünnt und die mittels PMA/Ionomycin stimulierten Proben in den Verhältnissen 1:10, 1:20 und 1:60 verdünnt aufgetragen.

Während der Inkubationszeit band das in den Proben enthaltene Zytokin proportional zu seiner Konzentration an die in den Kavitäten enthaltenen Erstantikörper. Die darauf folgenden drei Waschgänge entfernten alles bis auf die gebundenen Zytokine.

2 Material und Methoden

Im nächsten Schritt wurde der biotinylierte Zweitantikörper (detection-antibody) mit dem Enzymreagenz (Streptavidin-horseradish peroxidase) in PBS+10% FCS in folgenden Konzentrationen verdünnt: IL-5 im Verhältnis 1:1000, IL-10, IFN- γ und TNF- α im Verhältnis 1:500 und IL-12 im Verhältnis 1:250. Das Gemisch wurde zu jeweils 50 μ l in die Kavitäten gegeben und wiederum bei Raumtemperatur für eine Stunde auf dem Schüttler (350rpm) inkubiert.

Im Folgenden wurde sechs Mal gewaschen, um sicher zu stellen, dass alle ungebundenen Zweitantikörper und somit auch die daran gebundene Peroxidase aus den Kavitäten entfernt wurden. Im Anschluss wurden 50 μ l POD-Substrat (BM Blue, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in jede Kavität gegeben und im Dunkeln inkubiert. Die Peroxidase bewirkte enzymatisch einen Farbumschlag des POD von durchsichtig in blau. Die Intensität des Farbumschlags war proportional zu der Anzahl der an den Zweitantikörper gebundenen Peroxidase-Enzyme und somit zu der Zytokinkonzentration. Die Reaktion wurde durch Zugabe von je 50 μ l 2M Schwefelsäure (H₂SO₄) beendet.

Die Absorption der jeweiligen Kavitäten wurde mittels ELISA-Reader (GENios, Tecan Austria GmbH) bei 450 nm (690 nm Referenzwellenlänge) gemessen. Die Standardkurve wurde mittels 4-Parameter-Regression aus den gemessenen Standards ermittelt. Nach Leerwertreduktion und in Bezug auf die Standardkurve wurde daraufhin mit der Software Magellan 5.03 (Tecan Austria GmbH) die jeweilige Konzentration berechnet.

In einem Durchgang konnten von 140 einzelnen Proben die fünf Zytokine IL-5, IL-10, IL-12 und IFN- γ , sowie TNF- α auf vier 384-well-Platten bestimmt werden. Es wurden pro Zytokin und Kavität 50 μ l des Probenvolumens verbraucht. Dies ergab für eine Doppelbestimmung von unverdünntem und 1:20-verdünntem Sample bei 5 Zytokinen ein mindestens benötigtes Probenvolumen von 550 μ l.

2.3 Messung mittels Cytometric Bead Array (CBA)

Für die Messung mit Hilfe eines Multiplex-Bead-Array-Assay basierten Systems wurde das Cytometric Bead Array (CBA)-System der Firma BD Biosciences verwendet.

2 Material und Methoden

Für eine Beschreibung der CBA Technologie siehe auch MORGAN et al., 2004.

Beads genannte Mikrosphären der Größe 7,5 µm tragen an ihrer Oberfläche spezifische Antikörper für ein Zytokin. Nachdem das Zytokin gebunden hat, bindet ein Zweitantikörper, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE) versehen ist, an das Zytokin. PE wird von einem Laser (grün, 532nm Wellenlänge) angeregt und die emittierte Fluoreszenzintensität (Hauptpeak bei 585nm) wird gemessen. Da diese proportional zur gebundenen Zytokinmenge ansteigt, kann in Bezug auf einen Standard auf die Zytokin-Konzentrationen in der Probe rückgeschlossen werden.

Um die Beads in einer Vorauswahl von Störmaterial unterscheiden zu können, werden alle Bead-Arten zusammen im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (forward- und sideward-scatter) identifiziert und ausgewählt. Ebenso müssen die Bead-Arten voneinander unterschieden werden. Zu diesem Zweck besitzt jede Bead-Art eine individuelle intrinsische Kombination aus zwei Fluoreszenzfarbstoffen in unterschiedlicher Konzentration. Die Farbstoffe werden von einem Laser (rot, 635nm Wellenlänge) angeregt und emittieren Licht der Wellenlängen 653-669 nm („Red“, Hauptpeak bei 660 nm) und 750-810 nm („Near Infra Red (NIR)“, Hauptpeak bei 780 nm) in einer individuellen Zusammensetzung der Intensitäten. So können die Bead-Arten voneinander unterschieden werden. Es wurden ausschließlich BD™ CBA Flex Sets der Zytokine IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, IFN-γ und TNF-α (siehe auch Liste der Materialien ab Seite XV) verwendet. Diese Kits beinhalten jeweils Beads mit Fangantikörper (capture beads), Nachweisantikörper (detection reagent) und Standards. Zusätzlich benötigte Reagenzien wie *Wash Buffer*, *Assay Diluent*, *Capture Bead Diluent* und *Detection Reagent Diluent* entstammten dem BD™CBA Master Buffer Kit (siehe auch Liste der Materialien ab Seite XV).

Zuerst wurden die Fangantikörper jedes Flex Sets in *Capture Bead Diluent* gelöst, so dass jede Kavität 1 µl jeder Bead-Art enthielt. Da zehn Zytokine aus jeder Kavität bestimmt wurden, wurden zehn verschiedene Bead-Arten benutzt. Es handelte sich somit um ein so genanntes „10-plex“-System. Von dem fertigen Gemisch wurden 40 µl in jede Kavität gegeben.

Für jedes Zytokin, das gemessen werden sollte, lag lyophilisierter Standard in Form einer kleinen Kugel vor. Die zehn Kugeln wurden in ein Reaktionsgefäß (5ml Flow Cytometry Tubes, Sarstedt) gegeben und mit 1,0 ml *Assay Diluent* rekonstituiert. Somit ergab sich nach fünfzehnminütiger Inkubationszeit für den Stock-Standard eine Konzentration von 10000 pg/ml aller zehn Zytokine. Im Folgenden wurde mittels Assay

2 Material und Methoden

Diluent elf Mal eine 1:2-Verdünnung durchgeführt. Als Leerwert (Blank, 0 pg/ml) wurde reines *Assay-Diluent* benutzt. Um Kavitäten einzusparen, wurden von den dreizehn Konzentrationsstufen (inklusive Blank) nur neun auf der Platte aufgetragen: 10000; 5000; 1250; 312,5; 80; 20; 10; 5 und 0 pg/ml. Ab der 7. Verdünnungsstufe sind die Konzentrationen der einfachen Handhabbarkeit halber leicht gerundet.

Die Proben wurden bei Bedarf ebenfalls mittels *Assay Diluent* verdünnt. Von den mittels PMA/Ionomycin stimulierten Proben wurde ein Teil im Verhältnis 1:10 verdünnt. Aus den verdünnten Proben wurden nur die Zytokine IL-6, IFN- γ und TNF- α gemessen. Die restlichen Zytokine wurden aus dem unverdünnten Teil der Proben gemessen.

Ebenso wurde ein Teil der mittels Peptidoglycan (PGN) beziehungsweise Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten Proben im Verhältnis 1:10 verdünnt, um daraus die Zytokine IL-6 und TNF- α zu bestimmen. Alle anderen Zytokine wurden auch hier aus dem unverdünnten Teil der Proben gemessen. Somit wurden für einen Teil der Proben abweichend ein „7-plex“+„3-plex“-Lauf, beziehungsweise ein „8-plex“+„2-plex“-Lauf durchgeführt. Dies war nötig, um den in unverdünntem Zustand über 10000 pg/ml liegenden Konzentrationen Rechnung zu tragen.

Im nächsten Schritt wurden Standards und Proben in einem Volumen von 50 μ l pro Kavität auf eine 96-well-Platte (Falcon® Pro-Blind™ U-Bottom, Becton Dickinson Labware) aufgetragen und fünf Minuten auf dem Schüttler (500rpm) belassen. Dann wurde die Platte für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Die Herstellung des Nachweisantikörper-Gemisches verlief entsprechend der oben beschriebenen Verfahrensweise für die Herstellung des Fangantikörper-Gemisches. Zum Verdünnen wurde *Detection Reagent Diluent* verwendet. Die in jedem Flex Set enthaltenen Detektionsreagenzien enthalten den jeweiligen PE-gekoppelten Nachweisantikörper.

Nach Ablauf der einstündigen Inkubationszeit wurde das Nachweisantikörper-Gemisch mit ebenfalls 40 μ l pro Kavität auf die Platte aufgetragen. Nach fünf Minuten auf dem Schüttler (500rpm) wurde zwei Stunden unter Lichtausschluss inkubiert.

Im Anschluss wurden die Platten fünf Minuten bei 200xg zentrifugiert, damit sich die Beads und alle daran gebundenen Moleküle als Pellet in den Kavitäten sammelten. Nun wurde der Überstand durch einfaches Umkippen der Platte verworfen und das Pellet getrocknet. Nach Zugabe von 200 μ l *Wash Buffer* pro Kavität wurden die Platten wieder für fünf Minuten bei 500rpm geschüttelt, dann zentrifugiert und ausgegossen. Nach dem Zuführen von 180 μ l *Wash Buffer* pro Kavität und nochmaligem Schütteln,

2 Material und Methoden

wurden die Platten mit dem FACSArray Bioanalyser (Becton Dickinson, San Jose, USA) gemessen.

Die Methode misst die Fluoreszenzintensität jedes einzelnen Beads. Aus allen Beads, die das selbe Zytokin binden, ermittelt der Bioanalyser den Mittelwert, die mittlere Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity, MFI). Da weit über 100, im Idealfall 300 Beads jeder Beadpopulation gemessen wurden, wobei jeder Bead allein ein Assay darstellt, wurde auf Doppelmessungen gemäß Herstellerempfehlung verzichtet.

Die Auswertung der Fluoreszenzintensitäten und der Bezug der Proben auf die Standardkurve zur Konzentrationsermittlung erfolgte mit der Software FCAP Array™ (v.1.0.1, Soft Flow, Inc., Roseville, USA). Die Standardkurve wurde mittels einer 5-Parameter-Regression errechnet.

Es konnten in einem Durchgang von 196 einzelnen Proben die zehn Zytokine IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, IFN- γ und TNF- α auf vier 96-well Platten bestimmt werden. Es wurden für beliebig viele Zytokine 55 μ l des Probenvolumens verbraucht.

2.4 BD FACSArray Bioanalyser



Abbildung 2.1: FACSArray Bioanalyser, äußerer Aspekt

Abbildung aus BD Biosciences Broschüre zum BD FACSArray Bioanalyser

Ebenso wie die ELISA-Methode ist auch die Durchflusszytometrie ein immunologisches Verfahren, welches auf Antigen-Antikörper-Verbindungen basiert. FACS steht für „fluorescence activated cell sorting“ und ist der häufig verwendete Begriff für Zelldifferenzierung, bzw. -zählung mittels Durchflusszytometrie.

Das BD FACSArray™ Bioanalyser System (Abb: 2.1) ist eine Kombination aus FACS-Gerät mit Platteneingabe-Vorrichtung für 96-well-Platten, sowie eines Computers zur

2 Material und Methoden

Speicherung und Auswertung der Messdaten. Das FACS-Gerät hat zwei Laser (grün: 532 nm, rot: 635 nm) und Detektoren für die simultane Erfassung von zwei Streulicht- (scatter) und vier emittierten Fluoreszenz-Intensitäten. Dafür sind die Detektoren mit Farbfiltern versehen (Abb: 2.2).

Mit dem FACSArray Bioanalyser lassen sich somit sowohl Zellen differenzieren als auch Bead-basierte quantitative Proteinmessungen durchführen. Das System ist vom Hersteller ausdrücklich für die Nutzung der CBA Flex Sets empfohlen.

Die Software zur Erfassung der Messdaten (FACSArray System Software) erfasst alle eingehenden Daten, sodass diese exportiert und mittels Software (FCAP Array™) bearbeitet (Gating, Kompensation) und ausgewertet werden können.

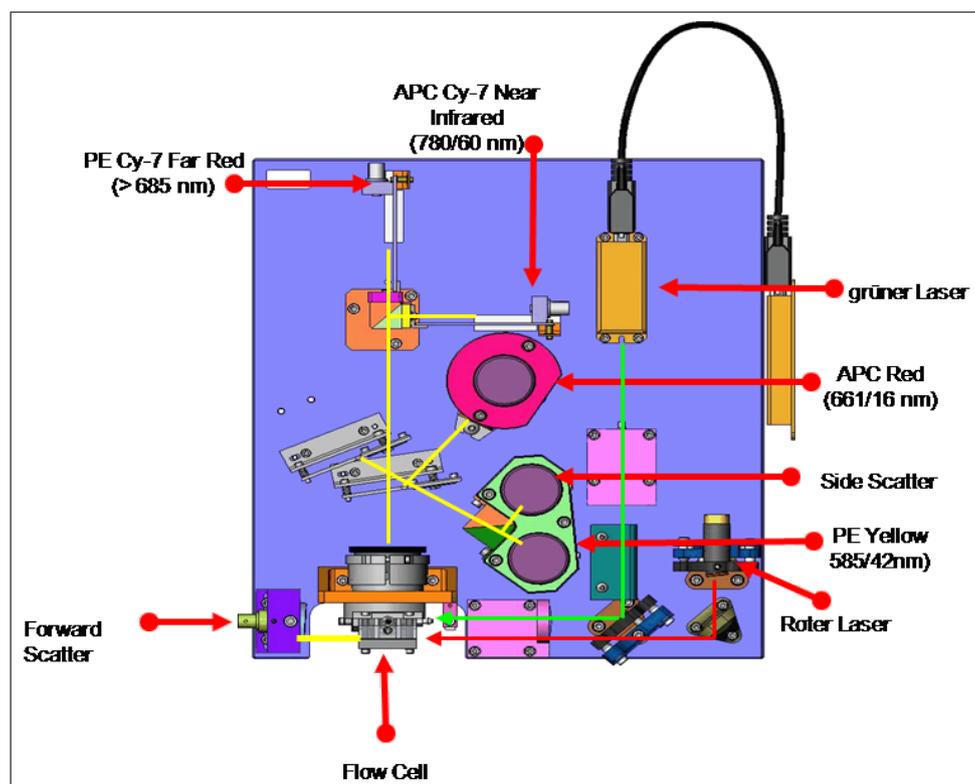


Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau des FACSArray Bioanalyzers mit Lasern, Filtern und Detektoren
Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Pfeiffer, BD Biosciences

2.5 Versuchsaufbauten und statistische Berechnungen

Die bei der Untersuchung der einzelnen Validierungsparameter und im Rahmen des Vergleichs der Messergebnisse verwendeten Versuchsaufbauten und die Berechnung der verwendeten statistischen Kennzahlen werden im Folgenden erläutert.

2.5.1 Interne Validierung des CBA

Bei den durchgeführten Messungen zur internen Validierung des CBA wurde wie in Kapitel 2.3 beschrieben verfahren. Allerdings wurden keine Studienproben verwendet, sondern die vom Hersteller BD Biosciences in den Flex Sets bereitgestellten lyophilisierten Standards bekannter Konzentration. Dies hatte den Vorteil, dass es bei den Validierungsmessungen Soll-Werte für die zu messenden Konzentrationen gab und unabhängig von biologischen Größenordnungen die große Messbandbreite des Systems für alle Zytokine getestet werden konnte.

Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Validierungsparameter und deren Kurzdefinition.

Die Größen Mittelwert $\bar{x} = \frac{1}{n} * \sum_{i=1}^n x_i$, Standardabweichung $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}}$ und Variationskoeffizient $V_K = \frac{s}{\bar{x}} * 100\%$ werden entsprechend dieser Formeln in dieser Arbeit verwendet.

2.5.2 Übereinstimmung von CBA und ELISA

An verschiedenen Tagen wurden insgesamt $n = 556$ Studienproben von vierzig Studienteilnehmern parallel per ELISA und CBA gemessen. Da zu den früheren Messzeitpunkten im Rahmen der PASTURE/EFRAIM-Studie nur die Zytokine IL-5, IL-10, IL-12, IFN- γ und TNF- α gemessen wurden, ist auch nur für diese Zytokine eine Untersuchung der Übereinstimmung sinnvoll.

Nach der Messung wurden die Werte graphisch aufgetragen und eine Regressionsana-

2 Material und Methoden

Tabelle 2.1: Definition ausgewählter Validierungsparameter

Prüfpunkt	Aussage
Probenverschleppung	Abhängigkeit der Messung einer Kavität von den Nachbarkavitäten
Kalibrationsstabilität	Variation der Messung der Standards innerhalb einer Kalibrationseinstellung
Analytische Sensitivität - LOD - LOQ	limit of detection, kleinste messbare Menge limit of quantification, kleinste quantifizierbare Menge, Bestimmungsgrenze
Funktionelle Sensitivität	Konzentrationsbereich, in dem eine Probe mit $\leq 20\%$ Variation gemessen wird
Präzision - Intra-Assay - Inter-Assay	zufällige Fehler Messpräzision, Ausmaß der Schwankung, welche durch das Messgerät selbst verursacht wird Methodenpräzision, Ausmaß der Streuung des Analyseergebnisses nach allen Schritten der Probenaufbereitung
Wiederfindung	Ausbeute nach allen Schritten der Analyse
Linearität	mathematischer Zusammenhang zwischen Messwert und Konzentration

lyse nach *Deming* vorgenommen.

Bei einer herkömmlichen linearen Regression handelt es sich um ein Verfahren, welches den Zusammenhang zwischen einer unabhängigen und einer abhängigen Variablen darstellt (LANGE und BENDER, 2007). Bei dem Vergleich der Messergebnisse der beiden Methoden hängt das Ergebnis der einen Methode jedoch nicht von dem Ergebnis der anderen Methode ab. Auch die ELISA-Methode ist mit Messfehlern behaftet. Eine herkömmliche lineare Regression trägt dem nicht Rechnung. Die Deming-Regression hingegen ist für den Fall konzipiert, dass sowohl die x-, als auch y-Werte der Wertepaare mit Fehlern behaftet sein können.

Grundsätzlich darf jedoch von einem linearen Modell ausgegangen werden, da anzunehmen ist, dass bei einer linearen Erhöhung der wahren Konzentration des Analyten in einer Probe beide Messverfahren linear ansteigende Konzentrationen messen. Somit darf die Deming-Regression angewendet werden (MARTIN, 2000).

Des Weiteren wurden *Pearsons Korrelationskoeffizient* r , sowie der *Konkordanz Korrelationskoeffizient nach Lin* (CCC_{Lin}) errechnet. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson quantifiziert die Stärke des linearen Zusammenhangs anhand einer dimensi-

2 Material und Methoden

onslosen Zahl zwischen -1 und +1. Er wird meist als alleiniges Gütekriterium für den Grad der Übereinstimmung zwischen ELISA und einem Multiplex-System verwendet (DE JAGER et al., 2003; KHAN et al., 2004; ELSHAL und MCCOY, 2006). Der Korrelationskoeffizient nach Pearson wird aus der Wurzel des Bestimmtheitsmaßes r^2 nach der Formel $r = \sqrt{r^2}$ berechnet.

Der Konkordanz Korrelationskoeffizient nach Lin stellt einen Korrekturfaktor für den Korrelationskoeffizienten nach Pearson dar, so dass nicht nur eine lineare Beziehung der Punkte untersucht wird, sondern auch die Abweichung von der ersten Winkelhalbierenden (LIN, 1989).

Die Formel zur Berechnung des CCC_{Lin} lautet nach Guggenmoos-Holzmann

(GUGGENMOOS-HOLZMANN und WERNECKE, 1996): $CCC_{Lin} = r_{Pearson} * \frac{2}{\frac{s_A}{s_B} + \frac{s_B}{s_A} + \frac{(\bar{x}_A * \bar{x}_B)^2}{s_A * s_B}}$.

Um auf einen Blick die Übereinstimmung der Methoden zu erfassen, hat sich der *Bland-Altman-Blot* als sehr hilfreich und gut interpretierbar erwiesen (BLAND und ALTMAN, 1986), weshalb er in dieser Arbeit als Darstellung gewählt wird.

3 Ergebnisse

3.1 NIBSC-Standards

Das National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) mit Sitz in England bietet biologische Standards an. Diese sind zum Teil von der WHO als internationale biologische Standards angesehen (WADHWA und THORPE, 1997; KHAN et al., 2004). Die Konzentration der Standards wird, basierend auf der biologischen Aktivität, in internationalen Einheiten (IU/ml) angegeben (LEDUR et al., 1995). Die Massen-Konzentration wird hingegen nur ungefähr angegeben (BORG et al., 2002). Die Standards werden häufig als Referenzproben für die Generierung der Standardkurven bei der Entwicklung von s.g. *in-house assays* verwendet (DE JAGER et al., 2009).

Es handelt sich bei der ELISA-Methode um die Standard-Methode zur Zytokin-Messung (ZHOU et al., 2010; LENG et al., 2008). Dennoch unterliegt auch jede ELISA-Messung Fehlern, weshalb die per ELISA gemessenen Konzentrationen nicht als die *wahren* Werte angesehen werden dürfen.

In ähnlichen Fällen wurde ein internationaler Standard eingesetzt um Umrechnungsfaktoren zwischen verschiedenen Methoden zu errechnen und für Vergleichszwecke bereitzustellen (MORGAN et al., 2004).

Von Seiten des Herstellers wurden nur für einen Teil der Zytokin Flex Sets Umrechnungsfaktoren bereitgestellt und diese waren zum Teil mit unterschiedlichen Chargen der internationalen Standards generiert worden. Des Weiteren brachte der Einsatz der Umrechnungsfaktoren in der Literatur (KHAN et al., 2004; DE JAGER et al., 2009) und bei den für diese Arbeit gemessenen Werten keine Übereinstimmung.

Auch der Versuch, mit Hilfe der NIBSC-Standards verschiedene ELISA-Kits untereinander vergleichbar zu machen, ist als erfolglos beschrieben worden (LEDUR et al., 1995).

Somit wurde diese Arbeit ohne Berücksichtigung der Umrechnungsfaktoren zu den NIBSC-Standards durchgeführt.

3.2 Interne Validierung des CBA

Die Firma BD Biosciences vertreibt mit den Zytokin Flex Sets und den Master Buffer Kits alle Reagenzien, die zur Messung der jeweiligen Proteine aus Zellkulturüberstand nötig sind. Die Reagenzien sind aufeinander abgestimmt und durchlaufen interne Qualitätskontrollen.

Jede neue Charge Flex Sets mit Standard, Capture Beads und PE Detection Reagent wird auf Präzision (Wiederholpräzision und Vergleichspräzision), Wiederfindung und Verdünnungslinearität getestet und die Ergebnisse werden im Booklet der Flex Sets mitgeteilt. Diese Werte sind zu Vergleichszwecken neben den für diese Arbeit ermittelten Werten in den jeweiligen Unterabschnitten angegeben.

Die hier getesteten Flex Sets entstammen der selben Charge, die auch für die regulären Messung der Studienproben verwendet wurde.

3.2.1 Probenverschleppung

Ein Standard mit einer hohen Konzentration wurde in einem Muster über die Platte verteilt aufgetragen, gemessen und das prozentuale Verhältnis der jeweiligen Konzentration zum Durchschnittswert betrachtet. Es wurden 20 Kavitäten untersucht. Der gemessene Mittelwert beträgt 5226,43 pg/ml. In Abbildung 3.1 sind die prozentualen Verhältnisse der einzelnen gemessenen Werte zum Mittelwert angegeben.

3 Ergebnisse

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	103,8%	114,6%				105,0%	111,3%				101,5%	85,7%
B												
C												
D	101,5%	92,7%			102,6%	94,8%	101,5%				94,8%	98,1%
E												
F												
G												
H	97,0%	100,3%			102,6%	105,0%	95,9%				92,2%	99,2%

Abbildung 3.1: Einfluss der Plattenposition auf die gemessene Konzentration

Die Werte variieren gleichmäßig um 100% (Ausreißer: A2, 114,6%). Es lässt sich kein Muster erkennen, welches auf eine Probenverschleppung hindeutet oder eine systematische Fehlmessung in einem Areal der Platte erkennen lässt.

3.2.2 Kalibrationsstabilität

Ein wichtiger Bestandteil der Flex Sets sind die lyophilisierten Standards. Sie sind die Grundlage für die Umrechnung des rohen Messwertes in die gesuchte Konzentration. Vor diesem Hintergrund ist es für eine gleichbleibende Messqualität wichtig, dass eine möglichst geringe Variabilität der gemessenen Rohwerte der einzelnen Standardverdünnungen während eines Messdurchlaufes an verschiedenen Tagen besteht. In Abbildung 3.2 sind die Rohwerte (MFI) der Standards von $n = 4$ verschiedenen Messtagen aufgetragen. Sie veranschaulichen das Ausmaß der Variabilität der Rohmesswerte der Standards innerhalb einer Gerätekalibration.

3 Ergebnisse

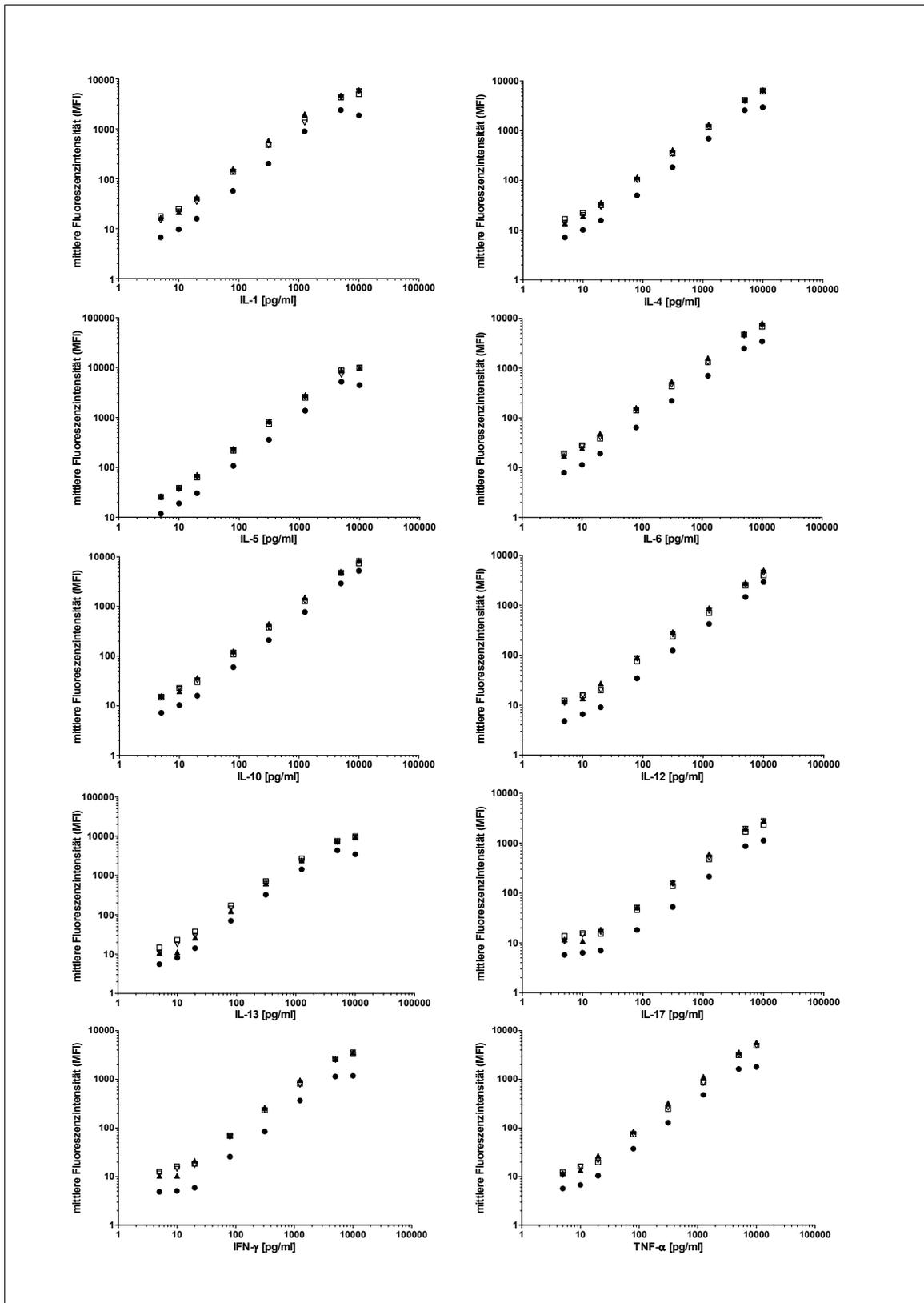


Abbildung 3.2: Rohwerte der Standardverdünnungen an vier Messtagen

3 Ergebnisse

Nachdem anhand der Standardreihe die Standardkurve erstellt wurde, wurden die MFI der Standards einzeln auf die Standardkurve bezogen. So konnte auf die gleiche Weise ein Konzentrationswert generiert werden, wie bei den zu messenden Proben. Dies wurde bei jedem Messdurchgang durchgeführt. Der nun errechnete Variationskoeffizient V_K dieser Konzentrationswerte, ist ein Maß für die Schwankung der Standards in den einzelnen Konzentrationsstufen. Grundlage bildet dieselbe Messreihe wie zuvor.

Die Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die Schwankung der einzelnen Standardkonzentrationen.

Tabelle 3.1: Ausmaß der Schwankung ausgewählter Standardkonzentrationsstufen verschiedener Messtage mit gleicher Geräteeinstellung

V_K [%]	Konzentrationsstufen der Standards in [pg/ml]							
	5	10	20	80	312,5	1250	5000	10000
IL-1β	4,99%	7,39%	9,14%	6,30%	9,76%	13,70%	17,42%	21,12%
IL-4	10,46%	6,44%	12,04%	4,68%	2,34%	3,50%	10,05%	9,52%
IL-5	2,02%	7,23%	4,86%	3,21%	6,87%	1,84%	14,22%	12,76%
IL-6	7,56%	7,26%	12,56%	1,98%	4,61%	1,33%	6,49%	4,78%
IL-10	2,19%	9,40%	10,29%	4,87%	0,33%	2,08%	4,38%	3,16%
IL-12	8,64%	13,54%	17,35%	5,60%	1,56%	3,37%	6,46%	4,01%
IL-13	8,68%	15,35%	12,58%	4,38%	5,54%	9,34%	17,61%	22,53%
IL-17	14,55%	25,81%	23,85%	10,20%	2,86%	6,75%	3,90%	3,84%
IFN-γ	15,89%	17,33%	27,66%	6,29%	7,20%	5,96%	13,03%	9,01%
TNF-α	10,79%	12,37%	18,39%	3,04%	5,36%	3,71%	11,71%	9,54%

Allen Zytokinen ist gemeinsam, dass die Standards im mittleren Konzentrationsbereich von 80 bis 1250 pg/ml die geringsten Schwankungen aufweisen. Teilweise sind die Schwankungen im hohen Konzentrationsbereich deutlich höher; eine Ausnahme bilden hier die Zytokine IL-6, IL-10, IL-12 und IL-17. Diese Zytokine haben in unterschiedlichem Ausmaß die höchsten Schwankungen im niedrigen Konzentrationsbereich von 5 bis 20 pg/ml. IFN- γ und TNF- α haben im niedrigen Konzentrationsbereich die größten Schwankungen, variieren jedoch auch im hohen Konzentrationsbereich stark.

3.2.3 Analytische Sensitivität

Der Hersteller gibt als theoretische Bestimmungsgrenze die Konzentration des niedrigsten Standards an. Die Bestimmungsgrenze hängt jedoch zusätzlich von der Größe des Messbereichs ab. Das System ist bauartbedingt in der Lage, fünf log-Stufen der Intensität des Messsignals auszuwerten. Liegen die Konzentrationen der Standards näher zusammen, ergibt sich ein höheres Auflösungsvermögen in diesem Bereich. Folgender Test wurde durchgeführt, um für die im Rahmen der Studienmessungen verwendeten Standardkonzentrationen absolute untere Grenzen festzulegen.

Assay Diluent, die Matrix, in der die Proben und der Standard verdünnt wurden, wurde 10-fach ohne den Zusatz eines Zytokins (Blank) gemessen und der Mittelwert \bar{x} , sowie die Standardabweichung s errechnet. Danach wurden nun die kleinste messbare Menge $LOD = \bar{x} + 3 * s$ (analog zu BORG et al., 2002) und die kleinste quantifizierbare Menge $LOQ = \bar{x} + 10 * s$ definiert. Sie stellen eine Art „Hintergrundrauschen“ und somit die untere Grenze des Messbereichs des Systems dar.

Tabelle 3.2 zeigt die errechneten Werte für LOD und LOQ. Die 95%-Konfidenzintervalle sind in Klammern angegeben. Die vom Hersteller ermittelten Werte für das Detektionslimit der hier verwendeten Charge sind in der rechten Spalte ebenfalls aufgeführt. Die Werte entstammen einer 30-fach durchgeführten Leermessung (Blank) nach der Formel: limit of detection = $\bar{x} + 2 * s$.

Tabelle 3.2: Analytische Sensitivität - LOD und LOQ mit 95%-Konfidenzintervallen, rechte Spalte: Herstellerwerte

	LOD [pg/ml] (95% -Konfidenz- intervall)	LOQ [pg/ml] (95% -Konfidenz- intervall)	Herstellerwerte limit of detection [pg/ml]
IL-1β	2,48 (2,12-2,84)	6,50 (6,14-6,85)	2,3
IL-4	1,69 (1,45-1,92)	4,34 (4,10-4,57)	1,4
IL-5	1,30 (1,14-1,47)	3,14 (2,98-3,30)	1,1
IL-6	1,92 (1,65-2,18)	4,89 (4,62-5,15)	1,6
IL-10	2,31 (2,01-2,61)	5,71 (5,41-6,01)	0,13
IL-12	5,25 (4,56-5,94)	13,04 (12,35-13,73)	0,6
IL-13	1,69 (1,45-1,94)	4,45 (4,21-4,70)	0,6
IL-17	8,14 (7,00-9,28)	20,98 (19,84-22,11)	0,3
IFN-γ	5,94 (5,12-6,76)	15,19 (14,37-16,00)	1,8
TNF-α	3,87 (3,32-4,43)	10,17 (9,62-10,73)	0,7

3 Ergebnisse

Sämtliche ermittelte LOD- und LOQ-Werte sind relativ niedrig, wenn auch nicht so niedrig wie die limit-of-detection-Werte des Herstellers. Einzig die Ergebnisse für die kleinste quantifizierbare Menge der Zytokine IL-12, IL-17, IFN- γ und TNF- α liegen im niedrigen zweistelligen Bereich.

3.2.4 Funktionelle Sensitivität

Eine Verdünnungsreihe aus 12 Verdünnungsstufen wurde dreifach gemessen und aus den Mittelwerten und den Standardabweichungen für jedes Zytokin bei jeder Verdünnungsstufe der Variationskoeffizient V_K errechnet. Analog zum Vorgehen von Grebenchtchikov et al. (GREBENCHTCHIKOV et al., 2005), stellt die Konzentration im niedrigen Konzentrationsbereich, bei der ein V_K von 20% erreicht oder überschritten wird, im Rahmen dieser Messungen eine Grenze dar, unter der keine verlässlichen Werte mehr generiert werden können, da die Variation schon bei ein und derselben Konzentration zu hoch ist.

Wenn der Variationskoeffizient in keiner Verdünnungsstufe 20% übersteigt, wurde anhand der V_K -Werte eine Konzentration ausgewählt, bei der der V_K mit Bezug auf die benachbarten Werte beginnt, deutlich zu steigen. In der Tabelle 3.3 sind die V_K -Werte der niedrigen Konzentrationen bis 312,5 pg/ml angegeben und der Grenzwert farbig hervorgehoben. Die Darstellungen in Abbildung 3.5 im Unterkapitel 3.2.7 (Verdünnungslinearität, Seite 51) zeigen die gemessenen Werte noch einmal grafisch.

3 Ergebnisse

Tabelle 3.3: V_K -Werte der Verdünnungsreihe im niedrigen Konzentrationsbereich, Grenzwerte hervorgehoben

V_K [%]	Konzentrationsstufen in [pg/ml]							
	2,5	5	10	20	40	80	156	312,5
IL-1β	15,28%	9,64%	13,86%	3,55%	5,07%	7,09%	5,69%	1,47%
IL-4	9,48%	11,65%	11,25%	4,10%	5,51%	7,09%	4,64%	4,25%
IL-5	6,43%	6,50%	1,59%	7,92%	7,22%	5,14%	8,27%	3,37%
IL-6	6,00%	15,90%	6,71%	4,75%	3,85%	4,92%	0,59%	0,79%
IL-10	19,39%	12,83%	13,40%	1,15%	4,99%	5,11%	3,31%	1,88%
IL-12	15,97%	32,35%	31,06%	5,39%	6,92%	5,43%	1,29%	3,64%
IL-13	12,02%	7,83%	6,75%	5,49%	4,74%	4,76%	2,05%	5,21%
IL-17	87,47%	54,95%	21,89%	17,78%	13,99%	17,08%	2,13%	9,07%
IFN-γ	26,07%	38,53%	23,24%	6,74%	6,06%	5,55%	7,94%	7,72%
TNF-α	2,76%	23,63%	21,79%	1,47%	10,51%	6,16%	3,14%	2,82%

Die Ergebnisse der funktionellen Sensitivität gehen mit den Ergebnissen für die analytische Sensitivität einher. Bei Zytokinen mit etwas höherem LOD, bzw. LOQ liegt auch meist ein etwas höherer Konzentrationsbereich vor, unter dem mit stark ansteigendem Variationskoeffizienten gemessen wurde. Dies gilt insbesondere für das IL-17 Set, welches zwar oberhalb von 10 pg/ml unter der 20%-Grenze liegt, jedoch bis 80 pg/ml Messwerte mit vergleichsweise hoher Variabilität produziert.

Andere Flex Sets, wie beispielsweise das zur IL-5 Messung, weisen auch im niedrigen Konzentrationsbereich sehr kleine Variationskoeffizienten auf.

3.2.5 Präzision

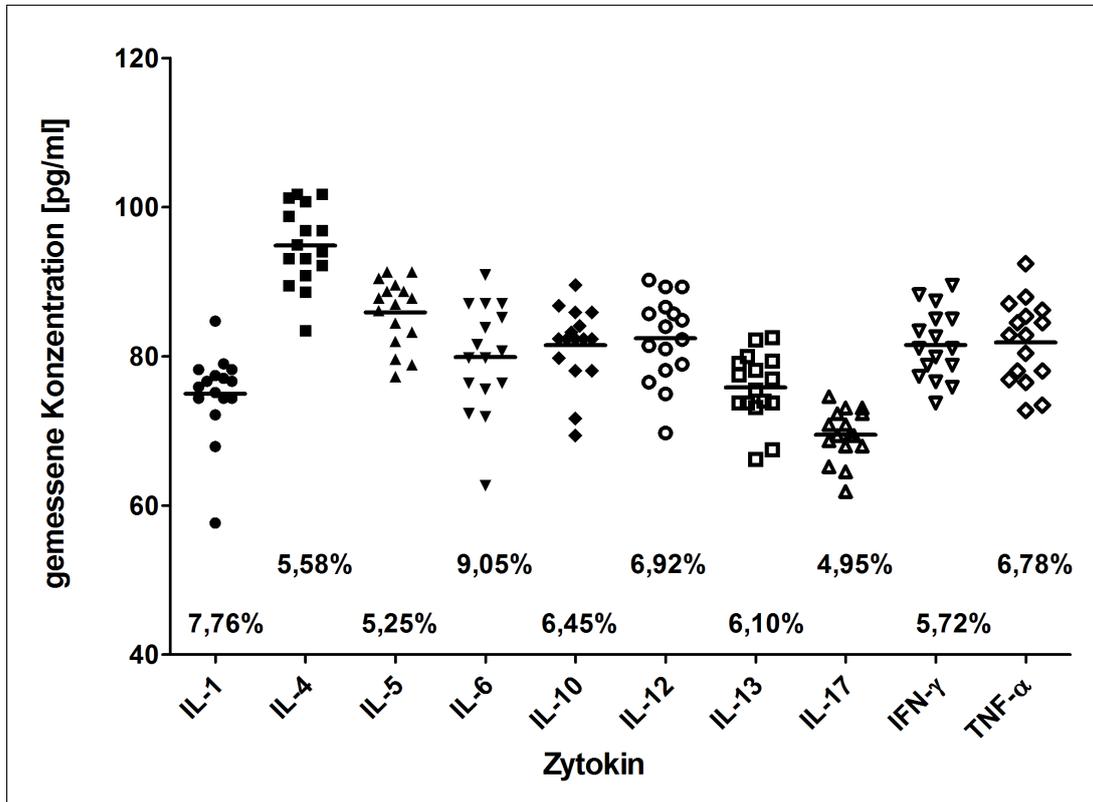
Messpräzision / Intraassay

Der Test auf Messpräzision wird auch als „intraassay-test“ oder als „within-run-test“ bezeichnet. Zu einem Zeitpunkt auf einer Platte wurde in $n = 16$ Kavitäten die selbe Probe gemessen. Dies wurde für fünf Konzentrationsstufen, über den Messbereich verteilt, für jedes Zytokin durchgeführt. Sodann wurde der Variationskoeffizient ermittelt, welcher ein Maß für die Genauigkeit des isolierten Messvorganges darstellt.

3 Ergebnisse

Der Variationskoeffizient hat den Vorteil, dass er von der Höhe der Messwerte bereinigt ist und kann somit zum Vergleich über die verschiedenen Konzentrationsstufen herangezogen werden.

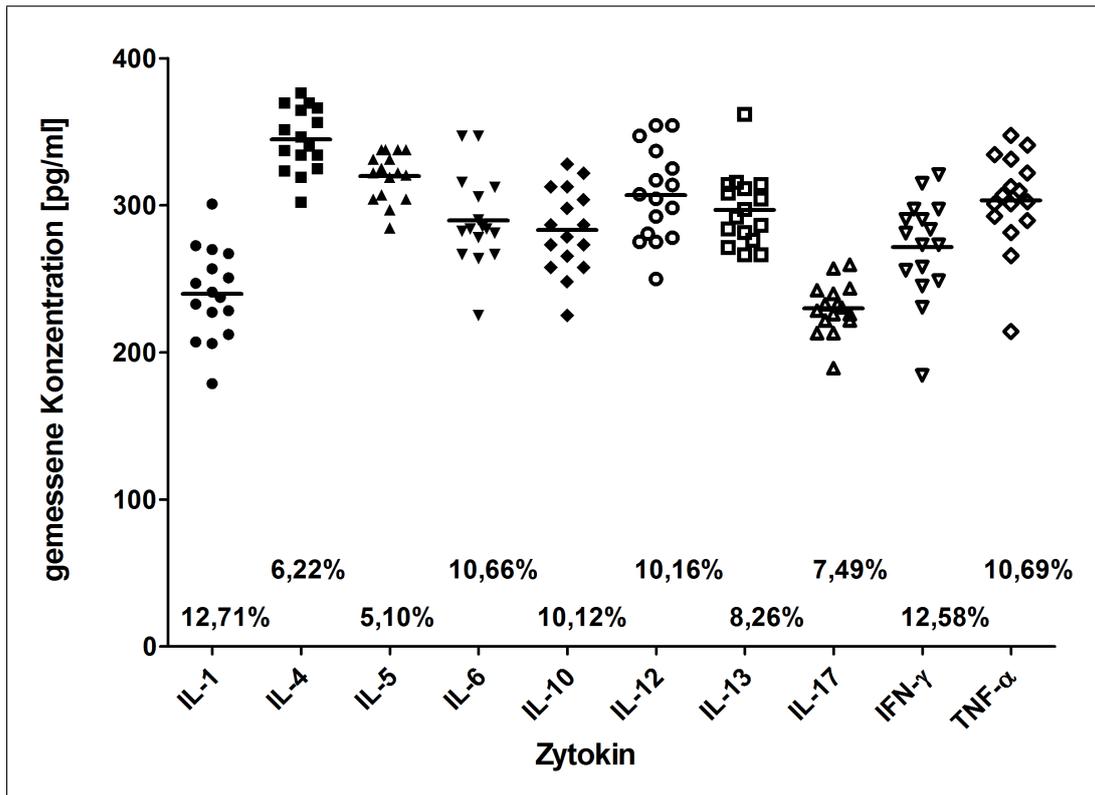
In den Darstellungen (a) bis (e) der Abbildung 3.3 sind die Messergebnisse der Flex Sets grafisch in aufsteigender Konzentration dargestellt. Zusätzlich sind die Variationskoeffizienten der jeweiligen Messergebnisse angegeben.



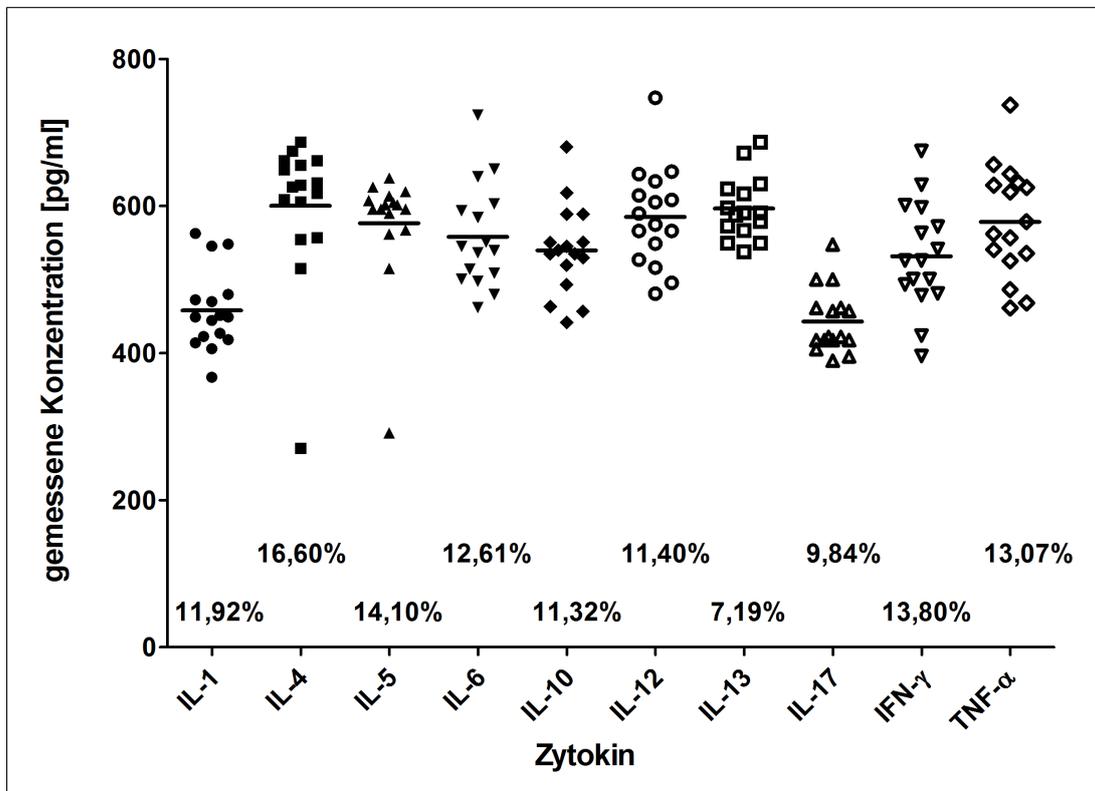
(a)

Abbildung 3.3: Intra-Assay Variation, Variationskoeffizienten in % angegeben

3 Ergebnisse



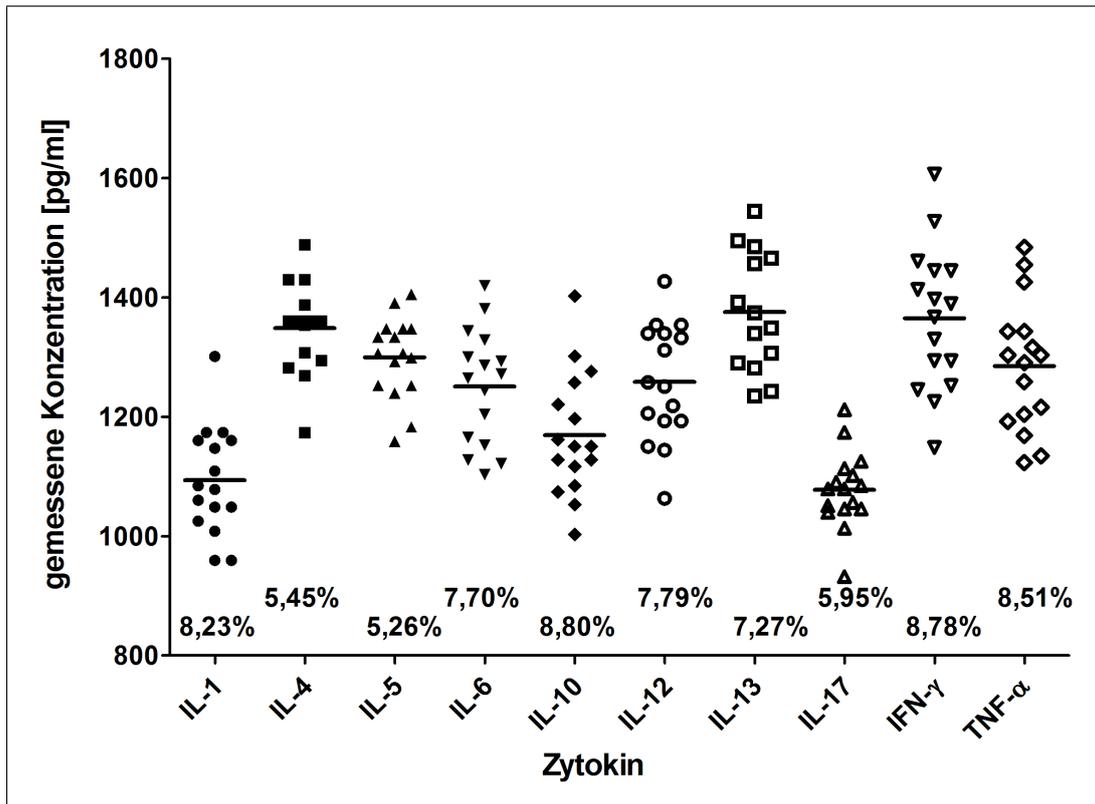
(b)



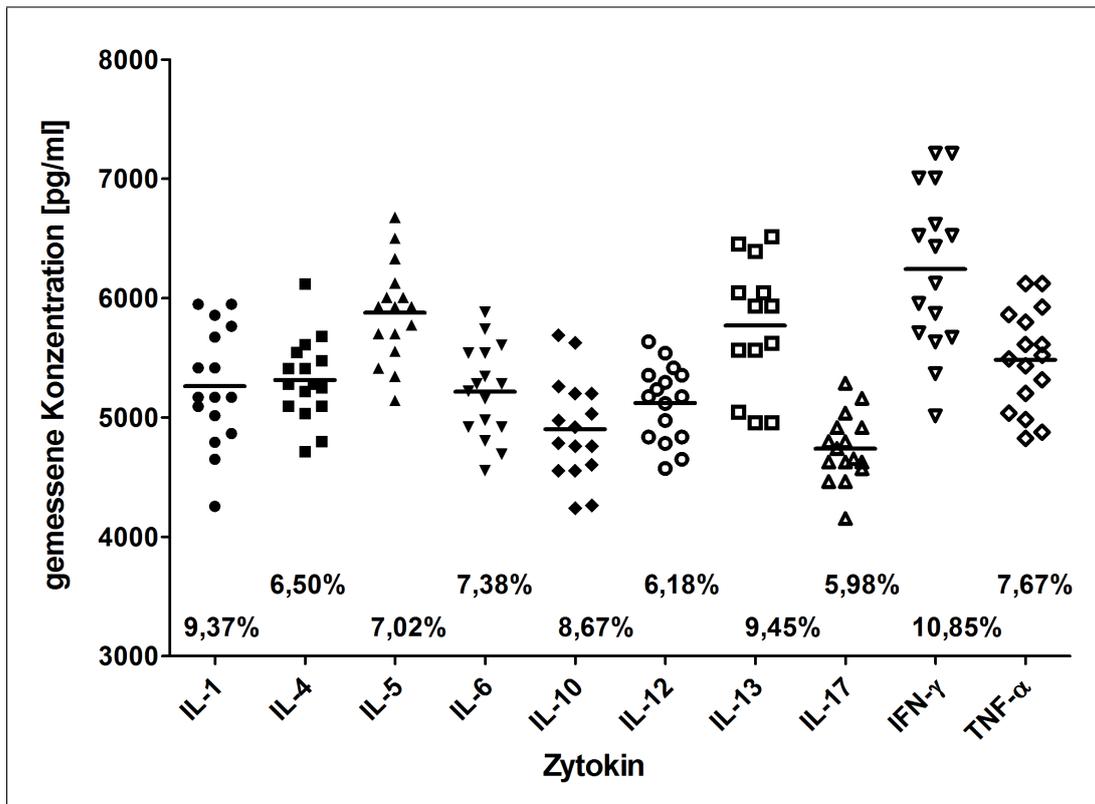
(c)

Abbildung 3.3: Intra-Assay Variation, Variationskoeffizienten in % angegeben

3 Ergebnisse



(d)



(e)

Abbildung 3.3: Intra-Assay Variation, Variationskoeffizienten in % angegeben

3 Ergebnisse

Die Variationskoeffizienten aller Konzentrationsstufen und gemessenen Zytokin Flex Sets liegen unter 15%, oft im mittleren einstelligen Bereich. Einzig der V_K einer Konzentrationsstufe von IL-4 beträgt 16,6%.

Tabelle 3.4 zeigt die mittleren gemessenen Variationskoeffizienten, die vom Hersteller angegebenen V_K und Werte aus der Literatur.

Tabelle 3.4: mittlere Variationskoeffizienten der **Messpräzision** nach Zytokin, Vergleich mit Werten aus der Literatur

Zytokin	mittlerer V_K eigene Werte ¹	mittlerer V_K Herstellerangabe ²	mittlerer V_K Morgan et al. ³	mittlerer V_K Chen et al. ⁴	mittlerer V_K Hodge et al. ⁵
IL-1 β	10,00%	3,0%	—	—	—
IL-4	8,07%	3,3%	4,0%	6,2%	4%
IL-5	7,34%	7,0%	4,7%	—	4,7%
IL-6	9,48%	2,6%	6,3%	—	*
IL-10	9,07%	3,6%	2,3%	6,8%	2,3%
IL-12	8,49%	3,3%	3,7%	7,1%	*
IL-13	7,66%	2,3%	—	—	—
IL-17	6,84%	2,6%	—	—	—
IFN- γ	10,35%	2,6%	3,7%	5,1%	3,7%
TNF- α	9,34%	2,0%	4,0%	6,1%	4%

¹ 16-fach Messungen, 5 Konzentrationsstufen *BD CBA Flex Sets*

² 10-fach Messungen, 3 Konzentrationsstufen *BD CBA Flex Sets*

³ 10-fach Messungen, 3 Konzentrationsstufen *BD CBA T_H1/T_H2 cytokine kit* (MORGAN et al., 2004)

⁴ 6-fach Messungen, 2 Konzentrationsstufen *Becton Dickinson, interne Reagenzien* (CHEN et al., 1999)

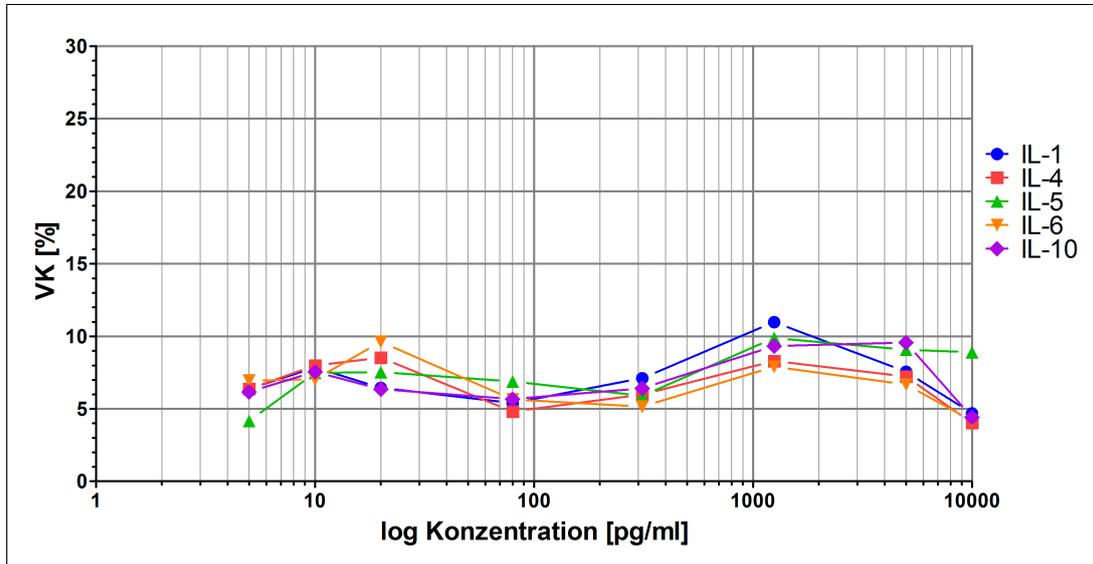
⁵ 10-fach Messungen, 3 Konzentrationsstufen (alle Zytokine gemittelt: <6%,* ermittelt, aber nicht angegeben) *BD CBA T_H1/T_H2 cytokine kit, inflammatory cytokine kit* (HODGE et al., 2004)

Methodenpräzision / Interassay

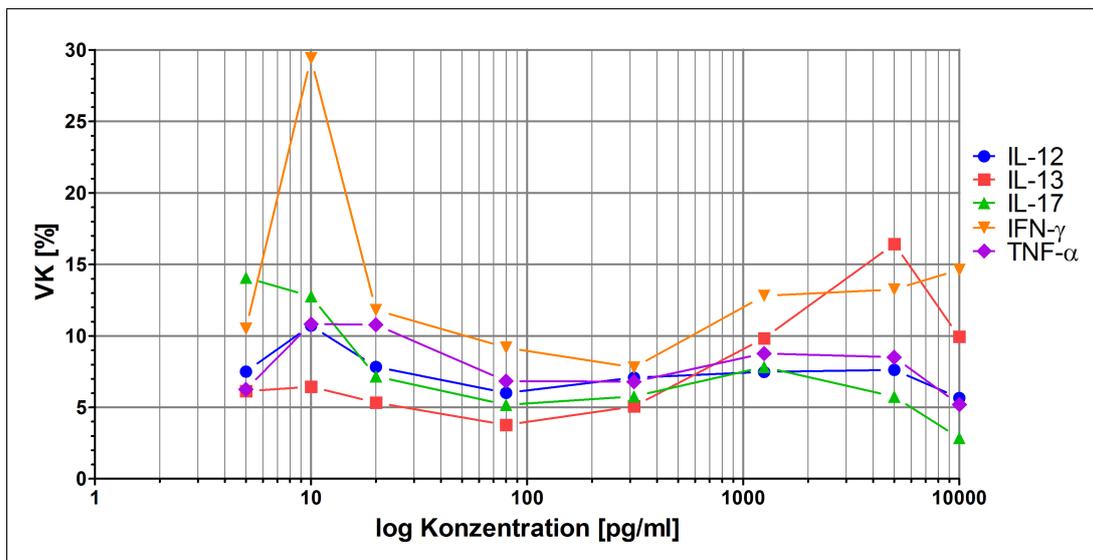
Die Methodenpräzision wird auch als „interassay-imprecision“ oder als „total imprecision“ bezeichnet. Die Standards der Messungen, welche im Rahmen der PASTURE-/EFRAIM-Studie durchgeführt werden, entstammen einer Produktionscharge. Da die Standards bei jeder Messung den gesamten Probenaufbereitungsvorgang durchliefen, stellt die Variabilität ihrer Konzentration eine Kenngröße für die Methodenpräzision dar. Es wird der Variationskoeffizient acht verschiedener Konzentrationsstufen einer 1:2-Verdünnungsreihe von $n = 17$ Messtagen betrachtet.

3 Ergebnisse

In der folgenden Abbildung 3.4 ist der V_K an den einzelnen Verdünnungsstufen dargestellt. Aus Gründen der besseren Darstellung wurden die Werte auf zwei Graphen aufgeteilt.



(a)



(b)

Abbildung 3.4: Inter-Assay Variationskoeffizienten verschiedener Konzentrationsstufen

Die Variationskoeffizienten der Methodenpräzision betragen im Regelfall unter 15%, oft sogar unter 10%. Die Tabelle 3.5 gibt einen Überblick über die mittleren Variations-

3 Ergebnisse

koeffizienten im Vergleich zu den Herstellerangaben, den Werten aus der Literatur, sowie internen Werten der Positivkontrollen der PASTURE-Studie.

Tabelle 3.5: mittlere Variationskoeffizienten der **Methodenpräzision** nach Zytokin, Vergleich mit Werten aus der Literatur

Zytokin	mittlerer V _K eigene Werte ¹	mittlerer V _K Herstellerangabe ²	mittlerer V _K Morgan et al. ³	mittlerer V _K Hodge et al. ⁴	mittlerer V _K PASTURE-ELISA ⁵
IL-1β	7,05%	8,3%	—	—	—
IL-4	6,65%	6,0%	5,3%	5,3%	—
IL-5	7,48%	7,6%	6,7%	6,7%	21,04%
IL-6	6,64%	6,6%	9,0%	*	—
IL-10	6,93%	9,0%	5,7%	5,7%	18,54%
IL-12	7,49%	3,0%	7,3%	*	15,25%
IL-13	7,87%	4,0%	—	—	—
IL-17	7,67%	7,3%	—	—	—
IFN-γ	13,66%	5,3%	8,0%	8%	20,99%
TNF-α	7,99%	3,6%	6,7%	6,7%	20,62%

¹ 1-fach Messungen, 8 Konzentrationsstufen, 17 Messtage *BD CBA Flex Sets*

² 2-fach Messungen, 3 Konzentrationsstufen, 4 Messtage *BD CBA Flex Sets*

³ 2-fach Messungen, 3 Konzentrationsstufen, 4 Messtage *BD CBA T_H1/T_H2 cytokine kit* (MORGAN et al., 2004)

⁴ 2-fach Messungen, 3 Konzentrationsstufen, 4 Messtage (alle Zytokine gemittelt: <10%,* ermittelt, aber nicht angegeben) *BD CBA T_H1/T_H2 cytokine kit, inflammatory cytokine kit* (HODGE et al., 2004)

⁵ 2-fach Messungen, 4 Konzentrationsstufen, *ELISA OptEIA Kits*

3.2.6 Wiederfindung

Bei dem Test auf Wiederfindung wurde einer Probe, welche keinen Analyten enthält, eine bekannte Menge der einzelnen Zytokine zugesetzt. Nachdem sämtliche Schritte der Analyse durchlaufen wurden, wurde die Ausbeute nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Wiederfindungsrate: } W = \frac{\bar{x} - x_0}{x_R} * 100\%$$

x_0 war hierbei die ursprüngliche Konzentration, hier gleich Null, x_R war der Wert der zugesetzten Konzentration. Der Mittelwert \bar{x} wurde im Regelfall aus vier Messungen, bei IL-5, IL-10 und IFN-γ aus fünf und bei IL-17 aus drei Messungen errechnet.

3 Ergebnisse

Die Tabelle 3.6 zeigt die errechneten Werte für die Wiederfindungsrate anhand von zwei verschiedenen zugesetzten Konzentrationen für die einzelnen Zytokine.

Tabelle 3.6: Wiederfindungsrate von zwei zugesetzten Konzentrationen, Werte in [pg/ml]

	x_R	\bar{x}	W		x_R	\bar{x}	W
IL-1β	625	632,44	101,2%	IL-12	625	605,53	96,9%
	1250	1505,30	120,4%		1250	1183,55	94,7%
IL-4	625	598,34	95,7%	IL-13	625	608,26	97,3%
	1250	1298,02	103,8%		1250	1378,96	110,3%
IL-5	625	610,27	97,6%	IL-17	625	615,76	98,5%
	1250	1414,26	113,1%		1250	1243,84	99,5%
IL-6	625	614,43	98,3%	IFN-γ	625	624,86	100,0%
	1250	1253,91	100,3%		1250	1354,84	108,4%
IL-10	625	606,34	97,0%	TNF-α	625	617,38	98,8%
	1250	1226,32	98,1%		1250	1325,90	106,1%

Tabelle 3.7 zeigt die Werte des Herstellers. Zellkulturüberstand wurde mit drei verschiedenen Proteinlevels aufgestockt und gemessen. Die Messungen wurden nun mit den Erwartungswerten verglichen. Gegeben ist die durchschnittliche Wiederfindungsrate und der Bereich, in dem sich die gemessenen Werte befanden.

Tabelle 3.7: Wiederfindungsrate - Ergebnisse des Herstellers

	durchschnittl. Wiederfindung	Bereich		durchschnittl. Wiederfindung	Bereich
IL-1β	77%	69 - 91%	IL-4	87%	85 - 89%
IL-5	88%	78 - 100%	IL-6	86%	76 - 96%
IL-10	83%	77 - 90%	IL-12	83%	80 - 85%
IL-13	111%	107 - 118%	IL-17	91%	86 - 96%
IFN-γ	88%	81 - 93%	TNF-α	75%	61 - 87%

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse liegen im Regelfall im Bereich $100\% \pm 10\%$, im Ausnahmefall bei bis zu 20% Abweichung.

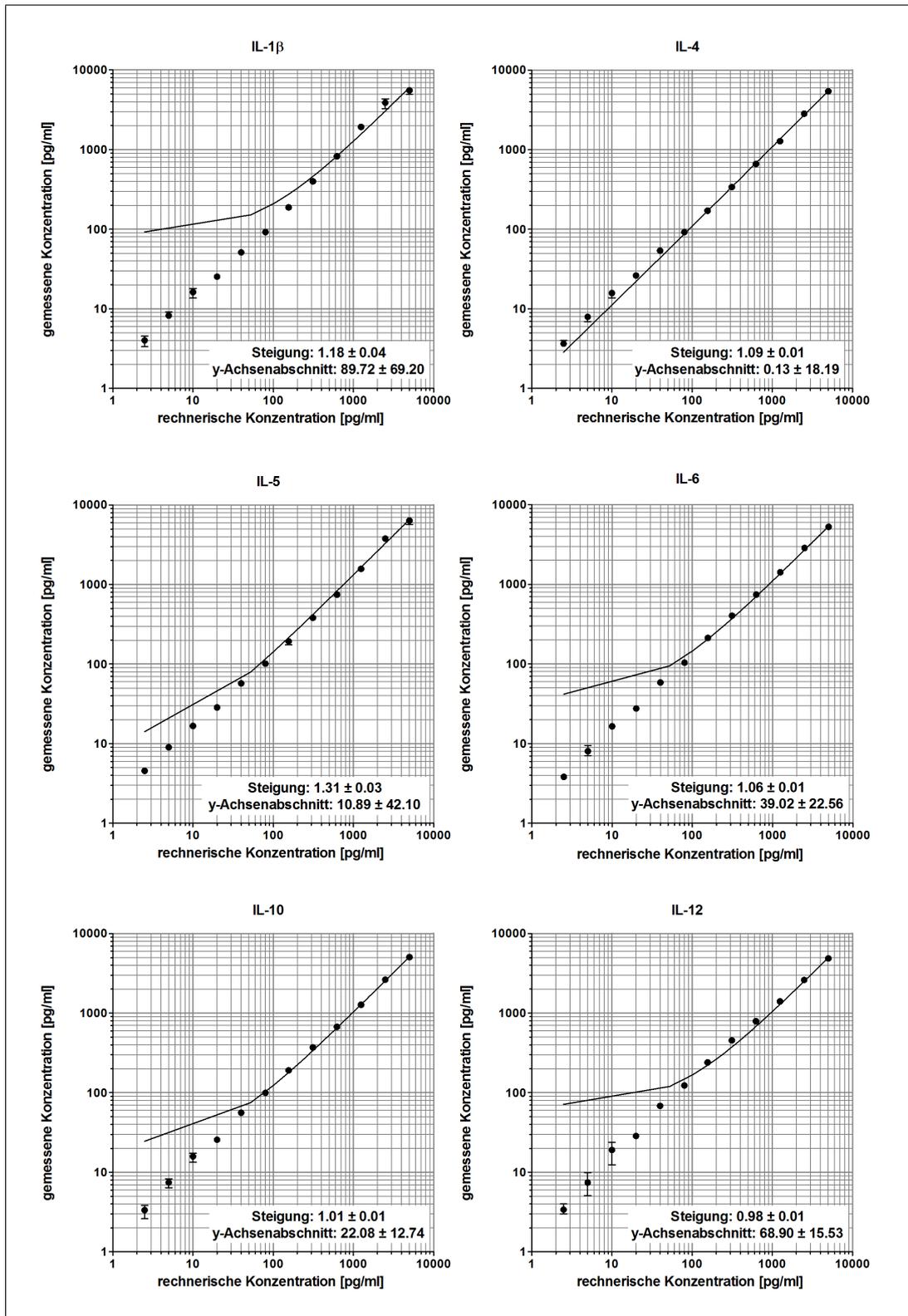
3.2.7 Verdünnungslinearität

Eine Probe Kulturmedium wurde mit einer hohen Konzentration des Analyten aufgestockt und dann in einer Verdünnungsreihe 11 mal 1:1 herunter verdünnt. Es ergab sich ein getesteter Bereich von 2,5 bis 5000 pg/ml. Die einzelnen Verdünnungsstufen wurden 3-fach aufgetragen, gemessen und die Mittelwerte \bar{x} der Konzentrationen errechnet.

Die gemessenen Werte wurden im Verhältnis zu den errechneten Werten grafisch aufgetragen und eine Regressionsgerade ermittelt. Sie beschreibt die Messergebnisse entlang der Verdünnungsreihe. Idealerweise besteht über den gesamten Messbereich ein linearer Zusammenhang.

Die Graphen der Abbildung 3.5 zeigen die mittleren Konzentrationswerte mit der Verteilung der Einzelmessungen, sowie die Regressionsgerade mit Steigung und y-Achsenabschnitt und deren Standardabweichungen. Der Umstand, dass die Geraden abknicken, ist mit der doppelt-logarithmischen Darstellung zu erklären.

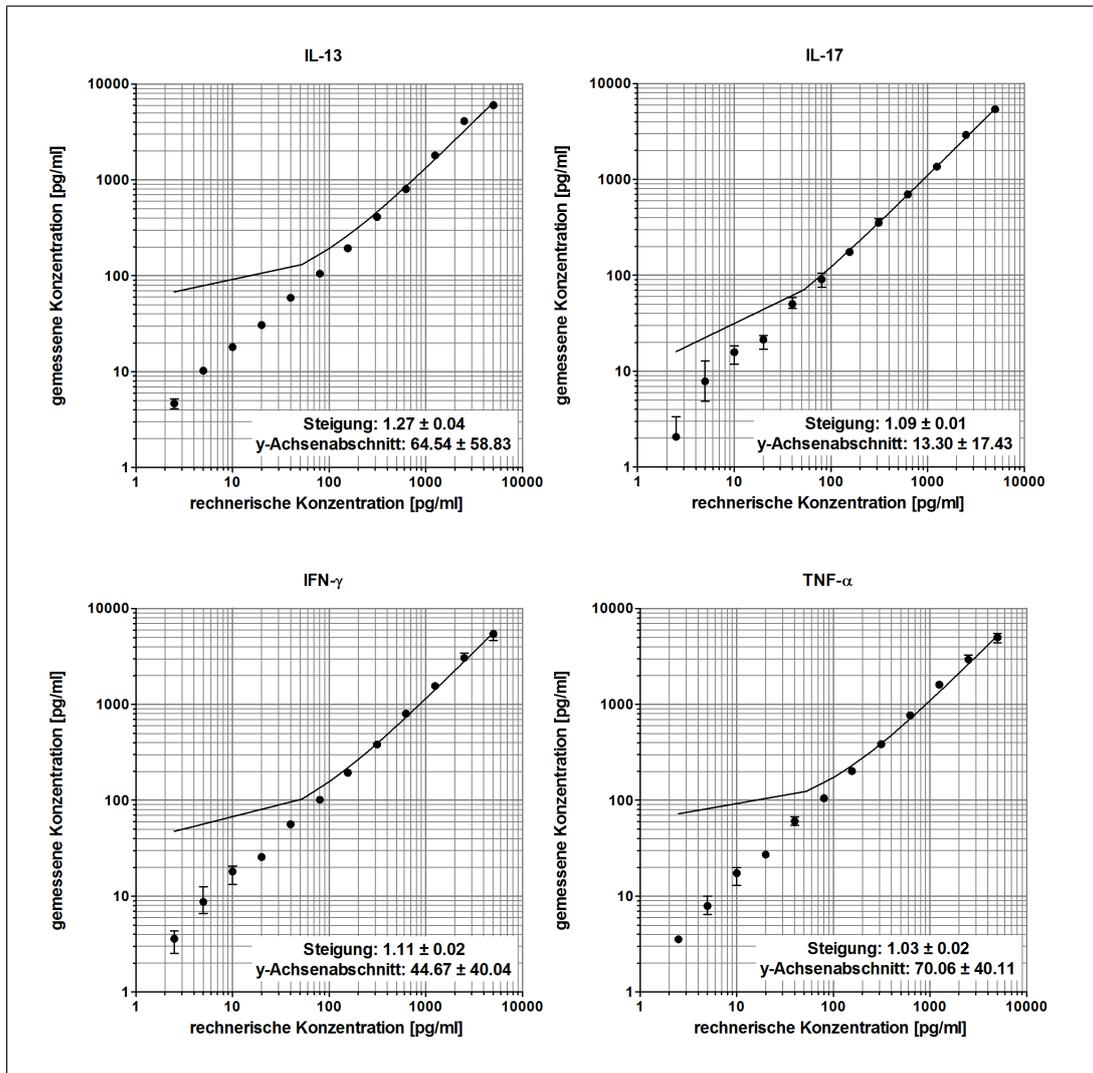
3 Ergebnisse



(a)

Abbildung 3.5: Verlauf der mittleren Konzentrationswerte der Verdünnungsstufen (die Fehlerbalken zeigen die Verteilung der Einzelmessungen)

3 Ergebnisse



(b)

Abbildung 3.5: Verlauf der mittleren Konzentrationswerte der Verdünnungsstufen (die Fehlerbalken zeigen die Verteilung der Einzelmessungen)

Alle gemessenen Zytokine zeigen über den gesamten Konzentrationsbereich einen linearen Verlauf. Pearsons r liegt oberhalb von 0,979 für alle Zytokine.

Die von Seiten des Herstellers durchgeführten Versuche zur Verdünnungslinearität umfassen zwei 1:2-Verdünnungsschritte. Die Ergebnisse zeigen eine prozentuale Abweichung von 90% bis 105% von den errechneten Werten.

3.3 Übereinstimmung von CBA und ELISA

Als Vergleichsproben wurden die Proben des 4,5-Jahre-Entnahmezeitpunktes von 40 Studienteilnehmern der PASTURE-Studie gewählt. Die Messungen sind durch das Ethikvotum der jeweiligen Studienstandorte abgedeckt (vgl. PFEFFERLE et al., 2010). Die Proben wurden anhand der Identifikationsnummer ausgewählt und umfassten Teilnehmer beider Kohorten aller Studienstandorte. Es wurden alle sieben Stimuli zu beiden Entnahmezeitpunkten (24 und 48 Stunden) gemessen. Dies entsprach einer Probenmenge von rechnerisch 560 einzelnen Proben.

Die Messung fand an vier Tagen statt, an denen die Proben parallel für die Messung mittels ELISA und CBA aufgearbeitet wurden. Dabei wurde mit den Proben bei Verdünnungen gleich verfahren und somit beim CBA kein Assay Diluent, sondern PBS+10% FCS verwendet. Diese Abweichung vom Protokoll war nötig, da es probensparender und besser vergleichbar war, die Proben für beide Messmethoden gleich zu verdünnen. Des Weiteren wurde die Probenaufbereitung dadurch übersichtlicher, was der Vorbeugung von Fehlern dient.

Da der Vergleich der Ergebnisse nur stattfinden konnte, wenn für eine Probe von beiden Methoden ein Ergebnis vorlag, mussten einige Werte unbeachtet bleiben, wenn bei einer Methode kein Ergebnis generiert werden konnte oder verworfen werden musste.

So flossen in die abschließende Bewertung für IL-5 $n=133$, für IL-10 $n=421$, für IFN- γ $n=197$ und für TNF- α $n=331$ Wertepaare ein.

Bei allen Zytokinen blieben die Werte unberücksichtigt, welche unter der Detektionsgrenze (LOD) des jeweiligen Zytokins im CBA waren.

Bei den ELISA-Messungen von IL-12 mussten die Ergebnisse mehrerer Mikrotiterplatten verworfen werden, da zum Teil die Standardkurve fehlerhaft war, bzw. das Hintergrundrauschen zu groß war. Außerdem lagen die meisten Werte unterhalb der Detektionssgrenze des ELISA oder unter der Bestimmungsgrenze des CBA (siehe auch Unterabschnitt 3.2.4). Abbildung 3.6 veranschaulicht diesen Umstand.

Aus den oben genannten Gründen mussten nahezu alle Wertepaare unberücksichtigt bleiben, wodurch ein Vergleich der Methoden bezüglich IL-12 nicht möglich war.

3 Ergebnisse

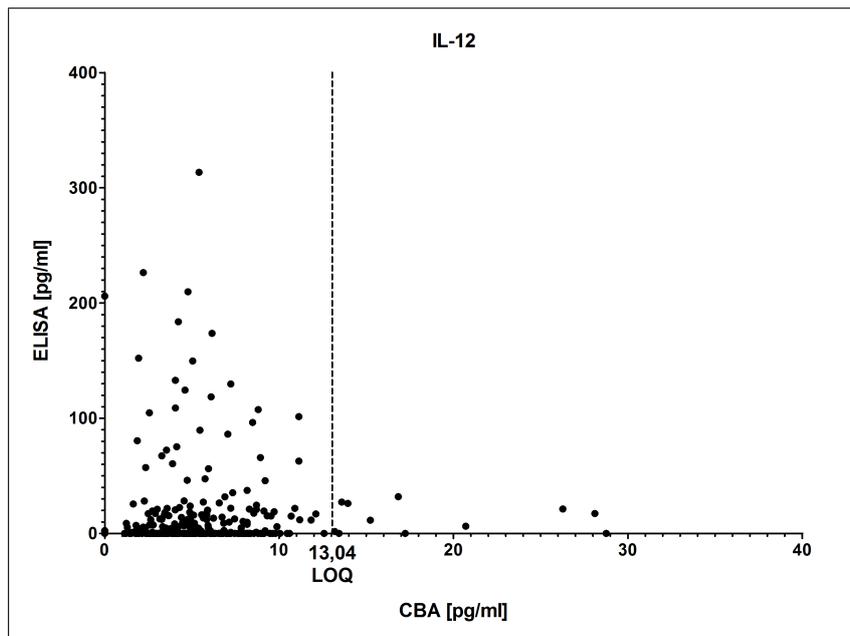


Abbildung 3.6: Darstellung der Wertepaare für IL-12, n=303, LOQ für CBA eingezeichnet

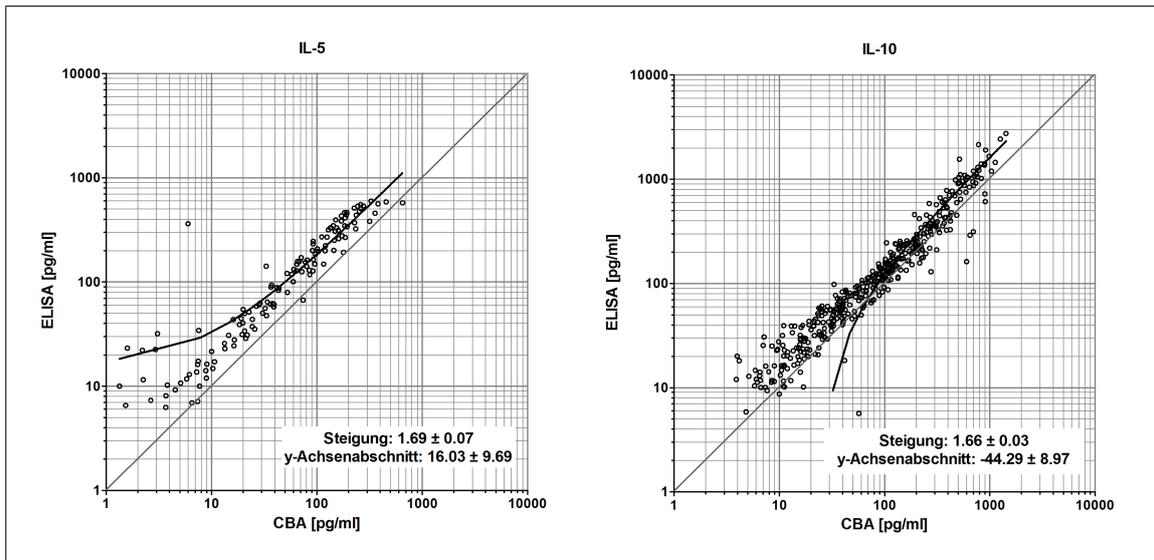
3.3.1 Regressionsanalyse

Abbildung 3.7 zeigt die sich ergebenden Punktwolken bei Auftragung jedes Wertepaares in ein Koordinatensystem mit den mittels CBA generierten Werten auf der x-Achse und den ELISA-Werten auf der y-Achse. Messen beide Messmethoden die absolut gleichen Werte, liegen alle Punkte auf einer Geraden, der ersten Winkelhalbierenden mit der Steigung 1 und dem y-Achsenabschnitt (0 | 0), welche zur besseren Veranschaulichung mit eingezeichnet ist. Durch die Messfehler der einzelnen Methoden verändert sich die Steigung und der Achsenabschnitt der Regressionsgeraden.

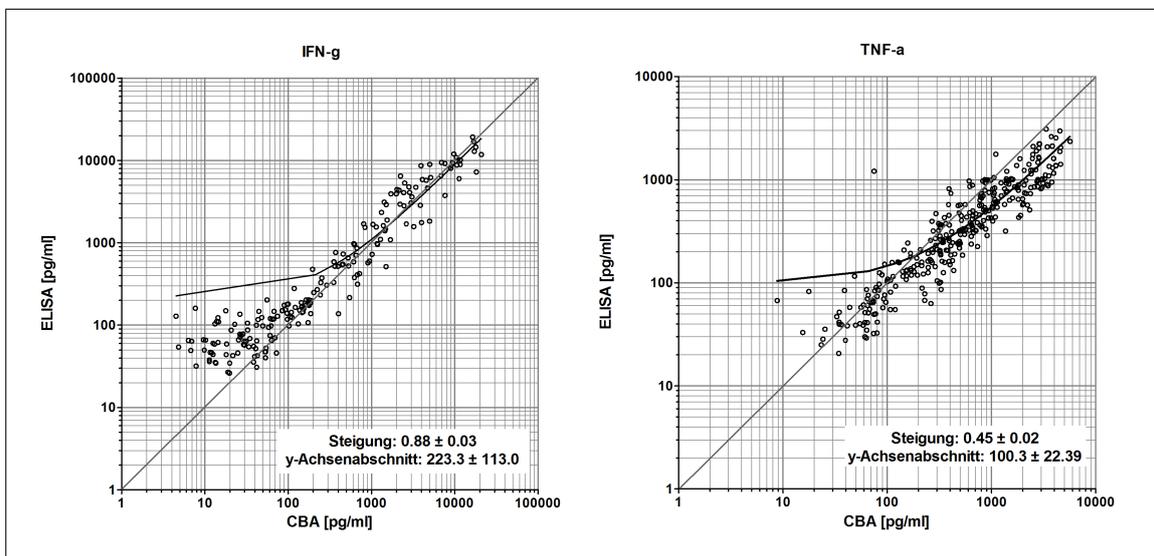
Wie in Unterabschnitt 2.5.2 erwähnt, trägt die Deming-Regression dem Umstand Rechnung, dass sowohl die x- als auch y-Werte der Wertepaare mit Fehlern behaftet sein können. Die Steigung der Deming-Regressionsgeraden gibt nun Aufschluss über das Verhalten der Messergebnisse von ELISA und CBA in steigenden Konzentrationsbereichen. Der y-Achsenabschnitt gibt Hinweise darauf, ob ggf. eine Methode höhere Werte misst als die andere.

Auch bei diesen Graphen sind die Knicke in den Regressionsgeraden mit der doppelt-logarithmischen Darstellung zu erklären.

3 Ergebnisse



(a)



(b)

Abbildung 3.7: Darstellung der Wertepaare mit Regressionsgerade nach Deming

Alle Regressionsgeraden zeigen Steigungen von 0,45 bis 1,69. Im Fall von IFN- γ und TNF- α ergeben sich y-Achsenabschnitte von 223, beziehungsweise 100. Dies hängt mit der Entwicklung der Wertepaare in den höheren Konzentrationen zusammen, was im folgenden Unterabschnitt 3.3.2 deutlicher ersichtlich wird.

3 Ergebnisse

Zur Vervollständigung ist der Korrelationskoeffizient r nach Pearson angegeben. Es ergeben sich die Werte in Tabelle 3.8.

Auf die Angabe des p -Wertes ist hier verzichtet worden, da er sich auf den Test der Hypothese, dass keine Korrelation besteht, bezieht. Bei der Fragestellung nach Übereinstimmung der Methoden ist er somit nicht aussagekräftig (GROUVEN et al., 2007). Neben dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson ist auch der Konkordanz- Korrelationskoeffizient nach Lin (CCC_{Lin}) angegeben (siehe auch Unterabschnitt 2.5.2), sowie Werte aus der Literatur (Übersicht bei ELSHAL UND MCCOY, 2006).

Tabelle 3.8: Korrelationskoeffizienten nach Pearson (r) und Lin (CCC_{Lin}), Vergleich mit Werten aus der Literatur

	r	CCC_{Lin}	De Jager et al. ¹	DuPont et al. ²	Chen et al. ³
IL-5	0,903	0,672	$r^2=0,853$	$r=0,812$	
IL-10	0,930	0,749	$r^2=0,926$	$r=0,820$	$r=1,0$
IFN-γ	0,917	0,910	$r^2=0,750$	$r=0,939$	$r=0,94$
TNF-α	0,854	0,683	$r^2=0,911$	$r=0,938$	$r=0,97$

¹ Vergleich ELISA mit „inhouse-assay“ (DE JAGER et al., 2003)

² Vergleich ELISA mit Luminex MAP (DUPONT et al., 2005)

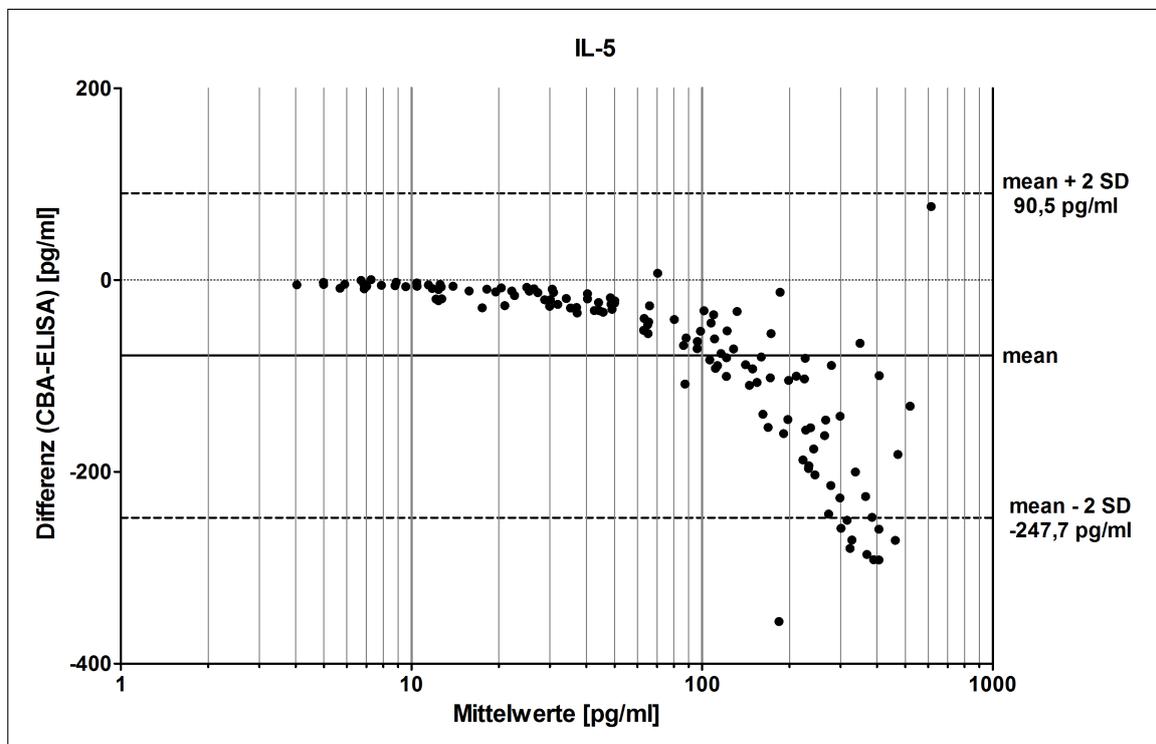
³ Vergleich ELISA mit „inhouse-assay“ (CHEN et al., 1999)

Die Korrelationskoeffizienten geben, mit kleiner Einschränkung für TNF- α , eine sehr hohe Korrelation der Werte beider Methoden an. Bei Vergleichen zwischen MBAs und ELISA in der Literatur werden die Korrelationen zumeist mittels r oder r^2 ausgedrückt, wobei die genaue Berechnung des Wertes teilweise nicht angegeben wird (ELSHAL und MCCOY, 2006).

Zusätzlich ist der Konkordanz- Korrelationskoeffizient nach Lin angegeben. Bei dem Vergleich der Koeffizienten mit den Graphen der Abbildung 3.7 fällt auf, dass die Punktwolke der Wertepaare für IFN- γ am besten entlang der ersten Winkelhalbierenden verlaufen, gefolgt von der Punktwolke der IL-10-Messung und dann IL-5 und TNF- α .

3.3.2 Bland-Altman-Blots

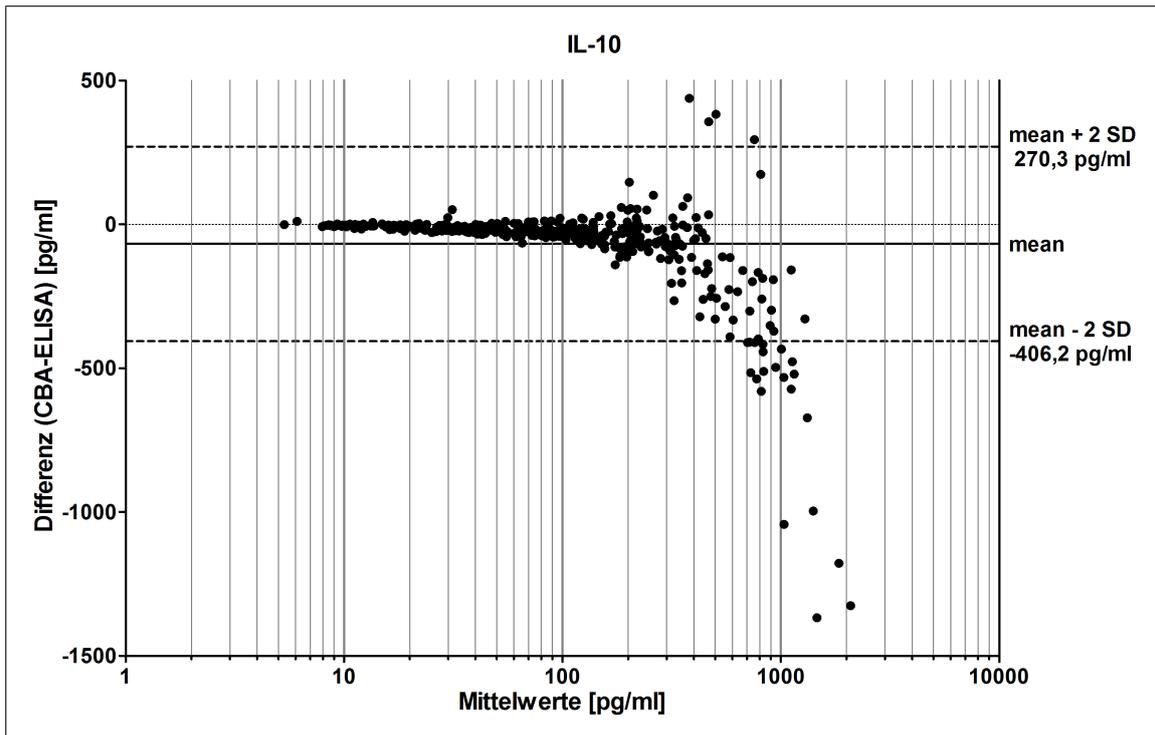
Die von Bland und Altman vorgeschlagene Darstellungsweise ermöglicht bereits bei der Betrachtung eine Einschätzung über die Übereinstimmung der beiden Methoden. In den Blots der Abbildungen 3.8 (a) bis (d) sind auf der x-Achse die Mittelwerte jedes gemessenen Wertepaares als beste verfügbare Schätzung des wahren Wertes aufgetragen. Auf der y-Achse ist die Differenz eines jeden Wertepaares aufgetragen. So ist auf den ersten Blick ersichtlich, wie groß die Differenzen sind und wie sie sich über den Messbereich verhalten. Zusätzlich ist der Mittelwert der Differenzen (mean) eingetragen (Idealwert: Null). Die beiden äußeren Linien markieren das 95% -Konfidenzintervall, also den Bereich, in dem 95% aller Differenzen der Messwerte von CBA und ELISA liegen (BLAND und ALTMAN, 1999).



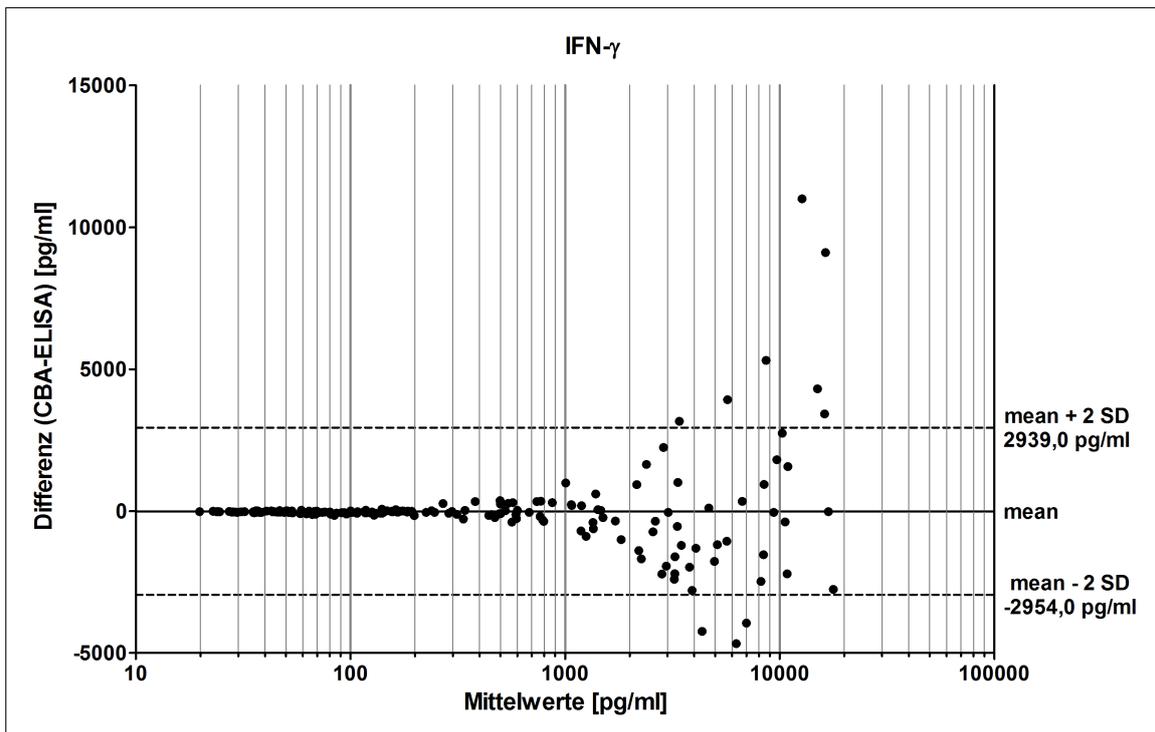
(a)

Abbildung 3.8: Bland-Altman-Blot des Zytokins IL-5

3 Ergebnisse



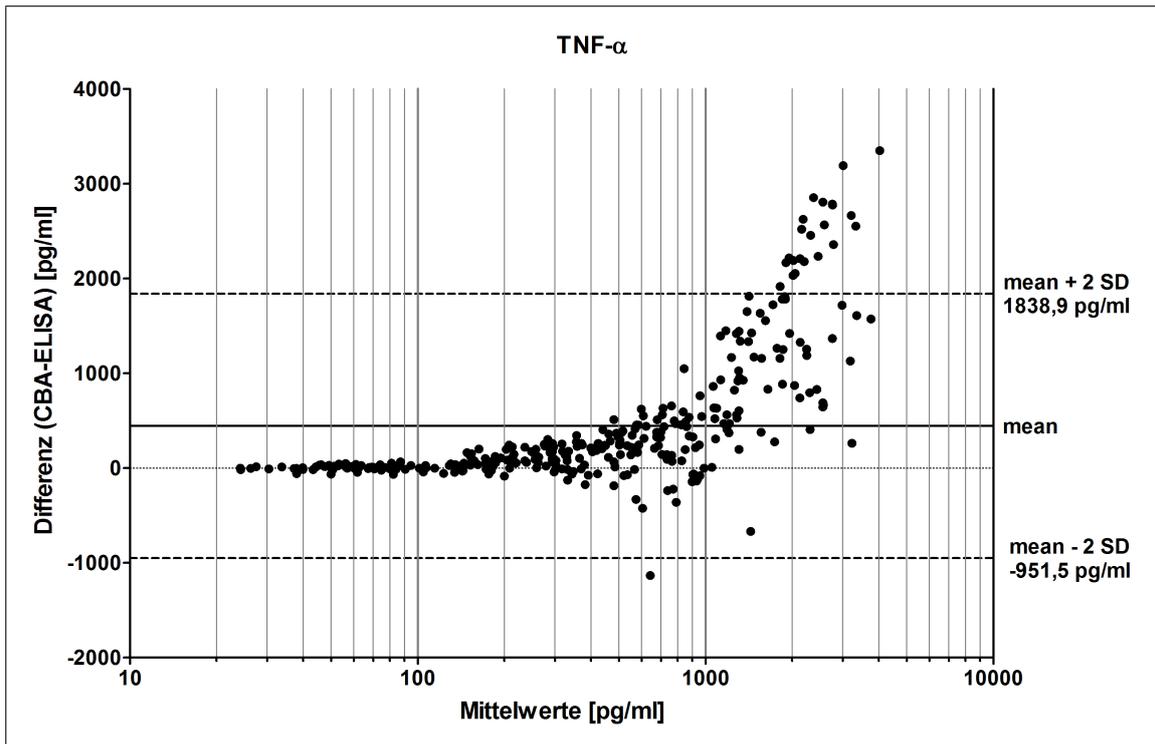
(b)



(c)

Abbildung 3.8: Bland-Altman-Blots der Zytokine IL-10 und IFN- γ

3 Ergebnisse



(d)

Abbildung 3.8: Bland-Altman-Blot des Zytokins TNF- α

4 Diskussion

Seit mehreren Jahrzehnten besteht in der Forschung das Interesse an der Messung von Mediatoren der Immunregulation (MORGAN et al., 2004). Im Rahmen dieser Entwicklung traten auch die Zytokine in den Fokus des Interesses. Gerade bei Entzündungen und allergischen Vorgängen, bei denen die Zytokine der T-Helfer-Zellen von besonderer Bedeutung sind, konnten zunehmend einzelne wenige Zytokine das komplexe Zusammenspiel der beteiligten Immunzellen nur unzureichend wiedergeben (ZHOU et al., 2010). Das Bestreben, ganze Zytokin-Muster zu erfassen, führte die am besten etablierte Methode, den ELISA, an ihre Grenzen (DOSSUS et al., 2009). Mit dem ELISA kann immer nur ein Analyt pro Messung bestimmt werden und das Verfahren eignet sich nicht für Multiplex Analysen (ELSHAL und MCCOY, 2006).

Verschiedene Hersteller entwickelten Verfahren auf Basis von Beads genannten Mikrosphären mit spezifischen Antikörpern auf ihrer Oberfläche. Diese Beads können mittels Durchflusszytometrie erfasst werden. Mit dieser Technik ist es mittlerweile möglich, eine große und ständig wachsende Zahl von Analyten zu messen (ELSHAL und MCCOY, 2006).

4.1 Vor- und Nachteile der CBA-Methode

Da die Multiplex-Systeme mittels Durchflusszytometrie aus dem Bedarf heraus entwickelt wurden, den Nachteilen und Grenzen der ELISA-Methode Abhilfe zu schaffen, sind viele Schwächen des ELISA die Stärken der Multiplex-Systeme.

Im Gegensatz zum ELISA können mittels MBAA abhängig von den verwendeten Beads bis zu 100 verschiedene Analyten parallel aus einer einzigen Probe gemessen werden (DE JAGER et al., 2003). Gerade bei mehreren zu messenden Analyten ist somit

4 Diskussion

das Multiplex-System weniger arbeitsintensiv und kostengünstiger als der konventionelle ELISA und benötigt ein festgelegtes Probenvolumen, unabhängig davon, wie viele Analyten gemessen werden sollen (ELLINGTON et al., 2010) (siehe auch Abschnitte 2.2 und 2.3).

Durch übersichtlicheres und schnelleres Aufbereiten der Proben werden die Analyten geschont und somit nicht präanalytisch verfälscht (ZHOU et al., 2010). Messungen von Zytokinmustern, bei denen die Messergebnisse vieler einzelner Analyten in der Summe und in Abhängigkeit voneinander interpretiert werden, sind praktisch nur per Multiplex-System möglich (ZHOU et al., 2010).

Gegenüber ELISA bieten die Multiplex-Systeme einen größeren Messbereich von vier Zehnerpotenzen (PRABHAKAR et al., 2004). Somit ist keine oder nur eine geringe Verdünnung der Proben notwendig, was weitere Fehlerquellen, sowohl durch manuelle Ungenauigkeit, aber auch durch Verdünnungseffekte verursacht, ausschaltet (LENG et al., 2008).

Doppelmessungen sind bei Multiplex-Messungen im Regelfall nicht nötig, da das Ergebnis jeder Messung bereits der Mittelwert von allen gemessenen Beads einer Beadpopulation darstellt, wobei die Oberfläche jedes Beads ein Assay für sich bildet (ELSHAL und MCCOY, 2006). Dieser Umstand kommt sowohl der Übersichtlichkeit als auch der Handhabung zugute.

Bezüglich der anfallenden Kosten lassen sich keine allgemein gültigen Aussagen tätigen. Es ist von dem zu analysierenden Probenausmaß, der Anzahl der zu messenden Zytokine, der Plattenbelegung und den Kosten der ELISA-Kits, bzw. Flex Sets abhängig, welches System wirtschaftlicher ist.

Mit Bestimmtheit kann jedoch gesagt werden, dass Multiplex-Systeme den personellen Aufwand und somit diesen Anteil an den Gesamtkosten erheblich verringern, obwohl die Kosten des Verbrauchsmaterials im Regelfall deutlich höher ausfallen als bei ELISA-Systemen.

Es bestehen jedoch auch Nachteile der Bead-basierten Multiplexplattformen. In verschiedenen Publikationen werden Störfaktoren beschrieben, welche unter dem Begriff Matrix Effekte zusammengefasst werden können. Hierbei beeinflussen andere Komponenten, welche sich mit den Analyten gemeinsam in der zu messenden Probe befinden, das Messergebnis (LENG et al., 2008).

Dies können ein bestimmter pH-Wert oder Proteine wie heterophile Antikörper sein

4 Diskussion

(DE JAGER et al., 2009). Zirkulierende Proteine und Inhibitoren sind zwischen Individuen sehr verschieden, worauf gerade Multiplex-Systeme sensibler reagieren als die ELISA-Methode (ZHOU et al., 2010).

Heterophile Antikörper sind Antikörper, die in ca. 40% der Normalbevölkerung vorkommen (DOSSUS et al., 2009). Sie entstammen dem Patienten oder dem Versuchstier. Sie können über die eigene Spezies hinaus an andere Antikörper binden, so auch an die Fang- und Detektionsantikörper des Assays. Da sich die erwünschten Analyt-Antikörper Reaktionen zwischen sich in der Flüssigkeit frei beweglichen Molekülen abspielen, werden auch besagte unerwünschte Reaktionen begünstigt (ZHOU et al., 2010; RICHENS et al., 2010).

Die Matrix Effekte sind als solche bekannt und soweit möglich, von Herstellerseite im Bezug auf die Assay Reagenzien minimiert. Dies erfordert allerdings ein rigores Befolgen der dem Assay beigefügten Anleitung des Herstellers (ELSHAL und MCCOY, 2006).

Ebenso wurden bei Kits, welche mehrere Zytokine messen, eine Kreuz-Reaktivität der verwendeten Antikörper, sowie eine Verfälschung der Werte durch die verwendeten Reagenzien weitestgehend ausgeschlossen. Die vorliegenden, sehr guten Ergebnisse der Intra- und Interassay Präzision unterstützen diese Einschätzung (ELLINGTON et al., 2010).

Ein weiterer Nachteil besteht in der Messung mittels Durchflusszytometrie. Diese gestaltet sich durch die notwendige Kalibrierung und das Gating verhältnismäßig schwierig und erfordert eine fundierte Einarbeitung. Durch Geräte, wie den FACSArray™ Bioanalyser, welche zwar weniger Funktionen aufweisen, dafür jedoch besser auf die Messung von Beads angepasst sind, relativiert sich dieser Nachteil zu einem gewissen Grad.

Ein weiteres, wenn auch meist geringes Problem, stellen so genannten Dubletten dar. Dubletten sind zwei Beads, welche über capture-Antikörper und Analyten aneinander haften. Beads, welche in Dubletten oder noch größeren Bead-Verklumpungen festhängen, stehen zur Messung nicht zur Verfügung. Dies kann im Extremfall das Messergebnis einzelner Zytokine auf eine schlechte statistische Basis stellen.

Durch die Möglichkeit viele Analyten parallel zu messen, steht man im Bezug auf die Qualitätssicherung vor einer schwierigen Situation, falls ein Analyt die Richtlinien der Qualitätssicherung nicht besteht. Im Zweifelsfall müsste die gesamte Messung wiederholt werden (ELLINGTON et al., 2010).

In der Summe handelt es sich bei der CBA-Methode um das bessere Hochdurch-

flussverfahren zur Zytokinmessung, da es in kürzerer Zeit mit weniger personellem Aufwand mehr Messwerte bei sehr guter Messqualität liefert.

4.2 Güte der CBA-Messungen und Vergleich zum ELISA

Die erste untersuchte Hypothese lautete, dass die CBA-Methode allgemeinen Gütekriterien entspricht und es möglich ist, vor Ort stabile und verlässliche Messwerte zu generieren. Es war vor Testung des CBA Assays auf die Validierungsparameter zu erwarten, dass die Testergebnisse den Anforderungen genügen werden, da der Hersteller BD Biosciences die Flex Sets und die Master Buffer Kits bereits intern intensiv getestet hat. Die Werte sollten idealerweise den vom Hersteller angegebenen und den in der Literatur publizierten, ähneln.

Gemäß der zweiten untersuchten Hypothese sollten die Testergebnisse außerdem mindestens so gut oder besser ausfallen, wie die mittels ELISA produzierten Werte aus der Literatur oder aus internen Messungen im Rahmen der Qualitätssicherung in der PASTURE-Studie.

In den vorliegenden Ergebnissen lässt sich kein Anzeichen einer **Probenverschleppung** während des Messvorgangs erkennen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur **Kalibrationsstabilität** zeigen eine große Übereinstimmung der Rohwerte der Standardverdünnungsstufen an verschiedenen Tagen (vgl. Abbildung 3.2 auf Seite 38). Nur an einem Tag sind die Rohwerte vergleichsweise etwas geringer. Im Vergleich zur Arbeit von Richens et al. (RICHENS et al., 2010) wurde bei den durchgeführten Versuchen zwar nur ein Kit benutzt, dafür aber an vier verschiedenen Tagen gemessen. Die von Richens beobachtete hohe Intrakit Variabilität bei IL-10 und TNF- α kann aus den vorliegenden Ergebnissen nur eingeschränkt bestätigt werden. Nur an einem Messtag fällt hier eine größere Variabilität der Rohwerte zum Verlauf der Rohwerte der anderen Messtage auf, die jedoch nicht das von Richens beschriebene Ausmaß annimmt. De Jager et al. sehen in sich überlappenden oder parallel verlaufenden Standardkurven wie in den vorliegenden Ergebnissen einen Beleg für gut funktionierende Antikörperpaare (DE JAGER et al., 2009).

4 Diskussion

Die errechneten Schwankungen der Standardkonzentrationen in Tabelle 3.1 (S. 39) dürfen in Hinblick auf die Literatur ebenfalls als akzeptabel angesehen werden. Trägt man die Soll-Werte gegen die zurück gerechneten Werte auf und errechnet das Bestimmtheitsmaß r^2 nach dem Beispiel von Prabhakar et al. (Graphen nicht gezeigt), so werden bei den vorliegenden Messungen Werte von 0,926 (IL-1 β) bis 0.999 (IL-12) erreicht. Dies weist auf eine hohe Reproduzierbarkeit der Standardkurve zwischen verschiedenen Assays hin (PRABHAKAR et al., 2004).

Die für die Beurteilung der **Analytischen Sensitivität** ermittelten Werte liegen in der Regel niedriger als bisher publizierte Werte des *detection limits* für CBA (CHEN et al., 1999; COOK et al., 2001). Untersuchungen mittels LINCOPlex kits kommen auf sehr ähnliche Ergebnisse für LOD und LOQ (PRABHAKAR et al., 2004). Der Unterschied zu den limit-of-detection-Werten des Herstellers kann nicht allein mit der unterschiedlichen Berechnung (vgl. Unterabschnitt 3.2.3 ab S. 40) erklärt werden. Möglicherweise sind optimierte Messbedingungen auf Seiten des Herstellers für die Differenzen verantwortlich.

Die Analytische Sensitivität ist in einem ausreichenden Maß sichergestellt und genügt den Anforderungen in der Forschung im Rahmen der PASTURE-/EFRAIM- Studie. Exakte Ergebnisse sollten in diesem niedrigen Konzentrationsbereich ohnehin nicht erwartet werden (s.u.) und sind auch nicht Zweck der Flex Sets. Für eine größere Auflösung im niedrigen Konzentrationsbereich stellt der Hersteller spezielle „Enhanced Sensitivity Flex Sets“ zur Verfügung.

Die Untersuchungen zur **Funktionellen Sensitivität** zeigen sehr gute Ergebnisse, welche sich mit den Erkenntnissen aus den Messungen zur analytischen Sensitivität decken. Zusammenfassend dürfen mit Einschränkungen bei dem IL-17 Flex Set die Ergebnisse der Flex Sets oberhalb einer Konzentration von 10 pg/ml als valide angesehen werden.

Die Graphen der Abbildung 3.3 (S. 43-45) zur **Messpräzision** verdeutlichen gut die Streubreite der Messungen und zeigen auf, dass gemessene Konzentrationswerte in einem gewissen Rahmen schwanken. Eine oft beobachtete Verteilung mit höheren Variationskoeffizienten im niedrigen Konzentrationsbereich, sowie kleineren Variationskoeffizienten im mittleren und hohen Konzentrationsbereich (MAECKER et al., 2008), zeigt sich allerdings bei diesen Ergebnissen nicht. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen die größten Schwankungen im mittleren Konzentrationsbereich.

Die mittleren Variationskoeffizienten sind mit kleiner oder gleich 10% sehr niedrig, wenn auch nicht so niedrig wie von Herstellerseite angegeben, bzw. für CBA-Assays

4 Diskussion

publiziert (vgl. Tabelle 3.4 auf Seite 46). Die vergleichsweise hohen Schwankungen müssen durch das Analysegerät selbst oder durch ungenaues Arbeiten beim Pipetieren der Proben verursacht worden sein. Diese beiden Fehlerquellen gehen neben weiteren auch in die Messergebnisse der Methodenpräzision ein (s.u.).

Für ELISA werden abhängig vom Konzentrationsniveau Werte von 5% bis 20% angegeben (GREBENCHTCHIKOV et al., 2005). Somit bestehen die generierten Werte zumindest den Vergleich mit dem ELISA.

Die V_K -Werte der **Methodenpräzision** liegen typischerweise etwas höher als die der Messpräzision, da durch die Schritte der Probenaufbereitung eine Vielzahl von Faktoren hinzukommen, welche die Ungenauigkeit erhöhen (ELLINGTON et al., 2010). Das war bei den vorliegenden Messungen nur in geringem Ausmaß der Fall.

Der oben genannte typische Verlauf der Werte mit den geringsten Werten im mittleren Konzentrationsniveau kann bei diesen Werten beobachtet werden, allerdings steigen die V_K -Werte im hohen Konzentrationsbereich wieder.

Die mittleren Variationskoeffizienten der Methodenpräzision sind denen von Morgan et al. für CBA-Assays publizierten Werten sehr ähnlich (MORGAN et al., 2004). Die Werte von Hodge et al. entsprechen diesen (HODGE et al., 2004). Timmons et al. zeigte für IL-6 einen Interassay $V_K < 10\%$ für CBA und $< 9\%$ für einen high-sensitivity ELISA (TIMMONS et al., 2009) (vgl. Tabelle 3.5 auf Seite 48).

Für ELISA werden V_K -Werte von 9,6% bis 11,1% für TNF- α angegeben (GREBENCHTCHIKOV et al., 2005), beziehungsweise Werte zwischen 11% und 18% für verschiedene Zytokine (BORG et al., 2002).

Timmons et al. zeigten für IL-6 einen Interassay $V_K < 20\%$ für CBA und $< 9\%$ für einen high-sensitivity ELISA (TIMMONS et al., 2009).

Erfreulicherweise decken sich die hier generierten Werte mit denen des Herstellers, sie sind teilweise sogar niedriger. Da Werte unter 25% bzw. 20% gemeinhin für Forschungszwecke als ausreichend betrachtet werden (PRABHAKAR et al., 2004), ist die CBA-Methode hinsichtlich der Präzision der ELISA-Methode überlegen und außerdem sehr gut geeignet, um über die Zeit stabile Messwerte zu generieren.

Diese Ergebnisse zur **Wiederfindung** (Tabelle 3.6, S. 49) sind im Vergleich zur Literatur, sowie mit den vom Hersteller ermittelten Ergebnissen (Tabelle 3.7, S. 49), sehr gut. Abweichungen der Wiederfindungsraten im Bereich 20% (DE JAGER et al., 2009) bis 25% (PRABHAKAR et al., 2004) wären tolerabel gewesen.

Verdünnungslinearität ist mit linearen Korrelationskoeffizienten oberhalb von 0,979 für alle Zytokine in einem ausreichenden Maß sichergestellt. Die Ergebnisse decken

sich soweit angegeben mit denen des Herstellers. Es ist somit möglich, Proben um ein vielfaches zu verdünnen, ohne Einbußen hinsichtlich der Genauigkeit der Messung befürchten zu müssen (PRABHAKAR et al., 2004).

In der Summe kann festgestellt werden, dass genaue, stabile Ergebnisse über einen großen Konzentrationsbereich produziert werden können. Die CBA-Methode ist der ELISA-Methode hinsichtlich der Messqualität mindestens ebenbürtig, sehr wahrscheinlich sogar überlegen. Der Beleg dieser Annahme ist die Voraussetzung für einen Wechsel der Messmethode zur Zytokinbestimmung im Rahmen der PASTURE-/EFRAIM-Studie.

4.3 Vergleich der Messergebnisse CBA - ELISA

Die dritte untersuchte Hypothese nimmt eine Vergleichbarkeit von Messergebnissen von Proben aus dem Studienkollektiv an, die mittels ELISA- oder CBA-Methode generiert werden.

Die Probleme, die mit der Vergleichbarkeit der Messergebnisse des Zytokins IL-12 zusammenhängen, werfen die Frage auf, ob die ELISA-Methode zu unspezifisch ist, oder ob die CBA-Methode nicht ausreichend sensitiv misst. Die bisherigen ELISA-Messungen von IL-12 im Rahmen der PASTURE-Studie lieferten zwar ebenfalls niedrige Werte (PFEFFERLE et al., 2010), dies erklärt jedoch nicht die abweichenden Messergebnisse des CBA.

Young et al. kommen im Rahmen ihrer Untersuchungen mit Maus-Kits zu dem Schluss, die ELISA-Methode sei sensitiver als die Multiplex-Methoden (YOUNG et al., 2008). Timmons et al. beobachten ebenfalls geringere Sensitivität des IL-6 CBA Flex Sets im Vergleich zu einem high-sensitivity ELISA Kit (TIMMONS et al., 2009).

Dossus et al. messen im Rahmen von Vergleichsmessungen von Serum- und Plasma-proben je nach Zytokin 1,4- bis 5,4-fach höhere Werte mit einem Multiplex-System. Sie kommen zu dem Schluss, dass die Vergleichbarkeit von ELISA zu Multiplex-Systemen im sehr niedrigen Konzentrationsbereich unter einem Nanogramm pro Milliliter nicht

gegeben ist (DOSSUS et al., 2009).

Alle Regressionsgeraden der Regressionsanalyse zeigen Steigungen von 0,45 bis 1,69 (vgl. Abbildung 3.7, S. 55). Die vorliegenden Ergebnisse sind nicht vergleichbar mit denen von Young et al., die Steigungen der Regressionsgeraden von 11 beim Vergleich von Messwerten zwischen CBA und ELISA für Ratten- und Mäuse Kits gezeigt haben (YOUNG et al., 2008).

Der Korrelationskoeffizient nach Pearson ist kein Maß für Übereinstimmung (LANGE und BENDER, 2007), sondern ein Maß, wie stark die einzelnen Wertepaare linear assoziiert sind (BLAND und ALTMAN, 2003), also der errechneten Regressionsgeraden folgen. Systematische Fehler (Bias) werden durch den Koeffizienten nicht aufgedeckt (BLAND und ALTMAN, 2003). Ebenso hängt der Korrelationskoeffizient von dem betrachteten Wertebereich ab. Es empfiehlt sich, eine repräsentative Stichprobe der Patientenpopulation zu untersuchen (BLAND und ALTMAN, 2003), wie es in den hier zugrunde liegenden Daten der Fall ist.

Auffällig ist die Diskrepanz zwischen Pearsons r und CCC_{Lin} bei IL-5. Der hohe Korrelationskoeffizient spiegelt den guten Verlauf der Punktwolke entlang der Regressionsgeraden wieder (vgl. Abbildung 3.7, S. 55). Diese verläuft jedoch parallel zur ersten Winkelhalbierenden, deshalb auch der niedrigere Konkordanz-Korrelationskoeffizient. So lässt sich eine Korrelation der Werte, jedoch keine Übereinstimmung nachweisen. Die Korrelationskoeffizienten nach Pearson und Lin zeigen bei allen untersuchten Zytokinen eine sehr gute *Korrelation* der Messergebnisse der OptEIA-Kits und der CBA Sets. Dies deckt sich mit Ergebnissen aus der Literatur (ZHOU et al., 2010) (vgl. Tabelle 3.8 auf Seite 56). Die Frage nach einer Übereinstimmung der Werte muss, ebenfalls analog zu Ergebnissen aus der Literatur, verneint werden (ELSHAL und MCCOY, 2006).

Auch wenn die Regressionsanalysen nach Deming und die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson etwas anderes suggerieren, die Konkordanz-Korrelationskoeffizienten nach Lin und die Bland-Altman-Blots zeigen allenfalls eine gute bis mäßige *Übereinstimmung* der Messergebnisse beider Methoden in niedrigen Konzentrationsbereichen und eine schlechte Deckung in höheren Konzentrationsbereichen. Vergleiche mit der Literatur sind hier nicht möglich, da die einzige Nennung eines Konkordanz-Korrelationskoeffizienten nach Lin in der vorliegenden Literatur von Ray et al. angegeben wird. Für IL-6 beträgt er 84,5% (RAY et al., 2005). Die Darstellung

nach Bland und Altman wurde in der vorliegenden Literatur nie gewählt. Die Darstellungen nach Bland und Altman (vgl. Abbildung 3.8, S. 57) erlauben jedoch eine differenziertere Betrachtung als die Regressionsgeraden.

IL-5

Bei der Betrachtung der Wertepaare in einem Koordinatensystem ist folgender Umstand nicht offensichtlich: Ab einer mittleren Konzentration von ca. 50 pg/ml beginnen die Messwerte der ELISA-Messung deutlich größer zu werden als die der CBA-Messungen. Die Differenzen der Wertepaare (CBA-ELISA) nehmen somit zunehmend größere negative Werte an. Dies kann an dem eingezeichneten Mittelwert der Differenzen zusammenfassend abgelesen werden.

Der Ergebnisbereich zwischen 50 und 500 pg/ml ist ausschlaggebend, weshalb die Übereinstimmungsgrenzen (limits of agreement) so weit voneinander entfernt sind. Innerhalb der Übereinstimmungsgrenzen liegen 95% aller Messwertdifferenzen zwischen ELISA und CBA (BLAND und ALTMAN, 1999).

Da der Verlauf der Differenzen nicht chaotisch ist, sondern einer relativ festen Bahn folgt, wurde an dieser Stelle ein Korrekturfaktor für die rechnerische Angleichung der Werte berechnet. Die beste Voraussetzung für ein solches Vorgehen ist eine einheitliche Abweichung der Differenzen von Null, was in diesem Fall jedoch nicht gegeben ist.

IL-10

Der Bland-Altman-Blot zeigt ein ähnliches Bild wie bei IL-5. Allerdings stimmen Werte bis zu einer Durchschnittskonzentration von ca. 300 pg/ml gut überein. Bei höheren Konzentrationen besteht das Problem, dass zwar zumeist die ELISA-Messungen größer sind als die CBA-Messungen, aber es gibt auch das genau gegensätzliche Phänomen. Dieser Umstand verbietet die Bereitstellung eines Korrekturfaktors. Jene CBA-Messwerte, welche ohnehin schon größer sind als deren ELISA-Pendants, entfernen sich durch einen Korrekturfaktor von den zugehörigen ELISA-Werten.

IFN- γ

Der Blot zeigt eine sehr gute Übereinstimmung der Werte bis ca. 1000 pg/ml. Bezeichnenderweise stellt dies den größten Standard der ELISA-Messungen dar, somit handelt es sich bei ELISA-Messergebnissen oberhalb dieses Wertes um verdünnt gemessene Proben mit rechnerisch korrigierten Ergebnissen.

Oberhalb der Durchschnittskonzentration von 1000 pg/ml fächern sich die Differenzen der Messwerte gleichmäßig auf. Dies ist auch der Grund, weshalb der Mittelwert der Differenzen ein sehr gutes Ergebnis nahe Null aufweist. Die Übereinstimmungsgrenzen deuten allerdings bereits auf eine schlechte Übereinstimmung der Werte hin. Die

4 Diskussion

Bereitstellung eines Korrekturfaktors ist auch hier nicht möglich. Die Messergebnisse für IFN- γ oberhalb von 1000 pg/ml stimmen nicht überein, der 95%-Konfidenzintervall ist zu groß.

TNF- α

Dieser Bland-Altman-Blot zeigt ein ähnliches Bild wie der von IL-5, allerdings spiegelverkehrt. Die Differenzen der Messwertepaare liegen bis etwa 500 pg/ml Durchschnittskonzentration nahe Null. Darüber hinaus zeigt sich, dass sich die Differenzen bis zu einer Konzentration von 1000 pg/ml stärker als bisher auffächern. Danach messen im Regelfall die CBA Flex Sets die höheren Proteinkonzentrationen. Es sei darauf hingewiesen, dass auch bei TNF- α der höchste Standard im ELISA bei 1000 pg/ml lag. Oberhalb dieser Konzentration wurden die ELISA-Ergebnisse aus Verdünnungen rechnerisch korrigiert.

Es besteht somit eine Übereinstimmung der Werte bis 500 pg/ml, mit Einschränkungen bis 1000 pg/ml. Darüber hinaus wäre es möglich, analog zum Vorgehen bei IL-5, einen Korrekturfaktor zu errechnen.

Für die vorliegende Konstellation der Wertepaare schlagen Bland und Altman eine logarithmische Transformation der Werte oder eine Betrachtung des Verhältnisses (CBA Werte/ELISA Werte) im Verhältnis zu den Durchschnittskonzentrationen vor (BLAND und ALTMAN, 1999). Dies führt bei Rücktransformation, beziehungsweise direkt im Falle der Werteverhältnisse zu Ergebnissen, die das Verhältnis der Messergebnisse zueinander beschreiben. Eine grundsätzlich andere Aussage ist hierdurch jedoch nicht zu erwarten.

Multiple Faktoren scheinen für die mittelmäßige bis schlechte Übereinstimmung ursächlich zu sein. In der Literatur wird meist auf unterschiedliche Fang- und Detektionsantikörper zwischen den ELISA Kits und den Multiplex Kits verwiesen (DOSSUS et al., 2009; KHAN et al., 2004). Die Antikörper scheinen der wichtigste Faktor zu sein. Unter anderem aus diesem Grund wurde im vorliegenden Fall auch das CBA-System der BD Biosciences gewählt, da bereits die ELISA OptEIA Kits von der Firma BD Biosciences Pharmingen stammen. Dennoch müssten die Antikörper Veränderungen unterzogen worden sein, da nicht anzunehmen ist, dass es möglich war, die Antikörper der Uniplex ELISAs in das Multiplex-System CBA zu übernehmen, ohne Kreuzreaktionen hervorzurufen (ZHOU et al., 2010). BD Biosciences war hinsichtlich dieser Frage leider zu keiner Antwort bereit.

Die heterophilen Antikörper stellen eine weitere mögliche Ursache dar. Ihr störender Einfluss wirkt sich stärker auf Multiplex-Systeme aus, als auf ELISAs (DOSSUS et al.,

2009).

Aus den beschriebenen Zusammenhängen resultierend wurde die dritte untersuchte Hypothese widerlegt. Die Messergebnisse von Proben aus dem Studienkollektiv korrelieren zwar, stimmen jedoch nicht überein. Somit ist eine Vergleichbarkeit von Messergebnissen die mittels ELISA-Methode generiert wurden, zu Ergebnissen aus CBA-Messungen nur mit Einschränkungen gegeben.

4.4 Schlussfolgerungen für den Methodenwechsel innerhalb der PASTURE- / EFRAIM - Studie

Durch das Vorhaben, ein möglichst detailliertes Bild des T_H1/T_H2 - Status der Studienprobanden zu erlangen, wurde es nötig, deutlich mehr Zytokine aus den bereitgestellten Proben zu messen.

Die Anzahl der per ELISA messbaren Zytokine ist durch das feststehende Probenvolumen, die zur Verfügung stehenden finanziellen Mittel, sowie durch den Arbeitseinsatz des Personals begrenzt. Somit sollte ein neues Messsystem gefunden werden, welches diesen Beschränkungen nicht unterliegt.

Mit Hilfe der Beadbasierten Multiplexmessmethode CBA können die Messungen in dem geplanten Umfang und in guter Qualität weitergeführt werden. Für eine gleichbleibende Qualität der Multiplex-Messungen sollten auch weiterhin interne Kontrollproben während des gesamten Verlaufs der Studienmessungen mitgeführt werden. Hierfür eignen sich die hier in einem anderen Kontext erwähnten NIBSC-Standards (DE JAGER et al., 2009).

Des Weiteren sollte auf den Vergleich der Standardkurven zwischen verschiedenen Messungen für den Verlauf der Studienmessungen Wert gelegt werden und das Vorgehen standardisiert werden (LENG et al., 2008).

In Bezug auf die Vergleichbarkeit von früheren, mittels ELISA gewonnenen Messergebnissen mit den neuen Messergebnissen gibt es nach den vorliegenden Untersuchungen einige Einschränkungen zu beachten.

Für jedes Zytokin gibt es einen Konzentrationsbereich, außerhalb dessen ein direkter

zahlenmäßiger Vergleich nicht mehr möglich ist, da vor allem mit zunehmender Konzentration die Differenzen der Werte aus beiden Messmethoden zu stark ansteigen. Für IL-5 erstreckt sich der Bereich von 5 pg/ml bis maximal 100 pg/ml, für IL-10 von 20 pg/ml bis 300 pg/ml, für IFN- γ und TNF- α von 20 pg/ml bis 1000 pg/ml.

Die Bereitstellung eines Korrekturfaktors ist nur dann möglich, wenn eine Methode immer höhere Werte misst als die andere. Dies wäre mit gewissen Einschränkungen bei IL-5 und TNF- α der Fall. IFN- γ zeigt eindrucklich, dass hier ein Korrekturfaktor nichts bewirken würde.

Ein Korrekturfaktor, welcher nur bei zwei der Zytokine und nur in einem gewissen Konzentrationsbereich zum Einsatz kommt, ist in der Praxis nicht sinnvoll.

Eine Einteilung der Messergebnisse nach ihrer Höhe in Kategorien wäre sinnvoller. Dies würde dazu führen, dass die Zugehörigkeit einer Patientenprobe zu einer Kategorie zwischen den Methoden vergleichbar würde. Die Vergleichbarkeit der Kategorien hängt dabei natürlich von der Anzahl der Kategorien ab. Hier muss in Zusammenarbeit mit Epidemiologen und Statistikern ein geeigneter Weg gefunden werden, welcher einen Kompromiss aus Vergleichbarkeit und erhaltener statistischer Aussagekraft darstellt.

4.5 Ausblick

Die Messung von Zytokinmustern und anderen klinischen (Verlaufs-) Parametern in Forschung und Routine, wird einen immer größer werdenden Stellenwert einnehmen. Aufgrund ihrer Vorteile wird somit auch die Verbreitung und Nutzung von Multiplexed Bead Array Assays steigen.

Die immanenten Schwächen der CBA-Methode wie Kreuz-Reaktivität und das Auftreten von Matrixeffekten werden auf technischer Seite gelöst werden müssen. Je nach Fragestellung und Vorraussetzung wird beispielsweise der Messbereich deutlich verringert, um eine bessere Ortsauflösung im Sinne einer höheren Sensitivität zu erhalten. Den Matrixeffekten könnte mit speziellen Antikörpern, bzw. Zusatzreagenzien (pH, Salzgehalt) begegnet werden, um diesen Störfaktor zumindest zu minimieren.

Für den Einsatz der Methode in der Routine muss die Handhabung unkomplizierter werden. Die Aufbereitung der Proben könnte verändert werden, so dass sie unemp-

4 Diskussion

findlicher auf kleine (Pipettier-) Fehler reagiert.

Bei der Einführung der cytometric bead arrays wurde als Vorteil herausgestellt, dass mittels eines Durchflusszytometers gemessen werden kann, über welches die meisten Labore verfügen. Diese Offenheit für viele Systeme geht mit einer komplizierten Prozedur zum Kalibrieren der Systeme einher. Hier ist der BD FACSAarray™ Bioanalyser bereits ein positives Beispiel. Wahrscheinlich werden sich zur Zytokinmessung jedoch Messsysteme durchsetzen, die noch spezieller auf die Messung der Beads ausgerichtet und dementsprechend auch kalibriert sind. Dies vereinfacht die Handhabung gerade bei Personen ohne viel Vorerfahrung mit dem System.

Bezüglich der Auswertung der Daten würde eine weitere Einschränkung des Nutzer-spielraums einen schnelleren Zugang zu den Ergebnissen liefern. Hier sollte auf Seiten der Software außerdem ein geeignetes umfangreiches System zur Qualitätssicherung implementiert werden. Ein solches System sollte Werkzeuge zur Sicherstellung einer hinreichenden Qualität der Standardkurven enthalten.

Des Weiteren sollte die Möglichkeit zum langfristigen Management der Kontrollen gegeben sein.

Die Multiplexed Bead Array Assays stellen eine interessante und vielseitige Technologie dar. Mit der Zeit wird sie den klassischen ELISA als Gold-Standard zur Messung mehrerer Analyten aus einer Probe ablösen. In der Übergangsphase können nur individuelle Richtlinien einen Messwertvergleich zwischen MBAA und ELISA regeln.

5 Zusammenfassungen

5.1 Zusammenfassung

Im Rahmen der prospektiven multizentrischen Kohortenstudie PASTURE/ EFRAIM wurden Einflussfaktoren auf die Entstehung von kindlichem Asthma und Allergien untersucht.

Ein Bestandteil war die Erstellung des T-Effektorzell-Profiles der Teilnehmer mittels Zytokinmessung zu verschiedenen Zeitpunkten. Der für die Zytokinmessung verwendete ELISA wird derzeit als Goldstandard betrachtet, ist jedoch sehr Zeit-, Kosten-, Personal- und Probenintensiv. Die Messung der Zytokine sollte somit auf ein Hochdurchsatzverfahren, das „cytometric bead array assay (CBA)“-System der Firma BD Biosciences umgestellt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die CBA-Methode zu validieren, sie auf ihre Messqualität im Vergleich zum ELISA und auf die Vergleichbarkeit von Messergebnissen beider Methoden zu untersuchen.

Für den Vergleich der Messergebnisse beider Methoden wurden 556 Proben von vierzig Studienteilnehmern parallel per CBA und ELISA gemäß Herstelleranweisung gemessen. Die Messungen mittels ELISA wurden auf die gleiche Weise durchgeführt wie die Messungen der Studienproben im Rahmen der PASTURE-/ EFRAIM-Studie zuvor.

Die Ergebnisse hinsichtlich Probenverschleppung, Kalibrationsstabilität, Analytischer und Funktioneller Sensitivität, Präzision, Wiederfindung und Linearität belegen, dass die CBA-Methode mindestens so stabile und verlässliche Messwerte generiert, wie die ELISA-Methode. In den meisten Fällen ist sie dabei jedoch bei Probenverbrauch, Kosteneffizienz, Reproduzierbarkeit und Benutzerfreundlichkeit überlegen.

5 Zusammenfassungen

Die Vergleichbarkeit von Messergebnissen identischer Proben zeigt, dass die Ergebnisse zwischen ELISA und CBA mit Korrelationskoeffizienten (Pearson) zwischen 0,854 (TNF- α) und 0,930 (IL-10) für unverdünnt gemessene Proben korrelieren.

Die Konkordanzkoeffizienten nach Lin, sowie die Darstellung der Messergebnisse nach Bland und Altman zeigen nur eine gute bis mäßige Übereinstimmung der Messergebnisse in niedrigen Konzentrationsbereichen und eine schlechte Übereinstimmung in hohen Konzentrationsbereichen.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen mit Einschränkungen einen Vergleich der Werte zwischen 5 pg/ml bis maximal 100 pg/ml für IL-5 zu, für IL-10 von 20 pg/ml bis 300 pg/ml, für IFN- γ und TNF- α von 20 pg/ml bis 1000 pg/ml.

Die Ursache liegt höchstwahrscheinlich in den unterschiedlichen Antikörpern der beiden Methoden, am Vorliegen von heterophilen Antikörpern, sowie an Verdünnungseffekten.

Eine Lösung der dargestellten Probleme kann die Aufteilung der Messergebnisse in Kategorien sein. Die Zugehörigkeit zu einer Kategorie kann dann zwischen den Messmethoden verglichen werden.

5.2 Abstract

In the course of the prospective multicentre cohortstudy PASTURE/ EFRAIM, factors that influence the development of childhood asthma and allergy were investigated.

One part has been the creation of an image of the different T-cell-profiles by measuring cytokines at different time points. The usually used ELISA for cytokine measurement is regarded as the gold standard, but is very time-, money-, personell- and sample-consuming. Therefore, cytokine measurement should be switched to a high-throughput system, the „cytometric bead array assay (CBA)“-system from BD Biosciences.

The aim of this paper is to validate the CBA-method, to investigate the quality of measurements in comparison to ELISA and the comparability of both methods.

The comparison of methods based on 556 samples of forty study members which

5 Zusammenfassungen

were measured in parallel according to the manufacturer's manual. The ELISA measurements were performed according to the PASTURE-/ EFRAIM- study protocol.

The results concerning sample carryover, calibration stability, analytical and functional sensitivity, imprecision, recovery and linearity show, that CBA generates at least as stable and reliable results as the ELISA and is, in most cases, superior with regard to sample consumption, cost effectiveness, reproducibility, and usability.

With regard to the comparability of identical samples, the measurement results show correlations coefficients (Pearson) between 0,854 (TNF- α) and 0,930 (IL-10) for undiluted samples.

The concordance correlation coefficient according to Lin, as well as the graphical illustration according to Bland and Altman shows a fair agreement of measurement results for low concentrations and bad agreement in high concentrations.

The present results allow the comparison of the results with certain limitations between 5 pg/ml and 100 pg/ml for IL-5, for IL-10 between 20 pg/ml and 300 pg/ml, for IFN- γ and TNF- α between 20 pg/ml and 1000 pg/ml.

The reason can most likely be seen in the use of different antibody pairs, the existence of heterophilic antibodies, and dilution effects.

A solution to the lack of agreement of the measured values between the two methods can be the division to categories. The membership to a certain category may then be compared between CBA and ELISA.

A Abkürzungsverzeichnis

AB/AM	Antibiotika und Antimykotika
APC	Antigen presenting cell (Antigenpräsentierende Zelle)
CBA	cytometric bead array
CD	cluster of differentiation
DC	dendritic cell (Dendritische Zelle)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	fetal calf serum
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IU	international unit(s), internationale Einheit(en)
LOD	limit of detection (kleinste messbare Menge)
LOQ	limit of quantification (kleinste quantifizierbare Menge)
LPS	Lipopolysaccharide
MBAA	multiplexed bead array assay
MFI	mean fluorescence intensity (mittlere Fluoreszenzintensität)
MHC	major histocompatibility complex
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PGN	Peptidoglycan
PHA	Phytohemagglutinin

A Abkürzungsverzeichnis

PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PRR	pattern recognition receptor
SEB	staphylococcal enterotoxin B
SOP	Standard Operating Procedure
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TCR	t-cell receptor (T-Zell Rezeptor)
TLR	toll-like receptor (toll-like-Rezeptor)
TNF	Tumornekrosefaktor

B Literaturverzeichnis

- AGNELLO, DAVIDE, C. S. R. LANKFORD, J. BREM, A. MORINOBU, M. GADINA, J. J. O'SHEA und D. M. FRUCHT (2003). *Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights*. J Clin Immunol, 23(3):147–61.
- ALM, J. S., J. SWARTZ, G. LILJA, A. SCHEYNIUS und G. PERSHAGEN (1999). *Atopy in children of families with an anthroposophic lifestyle*. Lancet, 353(9163):1485–8.
- ANANDAN, C., U. NURMATOV, O. C. P. VAN SCHAYCK und A. SHEIKH (2010). *Is the prevalence of asthma declining? Systematic review of epidemiological studies*. Allergy, 65(2):152–67.
- ASHER, M. INNES, S. MONTEFORT, B. BJORKSTEN, C. K. W. LAI, D. P. STRACHAN, S. K. WEILAND und H. WILLIAMS (2006). *Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys*. Lancet, 368(9537):733–43.
- AVERBECK, MARCO, C. GEBHARDT, F. EMMRICH, R. TREUDLER und J. C. SIMON (2007). *Immunologic principles of allergic disease*. J Dtsch Dermatol Ges, 5(11):1015–28.
- BAUER, STEFAN, D. HANGEL und P. YU (2007). *Immunobiology of toll-like receptors in allergic disease*. Immunobiology, 212(6):521–33.
- BEASLEY, A, U. KEIL, E. VON MUTIUS und N. PEARCE (1998). *Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee*. Lancet, 351(9111):1225–32.
- BLAND, J. M. und D. G. ALTMAN (1986). *Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement*. Lancet, 1(8476):307–10.
- BLAND, J. M. und D. G. ALTMAN (1999). *Measuring agreement in method comparison studies*. Statistical methods in medical research, 8(2):135–60.
- BLAND, J. M. und D. G. ALTMAN (2003). *Applying the right statistics: analyses of measurement studies*. Ultrasound in obstetrics gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, 22(1):85–93.
- BORG, LONE, J. KRISTIANSEN, J. M. CHRISTENSEN, K. F. JEPSEN und L. K. POULSEN (2002). *Evaluation of accuracy and uncertainty of ELISA assays for the determination of interleukin-4, interleukin-5, interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha*. Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC, 40(5):509–19.

B LITERATURVERZEICHNIS

- BRAUN-FAHRLANDER, C., M. GASSNER, L. GRIZE, U. NEU, F. H. SENNHAUSER, H. S. VARONIER, J. C. VUILLE und B. WUTHRICH (1999). *Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution.* Clin Exp Allergy, 29(1):28–34.
- BRAUN-FAHRLANDER, CHARLOTTE, J. RIEDLER, U. HERZ, W. EDER, M. WASER, L. GRIZE, S. MAISCH, D. CARR, F. GERLACH, A. BUFE, R. P. LAUENER, R. SCHIERL, H. RENZ, D. NOWAK und E. VON MUTIUS (2002). *Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children.* N Engl J Med, 347(12):869–77.
- BROOKS, COLLIN, N. PEARCE und J. DOUWES (2013). *The hygiene hypothesis in allergy and asthma: an update.* Current opinion in allergy and clinical immunology, 13(1):70–7.
- CELEDON, JUAN C., R. J. WRIGHT, A. A. LITONJUA, D. SREDL, L. RYAN, S. T. WEISS und D. R. GOLD (2003). *Day care attendance in early life, maternal history of asthma, and asthma at the age of 6 years.* Am J Respir Crit Care Med, 167(9):1239–43.
- CHEN, R., L. LOWE, J. D. WILSON, E. CROWTHER, K. TZEGGAI, J. E. BISHOP und R. VARRO (1999). *Simultaneous Quantification of Six Human Cytokines in a Single Sample Using Microparticle-based Flow Cytometric Technology.* Clinical chemistry, 45(9):1693–1694.
- COOK, E. B., J. L. STAHL, L. LOWE, R. CHEN, E. MORGAN, J. WILSON, R. VARRO, A. CHAN, F. M. GRAZIANO und N. P. BARNEY (2001). *Simultaneous measurement of six cytokines in a single sample of human tears using microparticle-based flow cytometry: allergics vs. non-allergics.* Journal of immunological methods, 254(1-2):109–18.
- DI SABATO, G., J. M. HALL und L. THOMPSON (1987). *T cell mitogens and polyclonal B cell activators.* Methods Enzymol, 150:3–17.
- DOSSUS, LAURE, S. BECKER, D. ACHAIANTRE, R. KAAKS und S. RINALDI (2009). *Validity of multiplex-based assays for cytokine measurements in serum and plasma from 'non-diseased' subjects: comparison with ELISA.* Journal of immunological methods, 350(1-2):125–32.
- DUPONT, NEFERTITI C., K. WANG, P. D. WADHWA, J. F. CULHANE und E. L. NELSON (2005). *Validation and comparison of luminex multiplex cytokine analysis kits with ELISA: determinations of a panel of nine cytokines in clinical sample culture supernatants.* Journal of reproductive immunology, 66(2):175–91.
- ELLINGTON, ALLISON A., I. J. KULLO, K. R. BAILEY und G. G. KLEE (2010). *Antibody-based protein multiplex platforms: technical and operational challenges.* Clinical chemistry, 56(2):186–93.
- ELSHAL, MOHAMED F. und J. P. MCCOY (2006). *Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA.* Methods (San Diego, Calif.), 38(4):317–23.
- FISHBEIN, ANNA B. und R. L. FULEIHAN (2012). *The hygiene hypothesis revisited: does exposure to infectious agents protect us from allergy?.* Current opinion in pediatrics, 24(1):98–102.

B LITERATURVERZEICHNIS

- FLOISTRUP, HELEN, J. SWARTZ, A. BERGSTROM, J. S. ALM, A. SCHEYNIUS, M. VAN HAGE, M. WASER, C. BRAUN-FAHRLANDER, D. SCHRAM-BIJKERK, M. HUBER, A. ZUTAVERN, E. VON MUTIUS, E. UBLAGGER, J. RIEDLER, K. B. MICHAELS und G. PERSHAGEN (2006). *Allergic disease and sensitization in Steiner school children*. The Journal of allergy and clinical immunology, 117(1):59–66.
- FREI, R., R. P. LAUENER, R. CRAMERI und L. O'MAHONY (2012). *Microbiota and dietary interactions: an update to the hygiene hypothesis?*. Allergy, 67(4):451–61.
- GARN, HOLGER und H. RENZ (2007). *Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis*. Immunobiology, 212(6):441–52.
- GREBENCHTCHIKOV, NICOLAI, J. VAN DER VEN-JONGEKRIJG, G. J. PESMAN, A. GEURTS-MOESPOT, J. W. M. VAN DER MEER und F. C. G. J. SWEEP (2005). *Development of a sensitive ELISA for the quantification of human tumour necrosis factor-alpha using 4 polyclonal antibodies*. European cytokine network, 16(3):215–22.
- GROUVEN, U., R. BENDER, A. ZIEGLER und S. LANGE (2007). *Vergleich von Messmethoden*. Deutsche medizinische Wochenschrift (1946), 132 Suppl 1:e69–73.
- GUGGENMOOS-HOLZMANN, IRENE und K.-D. WERNECKE (1996). *Medizinische Statistik*. Blackwell Wiss.-Verl., Berlin [u.a.].
- HEINRICH, J., B. HOELSCHER, C. FRYE, I. MEYER, M. WJST und H. E. WICHMANN (2002). *Trends in prevalence of atopic diseases and allergic sensitization in children in Eastern Germany*. Eur Respir J, 19(6):1040–6.
- HERMAN, A., J. W. KAPPLER, P. MARRACK und A. M. PULLEN (1991). *Superantigens: mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses*. Annu Rev Immunol, 9:745–72.
- HESSELMAR, B., N. ABERG, B. ABERG, B. ERIKSSON und B. BJORKSTEN (1999). *Does early exposure to cat or dog protect against later allergy development?*. Clin Exp Allergy, 29(5):611–7.
- HODGE, G., S. HODGE, R. HASLAM, A. MCPHEE, H. SEPULVEDA, E. MORGAN, I. NICHOLSON und H. ZOLA (2004). *Rapid simultaneous measurement of multiple cytokines using 100 microl sample volumes—association with neonatal sepsis*. Clinical and experimental immunology, 137(2):402–7.
- HOFFMANN, ULRICH (2000). *Spezialbericht Allergien des Statistischen Bundesamts*. <http://www.gbe-bund.de>, eingesehen am 20. 09.2009.
- IBELGAUFTS, HORST (2009). *Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopaedia (COPE)*. <http://www.copewithcytokines.de>, Version 22.6, eingesehen am 22.11.2009.
- JAGER, WILCO DE, K. BOURCIER, G. T. RIJKERS, B. J. PRAKKEN und V. SEYFERT-MARGOLIS (2009). *Prerequisites for cytokine measurements in clinical trials with multiplex immunoassays*. BMC immunology, 10:52.
- JAGER, WILCO DE, H. TE VELTHUIS, B. J. PRAKKEN, W. KUIS und G. T. RIJKERS (2003). *Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells*. Clinical and diagnostic laboratory immunology, 10(1):133–9.
- JANSON, C., J. ANTO, P. BURNEY, S. CHINN, R. DE MARCO, J. HEINRICH, D. JARVIS, N. KUENZLI, B. LEYNAERT, C. LUCZYNSKA, F. NEUKIRCH, C. SVANES,

B LITERATURVERZEICHNIS

- J. SUNYER und M. WJST (2001). *The European Community Respiratory Health Survey: what are the main results so far? European Community Respiratory Health Survey II*. Eur Respir J, 18(3):598–611.
- KAY, A. B. (2001). *Allergy and allergic diseases. First of two parts*. N Engl J Med, 344(1):30–7.
- KHAN, SAMEENA S., M. S. SMITH, D. REDA, A. F. SUFFREDINI und J. P. J. MCCOY (2004). *Multiplex bead array assays for detection of soluble cytokines: comparisons of sensitivity and quantitative values among kits from multiple manufacturers*. Cytometry. Part B, Clinical cytometry, 61(1):35–9.
- KUMAR, HIMANSHU, T. KAWAI und S. AKIRA (2011). *Pathogen recognition by the innate immune system*. International reviews of immunology, 30(1):16–34.
- LANGE, S. und R. BENDER (2007). *Lineare Regression und Korrelation*. Deutsche medizinische Wochenschrift (1946), 132 Suppl 1:e9–11.
- LARCHE, MARK, C. A. AKDIS und R. VALENTA (2006). *Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy*. Nature reviews. Immunology, 6(10):761–71.
- LEDUR, A., C. FITTING, B. DAVID, C. HAMBERGER und J. M. CAVAILLON (1995). *Variable estimates of cytokine levels produced by commercial ELISA kits: results using international cytokine standards*. Journal of immunological methods, 186(2):171–9.
- LEMANSKE, ROBERT F. JR und W. W. BUSSE (2010). *Asthma: clinical expression and molecular mechanisms*. The Journal of allergy and clinical immunology, 125(2 Suppl 2):S95–102.
- LENG, SEAN X., J. E. MCELHANEY, J. D. WALSTON, D. XIE, N. S. FEDARKO und G. A. KUCHEL (2008). *ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 63(8):879–84.
- LIN, L. I. (1989). *A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility*. Biometrics, 45(1):255–68.
- LIU, W. S. und C. A. HECKMAN (1998). *The sevenfold way of PKC regulation*. Cell Signal, 10(8):529–42.
- MAECKER, HOLDEN T., J. HASSLER, J. K. PAYNE, A. SUMMERS, K. COMATAS, M. GHANAYEM, M. A. MORSE, T. M. CLAY, H. K. LYERLY, S. BHATIA, S. A. GHANEKAR, V. C. MAINO, C. DELAROSA und M. L. DISIS (2008). *Precision and linearity targets for validation of an IFN γ ELISPOT, cytokine flow cytometry, and tetramer assay using CMV peptides*. BMC immunology, 9:9.
- MANICASSAMY, SANTHAKUMAR und B. PULENDRAN (2009). *Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors*. Semin Immunol, 21(4):185–93.
- MARTIN, R. F. (2000). *General deming regression for estimating systematic bias and its confidence interval in method-comparison studies*. Clinical chemistry, 46(1):100–4.
- MCINNES, IAIN B. und G. SCHETT (2011). *The pathogenesis of rheumatoid arthritis*. The New England journal of medicine, 365(23):2205–19.
- MORGAN, EDWARD, R. VARRO, H. SEPULVEDA, J. A. EMBER, J. APGAR, J. WILSON, L. LOWE, R. CHEN, L. SHIVRAJ, A. AGADIR, R. CAMPOS, D. ERNST und A. GAUR (2004). *Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology*. Clinical immunology (Orlando, Fla.), 110(3):252–66.

B LITERATURVERZEICHNIS

- MURPHY, KENNETH M., P. TRAVERS, M. WALPORT, C. A. JANEWAY, L. SEIDLER und M. EHRENSTEIN (2009). *Janeway Immunologie*. Spektrum Akad. Verl, Heidelberg, 7. Aufl.
- MUTIUS, ERIKA VON und D. VERCELLI (2010). *Farm living: effects on childhood asthma and allergy*. *Nature reviews. Immunology*, 10(12):861–8.
- MUTIUS, E. VON (2009). *EFRAIM - Mechanisms of Early Protective Exposures on Allergy Development*. <http://www.efraim-online.com/project.html>, eingesehen am 27.09.2011.
- MUTIUS, E. VON und S. SCHMID (2006). *The PASTURE project: EU support for the improvement of knowledge about risk factors and preventive factors for atopy in Europe*. *Allergy*, 61(4):407–13.
- NANDAKUMAR, SUBHADRA, C. W. MILLER und U. KUMARAGURU (2009). *T regulatory cells: an overview and intervention techniques to modulate allergy outcome*. *Clin Mol Allergy*, 7:5.
- NICOLAI, T., B. BELLACH, E. V. MUTIUS, W. THEFELD und H. HOFFMEISTER (1997). *Increased prevalence of sensitization against aeroallergens in adults in West compared with East Germany*. *Clin Exp Allergy*, 27(8):886–92.
- NICOLAI, T. und E. VON MUTIUS (1996). *Respiratory hypersensitivity and environmental factors: East and West Germany*. *Toxicol Lett*, 86(2-3):105–13.
- NOWAK, D., J. HEINRICH, R. JORRES, G. WASSMER, J. BERGER, E. BECK, S. BOCZOR, M. CLAUSSEN, H. E. WICHMANN und H. MAGNUSSEN (1996). *Prevalence of respiratory symptoms, bronchial hyperresponsiveness and atopy among adults: west and east Germany*. *Eur Respir J*, 9(12):2541–52.
- O'GARRA, A. und N. ARAI (2000). *The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation*. *Trends Cell Biol*, 10(12):542–50.
- PAPPU, BHANU P., P. ANGKASEKWINAI und C. DONG (2008). *Regulatory mechanisms of helper T cell differentiation: new lessons learned from interleukin 17 family cytokines*. *Pharmacol Ther*, 117(3):374–84.
- PEARCE, N., J. SUNYER, S. CHENG, S. CHINN, B. BJORKSTEN, M. BURR, U. KEIL, H. R. ANDERSON und P. BURNEY (2000). *Comparison of asthma prevalence in the ISAAC and the ECRHS. ISAAC Steering Committee and the European Community Respiratory Health Survey. International Study of Asthma and Allergies in Childhood*. *Eur Respir J*, 16(3):420–6.
- PFEFFERLE, PETRA INA, G. BUECHELE, N. BLUEMER, M. ROPONEN, M. J. EGE, S. KRAUSS-ETSCHMANN, J. GENUNEIT, A. HYVARINEN, M.-R. HIRVONEN, R. LAUENER, J. PEKKANEN, J. RIEDLER, J. C. DALPHIN, B. BRUNEKEEF, C. BRAUN-FAHRLANDER, E. VON MUTIUS und H. RENZ (2010). *Cord blood cytokines are modulated by maternal farming activities and consumption of farm dairy products during pregnancy: the PASTURE Study*. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(1):108–15.e1–3.
- PFEFFERLE, PETRA INA, S. SEL, M. J. EGE, G. BUECHELE, N. BLUEMER, S. KRAUSS-ETSCHMANN, I. HERZUM, C. E. ALBERS, R. P. LAUENER, M. ROPONEN, M.-R. HIRVONEN, D. A. VUITTON, J. RIEDLER, B. BRUNEKREEF, J.-C. DALPHIN, C. BRAUN-FAHRLANDER, J. PEKKANEN, E. VON MUTIUS und H. RENZ (2008).

B LITERATURVERZEICHNIS

- Cord blood allergen-specific IgE is associated with reduced IFN-gamma production by cord blood cells: the Protection against Allergy-Study in Rural Environments (PA-STURE) Study.* The Journal of allergy and clinical immunology, 122(4):711–6.
- PRABHAKAR, UMA, E. EIRIKIS, M. REDDY, E. SILVESTRO, S. SPITZ, C. N. PENDLEY, H. M. DAVIS und B. E. MILLER (2004). *Validation and comparative analysis of a multiplexed assay for the simultaneous quantitative measurement of Th1/Th2 cytokines in human serum and human peripheral blood mononuclear cell culture supernatants.* Journal of immunological methods, 291(1-2):27–38.
- RAY, CHAD A., R. R. BOWSHER, W. C. SMITH, V. DEVANARAYAN, M. B. WILLEY, J. T. BRANDT und R. A. DEAN (2005). *Development, validation, and implementation of a multiplex immunoassay for the simultaneous determination of five cytokines in human serum.* Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 36(5):1037–44.
- RENZ, HARALD (2004). *The biology of T-cells in allergy and asthma: beyond the TH1/TH2 concept.* Pediatr Pulmonol Suppl, 26:40–1.
- RICHENS, JOANNA L., R. A. URBANOWICZ, R. METCALF, J. CORNE, P. O'SHEA und L. FAIRCLOUGH (2010). *Quantitative validation and comparison of multiplex cytokine kits.* Journal of biomolecular screening, 15(5):562–8.
- ROMAGNANI, SERGIO (2004). *Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance.* J Allergy Clin Immunol, 113(3):395–400.
- STRACHAN, D. P. (1989). *Hay fever, hygiene, and household size.* BMJ, 299(6710):1259–60.
- STRACHAN, D. P. (1997). *Allergy and family size: a riddle worth solving.* Clin Exp Allergy, 27(3):235–6.
- TIMMONS, BRIAN W., M. J. HAMADEH und M. A. TARNOPOLSKY (2009). *Two methods for determining plasma IL-6 in humans at rest and following exercise.* European journal of applied physiology, 105(1):13–8.
- TOEPLITZ, BARBARA K., A. I. COHEN, P. T. FUNKE, W. L. PARKER und J. Z. GOUGOUTAS (1979). *Structure of ionomycin - a novel diacidic polyether antibiotic having high affinity for calcium ions.* Journal of the American Chemical Society, 101(12):3344–53.
- VIGNALI, DARIO A. A., L. W. COLLISON und C. J. WORKMAN (2008). *How regulatory T cells work.* Nature reviews. Immunology, 8(7):523–32.
- VON EHRENSTEIN, O. S., E. VON MUTIUS, S. ILLI, L. BAUMANN, O. BOHM und R. VON KRIES (2000). *Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers.* Clin Exp Allergy, 30(2):187–93.
- WADHWA, M. und R. THORPE (1997). *Standardization and calibration of cytokine immunoassays: meeting report and recommendations.* Cytokine, 9(11):791–3.
- WAMBRE, ERIK, E. A. JAMES und W. W. KWOK (2012). *Characterization of CD4+ T cell subsets in allergy.* Current opinion in immunology, 24(6):700–6.
- YOUNG, SHIH-HOUNG, J. M. ANTONINI, J. R. ROBERTS, A. D. ERDELY und P. C. ZEIDLER-ERDELY (2008). *Performance evaluation of cytometric bead assays for the measurement of lung cytokines in two rodent models.* Journal of immunological methods, 331(1-2):59–68.

B LITERATURVERZEICHNIS

ZHOU, XIN, M. S. FRAGALA, J. E. MCELHANEY und G. A. KUCHEL (2010). *Conceptual and methodological issues relevant to cytokine and inflammatory marker measurements in clinical research*. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 13(5):541–7.

C Abbildungsverzeichnis

1.1	Entstehung akuter und chronischer allergischer Reaktionen	8
1.2	T _H -Zell-Differenzierung und beteiligte Zytokine	11
1.3	Regulation der T _H -Zell-Differenzierung durch Zytokine und Transkriptionsfaktoren	12
1.4	TLRs und ihre jeweiligen Liganden, intrazelluläre Signaltransduktion und induzierte T-Zell-Differenzierung	17
2.1	FACSArray Bioanalyzer, äußerer Aspekt	30
2.2	Schematischer Aufbau des FACSArray Bioanalyzers	31
3.1	Einfluss der Plattenposition auf die gemessene Konzentration	37
3.2	Rohwerte der Standardverdünnungen an vier Messtagen	38
3.3	Intra-Assay Variation, Graph a	43
3.3	Intra-Assay Variation, Graphen b und c	44
3.3	Intra-Assay Variation, Graphen d und e	45
3.4	Inter-Assay Variation	47
3.5	Verdünnungslinearität, Graphen der Zytokine IL-1 bis IL-12	51
3.5	Verdünnungslinearität, Graphen der Zytokine IL-13 bis Interferon-gamma	52
3.6	Darstellung der Wertepaare für IL-12	54
3.7	Darstellung der Wertepaare mit Regressionsgerade nach Deming	55
3.8	Bland-Altman-Blot des Zytokins IL-5	57
3.8	Bland-Altman-Blots der Zytokine IL-10 und IFN- γ	58
3.8	Bland-Altman-Blot des Zytokins TNF- α	59

D Tabellenverzeichnis

2.1	Definition ausgewählter Validierungsparameter	33
3.1	Ausmaß der Schwankung ausgewählter Standardkonzentrationsstufen verschiedener Messtage mit gleicher Geräteeinstellung	39
3.2	Analytische Sensitivität - LOD und LOQ mit 95%-Konfidenzintervallen	40
3.3	V_K -Werte der Verdünnungsreihe im niedrigen Konzentrationsbereich .	42
3.4	mittlere Variationskoeffizienten der Messpräzision	46
3.5	mittlere Variationskoeffizienten der Methodenpräzision	48
3.6	Wiederfindungsrate von zwei zugesetzten Konzentrationen	49
3.7	Wiederfindungsrate - Ergebnisse des Herstellers	49
3.8	Korrelationskoeffizienten nach Pearson (r) und Lin (CCC_{Lin})	56

E Liste der Materialien

Tabelle E.1: Aufstellung allgemeiner und für ELISA genutzter Materialien

Artikel	Bezeichnung	Firma	Bestellnummer
384-Well-Platte	384 well clear Maxisorp	NUNC A/S	464718
24-Well-Platte	Falcon® Multiwell	Becton Dickinson Labware	353504
BM blue POD-Substrat	3,5'-5,5'- Tetramethylbenzidin (TMB)	Roche Diagnostics GmbH	11484281061
Desinfektionsmittel	Softasept	Reagenzienzentrale	00008171
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	Sigma, Deisenhofen, Germany	D8418
Einfrier-Pappschachteln	Alpha-Boxen		
Eis			
ELISA Opt-EIA-Kit IFN- γ	Capture Antibody, Detection Antibody, Enzym Reagent, Standard	BD Biosciences Pharmingen	555142
ELISA Opt-EIA-Kit TNF- α	Capture Antibody, Detection Antibody, Enzym Reagent, Standard	BD Biosciences Pharmingen	555212
ELISA Opt-EIA-Kit IL-5	Capture Antibody, Detection Antibody, Enzym Reagent, Standard	BD Biosciences Pharmingen	555202
ELISA Opt-EIA-Kit IL-10	Capture Antibody, Detection Antibody, Enzym Reagent, Standard	BD Biosciences Pharmingen	555157
ELISA Opt-EIA-Kit IL-12p70	Capture Antibody, Detection Antibody, Enzym Reagent, Standard	BD Biosciences Pharmingen	555183
ELISA-Reader	GENios	Tecan Austria GmbH	
ELISA-Reader-Software	Magellan 5.03	Tecan Austria GmbH	
FCS	Fetal calf Serum Gold	PAA Laboratories GmbH	A15-151

E Liste der Materialien

Artikel	Bezeichnung	Firma	Bestellnummer
Fein-Waage			
H ₂ SO ₄	2 mol/l		
Handschuhe unsteril	Nobaglove®-Latex, puderfrei, Größe L	Noba Verbandmittel Danz GmbH & Co. KG	905453
Kühlschränke	4 °C, -20 °C, -80 °C		
PBS	Dulbeccos' Phosphate Buffered Saline	PAA Laboratories GmbH	H15-002
Pipetten	0,5-10 µl (grau)	Eppendorf Reference	
	10-100 µl (gelb)		
	50-200 µl (gelb)	Eppendorf Research	
	100-1000 µl (blau)		
100-5000 µl			
	Finnpipette® 12*30-300 µl	Labsystems	
	Finnpipette® 12*50-300 µl	Thermo Scientific	
Pipettenspitzen	0,1-20 µl (durchsichtig)	epT.I.P.S.	0030 000.838
	2-200 µl (gelb)	Eppendorf	0030 000.870
	50-1000 µl (blau)		0030 000.919
	100-5000 µl (durchs.)		0030 000.987
	5-300 µl (durchs.)	Finntip® 300	940126
Probenständer	diverse		
RPMI 1640	GIBCO® +GlutaMAX™	Invitrogen GmbH, Karlsruhe	61870-010
Schüttler	IKA® Schüttler MTS4	IKA®-Werke GmbH & Co. KG	
Stimuli	PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate)	Sigma, Deisenhofen, Germany	P8139
	Ionomycin von Streptomyces conglobatus		I0634
	LPS (Lipopolysaccharid) von E. coli		L2630

E Liste der Materialien

Artikel	Bezeichnung	Firma	Bestellnummer
Stimuli	SEB (Staphylococcal enterotoxin B) von Staph. aureus	Sigma (Fluka), Deisenhofen, Germany	S4881
	PHA (Phytohemagglutinin) Lektin von Phaseolus vulgaris (rote Feuerbohne)		L1668
	PGN (Peptidoglycan) von Staph. aureus		77140
	Pam3CSK ₄ (synthetisches bakterielles Lipoprotein)	InvivoGen, Toulouse, France	tlrl-pms
Styroporkisten			
Tubes	15 ml Tube	Sarstedt	62.554.002
	50 ml Tube	Greiner bio-one Cellstar®	227261
Tween	Polyoxyethylene Sorbitant Monolaurate	Carl Roth GmbH & Co. KG	9127.1
Verschlussfilm	Parafilm®	Pechiney plastic packaging	
Wasserbad			

Tabelle E.2: genutzte Software zur Erstellung der Doktorarbeit

Artikel	Bezeichnung	Firma
Texteditor	T _E XnicCenter 1.0 Stable Release Candidate 1	BCGSoft Ltd. Cristi Posea
L ^A T _E X Distribution	MikT _E X	©2011 Christian Schenk
Grafikprogramm	GraphPad Prism 5	

E Liste der Materialien

Tabelle E.3: Aufstellung der für BD™ CBA genutzten Reagenzien

Artikel	Bezeichnung	Firma	Bestellnr.
96-Well-Platte	Falcon® Pro-Blind™ U-Bottom	Becton Dickinson Labware	353910
FACS Tubes	5 ml Flow Cytometry Tubes	Sarstedt	55.1579
Human Soluble Protein Master Buffer Kit	BD™ Cytometric Bead Array (CBA)	BD Biosciences	558625
Human IL-1β Flex Set	BD™ CBA	BD Biosciences	558279
	Capture Bead B4 Mat. No: 51-9005302		
	Standard Mat. No: 51-9003493		
	PE Detection Reagent Mat. No: 51-9004060		
Human IL-4 Flex Set	BD™ CBA	BD Biosciences	558272
	Capture Bead A5 Mat. No: 51-9005285		
	Standard Mat. No: 51-9003495		
	PE Detection Reagent Mat. No: 51-9004037		
Human IL-5 Flex Set	BD™ CBA	BD Biosciences	558278
	Capture Bead A6 Mat. No: 51-9005292		
	Standard Mat. No: 51-9003497		
	PE Detection Reagent Mat. No: 51-9004054		
Human IL-6 Flex Set	BD™ CBA	BD Biosciences	558276
	Capture Bead A7 Mat. No: 51-9005287		
	Standard Mat. No: 51-9003499		
	PE Detection Reagent Mat. No: 51-9004046		
Human IL-10 Flex Set	BD™ CBA	BD Biosciences	558274
	Capture Bead B7 Mat. No: 51-9005291		
	Standard Mat. No: 51-9005301		
	PE Detection Reagent Mat. No: 51-9004043		
Human IL-12p70 Flex Set	BD™ CBA	BD Biosciences	558283
	Capture Bead E5 Mat. No: 51-9005304		
	Standard Mat. No: 51-9003505		
	PE Detection Reagent Mat. No: 51-9004063		

E Liste der Materialien

Artikel	Bezeichnung	Firma	Bestellnr.
Human IL-13 Flex Set	BD™ CBA	BD Biosciences	558450
	Capture Bead E6 Mat. No: 51-9005346		
	Standard Mat. No: 51-9004554		
	PE Detection Reagent Mat. No: 51-9004624		
Human IL-17A Flex Set	BD™ CBA	BD Biosciences	560383
	Capture Bead B5 Mat. No: 51-9006083		
	Standard Mat. No: 51-9006068		
	PE Detection Reagent Mat. No: 51-9006081		
Human IFN- γ Flex Set	BD™ CBA	BD Biosciences	558269
	Capture Bead E7 Mat. No: 51-9005281		
	Standard Mat. No: 51-9003507		
	PE Detection Reagent Mat. No: 51-9004031		
Human TNF- Flex Set	BD™ CBA	BD Biosciences	558273
	Capture Bead D9 Mat. No: 51-9005298		
	Standard Mat. No: 51-9003509		
	PE Detection Reagent Mat. No: 51-9004040		
Reinigungs- flüssigkeit	FACS Clean	BD Biosciences	340345
Sheath Fluid	BD FACSTFlow™	BD Biosciences	342003
Software	BD FACSTArray System Software, Version 1.0.4	BD Biosciences	
	FCAP Array	Version 1.0.1, Soft Flow	
	FCS Filter	Version 1.0.2, Soft Flow	
Zentrifuge	Megafuge 1.0R	Heraeus	

F Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren

Adamkiewicz, Aumüller

Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Bauman, Baumann, Becker, Berger, Bette, Bien, Brehm

Cetin, Czubayko

Daut, Del Rey, Dietrich, Donner-Banzhoff

Eberhart, Eilers, Fendrich, Feuser, Fuchs-Winkelmann

Geks, Gemsa, Gerdes, Glorius, Görg, Gress, Grimm, Grundmann, Grzeschik

Hasilik, Hegele, Hertl, Höffken, Hofmann, Höglinger, Horn, Hoyer

Kalinowski, Kann, Kaufmann, Kerzel, Kill, Klenk, Klose, Köhler, Koolman, Krebber, Krieg, Kroll, Krones, Kuhlmann, Kwee

Langer, Lehr, Lill, Liss, Löffler, Lohoff

Maier, Maisch, Mandrek, Martin, Meyer, Mittag, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters

Neubauer, Neumüller, Nimphius

Oertel, Olbert, Opitz

Pagenstecher, Plant

Ramaswamy, Rausch, Renz, Richter, Riße, Röhm, Rölke, Röper, Rosenow, Rothmund, Ruchholtz

Schade, Schäfer, Schmidt, Schofer, Schrader, Schultze, Seitz, Sesterhenn, Sommer, Sönnichsen, Steiniger

Tackenberg, Tibesku

Vogelmeyer, Voigt

Wagner, Waldegger, Weihe, Wennemuth, Werner, Westermann, Wiegand, Wilhelm, Wohltmann, Wulf

Yu

Zemlin

G Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Leiter des Instituts für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Molekulare Diagnostik des Universitätsklinikums der Philipps-Universität Marburg, Prof. Dr. HARALD RENZ für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Unterstützung während der Promotionszeit.

Ganz besonders danke ich meiner Betreuerin Frau PD Dr. Dr. PETRA INA PFEFFERLE für die Unterstützung während der gesamten Promotionszeit, insbesondere bei der Strukturierung der Ergebnisse und bei der Durchsicht der Arbeit.

Sehr herzlich danke ich Frau Dr. GABI KÖLLISCH für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Messungen, der anschließenden Aufarbeitung der Ergebnisse und für die Durchsicht der Arbeit.

Ebenso danke ich Frau PD Dr. NADIA AL-FAKHRI für ihre Unterstützung bei der Planung der Messungen auf Gütekriterien des CBAs, sowie bei der Erstellung der Publikation.

Ich danke Frau Dr. GISELA BÜCHELE für ihre Hilfe bei epidemiologischen und statistischen Problemen.

Ein besonders herzliches Dankeschön gebührt den technischen Mitarbeitern der Abteilung für die Hilfe bei der praktischen Umsetzung. Vielen Dank an LYDIA LERCH, ANJA SPIESS-NAUMANN, ANNIKA RÜHL und WILMA HASTEDT.

Großer Dank gebührt meiner Familie.

Ich danke meinen Eltern, die mich seit Kindesbeinen in jeder erdenklichen Hinsicht unterstützt und gefördert haben.

Ich danke meiner Frau Maria-Katharina, die mich stets ermuntert und auf vielfältige Weise unterstützt hat und der Entstehung dieser Arbeit viel Zeit eingeräumt hat.

Ich danke meiner kleinen Tochter Johanna, die mich durch ihre bezaubernde Art lehrt, Dinge aus neuen Blickwinkeln zu betrachten.

Danke!

Short communication

Analytical performance of a multiplexed, bead-based cytokine detection system in small volume samples

Martin Bomert^{1,a}, Gabi Köllisch^{1,a}, Marjut Roponen², Roger Lauener^{3,4}, Harald Renz¹, Petra I. Pfefferle¹ and Nadia Al-Fakhri^{1,*}

¹ Institute of Laboratory Medicine and Pathobiochemistry, Molecular Diagnostics, Philipps University, Marburg, Germany

² Department of Environmental Health, National Institute for Health and Welfare, Kuopio, Finland

³ University of Zürich, Children's Hospital, and Christine Kühne-Center for Allergy Research and Education, Zürich, Switzerland

⁴ Children's Allergy and Asthma Hospital, Hochgebirgsklinik, and Christine Kühne-Center for Allergy Research and Education, Davos, Switzerland

Abstract

Background: Multiplexed cytokine measurement offers many advantages over the conventional enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) format when applied in large-scale epidemiological studies or clinical trials. In the present study we set out to define the reliability and consistency of a suspension multiplexed protein array, the cytometric bead array (CBA), in large-scale, longitudinal studies.

Methods: The cytokines interleukin (IL)-5, IL-10, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ) were measured in pediatric samples from childhood asthma and allergy studies. Analytical performance of CBA was determined in sample supernatants and CBA was compared to conventional ELISA.

Results: Within-run and total imprecision were between 5.2%–10.8% and 5.6%–13.2%, respectively, at three different concentrations for all cytokines. Slopes of dilution linearity were between 1.01 and 1.31 for the four cytokines. The recovery rate at two different concentrations of the cytokines was between 97% and 113%. Lower limits of detection and quantification as well as functional sensitivity were determined. Comparison of the multiplex array and solid phase method showed good correlation with r between 0.82 and 0.93. The

sample volume required for the multiplex format was 25% of the ELISA sample volume.

Conclusions: CBA analytical evaluation and comparison to an ELISA format demonstrated high reproducibility, sensitivity and good applicability for small volume samples.

Keywords: allergy; analytical performance; cytokine measurement; immunology; multiplex assay system.

Analysis of immune functions in bio-samples collected in population-based epidemiological studies or large-scale clinical trials is of increasing importance. An important aspect in this regard is the simultaneous assessment of a large panel of cytokines to obtain a ‘‘fingerprint’’ of innate and/or adaptive immune responses. Clinical trials employing pediatric samples add further requirements on careful utilization of the often limited sample volume. This may require multiple cytokine measurements under high throughput conditions in small sample volumes. Therefore, we have validated and implemented a multiplex immunoassay system allowing measurement of multiple analytes simultaneously in a single assay procedure, the cytometric bead array (CBA) (1), using a FACSAArray bioanalyzer system (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

A recently published review by Ellington and colleagues provided an extended overview on the usage of multiplex assay techniques for protein determinations (2). Besides many advantages of this assay format, the reliability and consistency of suspension multiplexed protein arrays in large-scale studies still remains unknown and the ability to analyze many samples without affecting inter-assay imprecision has not yet been adequately documented (2). We therefore compiled the evaluation data on the CBA assay and our technical experience with this assay format in a concise report to document the applicability of this multiplex assay technique for the analysis of longitudinal series of small volume samples.

Our laboratory participates in several multicentered studies, including the birth-cohort PASTURE (Protection Against Allergies-Study in Rural Environments)/Efrain (Mechanisms of Early Protective Exposures on Allergy Development) studies, designed to assess prospectively the role of farm exposures in the development of childhood asthma and allergies in rural environments across Europe and to gain insights into cytokine networks (3). Comparability of measurements from different sampling time points and stimulations is of great importance for longitudinal studies like PASTURE or Efrain requiring high analytical quality of the employed methods. In all study samples, the signature cyto-

^a M. Bomert and G. Köllisch contributed equally to this work.

*Corresponding author: PD Dr. Nadia Al-Fakhri, Institute of Laboratory Medicine and Pathobiochemistry, Molecular Diagnostics, Philipps University Marburg, Baldingerstr., 35043 Marburg, Germany
Phone: +49-6421-5866265, Fax: +49-6421-5866189,
E-mail: alfakhri@med.uni-marburg.de

Received March 8, 2011; accepted May 5, 2011

Table 1 Validation of the multiplex array-based CBA system.

Cytokine	Analytical sensitivity (CI)		Functional sensitivity at 20%, ng/L	Within run-imprecision, %		Total imprecision, %		Recovery rate, %		Dilution linearity Slope \pm SD, intercept \pm SD		
	LOD, ng/L	LOQ, ng/L		80 ng/L	1250 ng/L	5000 ng/L	80 ng/L	1250 ng/L	5000 ng/L		625 ng/L	1250 ng/L
IL-5	1.3 (1.1–1.5)	3.1 (3.0–3.3)	1.0	5.25%	5.26%	7.02%	6.89%	9.88%	9.07%	97.6%	113.1%	1.31 \pm 0.03 10.89 \pm 42.10
IL-10	2.3 (2.0–2.6)	5.7 (5.4–6.0)	2.5	6.45%	8.80%	8.67%	5.67%	9.32%	9.57%	97.0%	98.1%	1.01 \pm 0.01 22.08 \pm 12.74
TNF- α	3.9 (3.3–4.4)	10.2 (9.6–10.7)	15.0	6.78%	8.51%	7.67%	6.84%	8.76%	8.50%	98.8%	106.1%	1.03 \pm 0.02 70.06 \pm 40.11
IFN- γ	5.9 (5.1–6.8)	15.2 (14.4–16.0)	15.0	5.72%	8.78%	10.85%	9.18%	12.80%	13.24%	100.0%	108.4%	1.11 \pm 0.02 44.67 \pm 40.04

LOD and LOQ were calculated from a series of repeated blank measurements ($n = 10$). Confidence intervals (CI) are given in parentheses. The functional sensitivity is given as absolute concentration obtained from the measurement of $n = 12$ concentrations in triplicate; the measurement range was 5–10,000 ng/L according to the manufacturer's standards. The within-run and total imprecisions ($n = 16$ or $n = 17$ measurements, respectively) are given as percent variation coefficient from the respective means. The recovery rate ($n = 6$ measurements) was calculated as follows: (final concentration – initial concentration)/added concentration. The dilution linearity is shown as slopes and intercepts for each cytokine; SD, standard deviation.

kines interleukin (IL)-5, IL-10, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ) were measured as key components of the adaptive immune balance. According to the study protocol, blood samples were drawn at birth (cord blood), 1, 4.5 and 6 years of age and stimulated as described previously (4), supernatants were stored at -80°C . The study was approved by the responsible university Ethics Committees of all participating study centers, in accordance with institutional guidelines and the Declaration of Helsinki (2008 version). Informed consent was obtained from all parents of the index children.

For validation and comparison studies, supernatants from blood samples of 4.5 years collection of the PASTURE/Efrain cohort were measured with the multiplex bead array CBA (Human CBA flex sets, BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions, paralleled by analysis with solid phase technique using Opt-EIA ELISAs (BD Biosciences). For the CBA assay, standards from 5 to 10,000 ng/L were reconstituted and serially diluted in assay diluent, standards and samples were measured in a 96-well format by means of specific antibody-coated $7.5 \mu\text{m}$ capture beads and phycoerythrin-conjugated detection antibodies on the FACSArray system (BD Biosciences). The standard curve and cytokine concentrations were calculated with FCAP Array software (version 2.0, Soft Flow, Burnsville, MN, USA, <http://www.softflow.com>). CBA measurements were compared to conventional ELISA as the standard procedure by means of Opt-EIA kits for the individual cytokines performed according to the manufacturer's instructions, as described in detail previously (4).

Our results indicated a good analytical performance in small volume samples using the CBA system (see Table 1). The dilution linearity of the system was high. Within-run and total imprecision were below 15% at low, normal and above-normal concentrations tested in the biological matrix of study samples. Analytical specificity determined by measuring the recovery rate, as well as the lower limits of detection and quantification describing analytical sensitivity, and lastly the functional sensitivity are also given in Table 1.

Comparison of the multiplex array CBA to the solid phase OptEIA method (ELISA) by linear regression analysis according to Deming showed acceptable slopes and intercepts. There were 556 samples included in the study. Data of IL-5, IL-10, IFN- γ , and TNF- α were normally distributed

Table 2 Comparison of multiplex array CBA and OptEIA method.

Cytokine	Slope \pm SD	Intercept \pm SD	r-Value
IL-5	1.69 \pm 0.07	16.03 \pm 9.69	0.903
IL-10	1.66 \pm 0.03	-44.29 \pm 9.00	0.930
IFN- γ	0.88 \pm 0.03	223.3 \pm 113.0	0.917
TNF- α	0.45 \pm 0.02	100.3 \pm 22.39	0.815

Comparison of the multiplex array CBA to the solid phase OptEIA method (ELISA) by linear regression analysis according to Deming (slope, intercept) and correlation coefficient according to Pearson (r), the data were normally distributed (Shapiro-Wilk test); SD, standard deviation. Measurement range: 5–10,000 ng/L, $n = 556$ measured study samples.

according to Shapiro-Wilk and both methods showed good correlation coefficients according to Pearson (Table 2). The measurement range was 5–10,000 ng/L. Correlation between the two methods was high; differing slopes and intercepts were mainly due to different antibody reactivity of both methods.

In addition, our study revealed that the cumulative sample volume for measurements of all respective cytokines required for the multiplex array method was reduced to 25% (55 μ L vs. 221 μ L) compared to the total sample volumes needed in the solid phase test system.

Multiplexed cytokine measurement therefore offers several advantages over the conventional ELISA format when applied in large-scale longitudinal studies: analytical performance of the multiplexed system CBA described in this work was demonstrated to show high reproducibility, sensitivity and good applicability for small volume samples.

Acknowledgments

We thank Anja Spiess-Naumann and Lydia Lerch for excellent technical assistance and Dr. Stefanie Brand for preparation of study samples. The study was supported by the PASTURE/EFRAIM-Grant QLK4-CT-2001-00250/KBBE-2007-2-2-06, all authors take part in the PASTURE/EFRAIM project. The study was also funded by grant TR22/A18 from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) to H. Renz and P.I. Pfefferle and by von-Behring-Röntgen-Stiftung (BRS) grant 56-0035 to P.I. Pfefferle, G. Köllisch, and M. Bomert.

Conflict of interest statement

Authors' conflict of interest disclosure: The authors stated that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article. Research support played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

Research funding: None declared.

Employment or leadership: None declared.

Honorarium: None declared.

References

1. Morgan E, Varro R, Sepulveda H, Ember JA, Apgar J, Wilson J, et al. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clin Immunol* 2004; 110:252–66.
2. Ellington AA, Kullo IJ, Bailey KR, Klee GG. Antibody-based protein multiplex platforms: technical and operational challenges. *Clin Chem* 2010;56:186–93.
3. Von Mutius E, Schmid S. The PASTURE project: EU support for the improvement of knowledge about risk factors and preventive factors for atopy in Europe. *Allergy* 2006;61:407–13.
4. Pfefferle PI, Buchele G, Blumer N, Roponen M, Ege MJ, Krauss-Etschmann S, et al. Cord blood cytokines are modulated by maternal farming activities and consumption of farm dairy products during pregnancy: the PASTURE Study. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:108–15.