

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und molekulare Diagnostik

Direktor: Prof. Dr. H. Renz

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
und des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg

DISSERTATION

CpG-Motive im Mausmodell für allergisches Asthma

Einfluß immunstimulatorischer DNA-Sequenzen auf die Entwicklung der allergischen Sensibilisierung und bronchialen Hyperreagibilität

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Julius H. Liller

aus Lempäälä / Finnland

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 20.10. 2005

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: PD Dr. Udo Herz

Korreferent: Prof. Dr. C. Vogelmeier

4	Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay (ELISA)	31
4.1	<i>Gewinnung der Serumproben</i>	31
4.2	<i>ELISA zur Messung der Immunglobulinkonzentrationen im Serum</i>	32
5	Broncho-Alveoläre Lavage (BAL)	34
5.1	<i>Präparation und Probengewinnung</i>	35
5.2	<i>Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl in der BAL</i>	36
5.3	<i>Differenzierung der Leukozytensubpopulationen</i>	36
6	Histologie	37
6.1	<i>Präparation der Lungen, Anfertigung histologischer Präparate und deren Auswertung</i>	37
7	Zytokinmessungen in Überständen der Lymphozytenkultur	39
7.1	<i>Isolierung und Aufbereitung von Milzzellen für die Kurzzeitstimulation</i>	39
7.1.1	Zellzählung in der Neubauerkammer	40
7.1.2	Kurzzeitstimulation der Milzkultur	40
7.2	<i>Cytometric Bead Array (CBA)</i>	41
8	Messung intrazellulär akkumulierter Zytokine	42
8.1	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)</i>	43
9	Erfassung der Atemwegsreaktivität (AHR)	44
9.1	<i>Messung der Lungenfunktion mittels Head-Out Body-Plethysmographie an der spontan atmenden Maus</i>	44
9.1.1	Aufbau der Meßapparatur	45
9.1.2	Datenerfassung und –Verarbeitung	46
10	Statistik	47
ERGEBNISSE		48
1	Einflüsse der ISS-Prophylaxe auf die Entwicklung des allergischen Phänotyps	48
1.1	<i>Unter ISS-Immunprophylaxe kommt es zu einer Verschiebung des Th2-Immunglobulinprofils</i>	48
1.1.1	Die ISS-Prophylaxe hat immunmodulatorische Effekte im Sinne einer Th1-Gewichtung	48
1.2	<i>Die ISS haben keinen Effekt auf die Etablierung der Entzündung</i>	50
1.2.1	Leukozyten und deren Differenzierung aus der BAL.....	50

1.3	<i>Die Histologie zeigt ein geringeres Infiltrat nach ISS-Immunprophylaxe</i>	53
1.3.1	Semiquantitative Auswertung der Zellpopulationen im Lungenpräparat	53
1.4	<i>Die ISS-Prophylaxe verhindert die Entstehung bronchialer Hyperreagibilität in der C57Bl/6 Maus</i>	57
1.4.1	Nachweis bronchialer Hyperreagibilität in der OVA-Gruppe im Vergleich zur unsensibilisierten Negativ-Kontrolle	57
1.4.2	Die ISS-behandelte Gruppe entwickelt trotz Sensibilisierung keine AHR	57
1.4.3	Die Behandlung mit Kontroll-ISS vermag die Entwicklung einer AHR in der sensibilisierten C57Bl/6 Maus nicht zu verhindern	58
2	Wirkung der ISS und der spezifischen Immuntherapie auf eine etablierte Atemwegsentzündung	59
2.1	<i>Die Immunglobulintiter werden unter ISS- und Immuntherapie unterschiedlich beeinflusst</i>	59
2.1.1	Die ISS-Immunmodulation zeigt spezifische Unterschiede zur konventionellen Immuntherapie	59
2.2	<i>Die Immunmodulation beeinflusst die Zytokinproduktion der mononukleären Zellen</i>	62
2.2.1	ISS-Immunbehandlung und konventionelle Immuntherapie haben ergänzende Effekte im Sinne einer Th1-Gewichtung	62
2.3	<i>Die AHR normalisiert sich in allen Behandlungsgruppen</i>	63
3	ISS-Therapie versus konventionelle Immuntherapie im Mausmodell für allergisches Asthma	64
3.1	<i>Die Immunglobulintiter entwickeln sich in den Untergruppen ähnlich</i>	65
3.2	<i>Die Atemwegsentzündung wird nicht beeinflusst</i>	67
3.3	<i>Messung der Zytokine im therapeutischen Ansatz</i>	67
3.3.1	Nach Restimulation kaum Effekte auf die Zytokine im Überstand	68
3.3.2	Messung intrazellulär akkumulierter Zytokine	68
3.4	<i>ISS- und konventionelle Immuntherapie haben beide einen positiven Einfluß auf die Entwicklung einer AHR</i>	69
4	Zusammenfassung der Ergebnisse	71
4.1	<i>Die ISS-Prophylaxe</i>	71

4.2	<i>Einfluß der Therapieform auf die etablierte Atemwegsentzündung</i>	71
4.3	<i>Die ISS-Therapie in der klinischen Situation</i>	72
DISKUSSION		74
1	Von der „Hygiene-Hypothese“ zur Allergie-Impfung – CpG-Motive in der Allergieprävention	74
2	Primäre Prävention – ein erfolgreicher Ansatz hat seine Grenzen	76
3	Allergie-Prophylaxe mit CpG – Ein Ansatz zur sekundären Prävention ...	77
4	Die Wirkung der ISS bei bestehender Atemwegsentzündung	82
5	Die Wirkung der ISS in der klinischen Situation	84
ZUSAMMENFASSUNG		87
LITERATUR (NACH NUMMERN)		88
LITERATUR (ALPHABETISCH)		104
ANHANG		118
1	Abbildungsverzeichnis	118
2	Tabellenverzeichnis	119
3	Abkürzungsverzeichnis	119
4	Curriculum vitae	121
5	Verzeichnis der akademischen Lehrer	122
6	Danksagung	123
7	Erklärung	124

EINLEITUNG

1 Allergische Erkrankungen

Die Aufgabe des Immunsystems ist es, den Organismus vor potentiellen Gefahren durch körperfremde Stoffe, wie z.B. Bakterien, Viren, Pilzen und Umweltgiften zu schützen. Die Gesamtheit der Moleküle, die zu einer zellulären oder humoralen Abwehrreaktion führen, bezeichnet man als Antigene. Da sich körpereigene Strukturen im Aufbau prinzipiell nicht von Antigenen unterscheiden, unterliegt das Immunsystem einer komplexen Regulation, die die Differenzierung von „fremd“ und „selbst“, sowie die adäquate Reaktion auf ein Antigen steuert.

Allergische Erkrankungen stellen eine Störung dieser Regulationsmechanismen dar und sind durch eine Immunreaktion auf üblicherweise harmlose Umweltantigene charakterisiert. Die Allergen-Exposition ruft eine akute Entzündungsreaktion hervor, welche für die oft heftige Symptomatik allergischer Erkrankungen verantwortlich zu machen ist. Die häufigste allergische Überempfindlichkeitsreaktion ist die Sofortreaktion vom Typ 1 nach Coombs und Gell (1963), wie sie z.B. bei der allergischen Rhinokonjunktivitis und dem allergischen Asthma bronchiale vorliegt. Die genetische Prädisposition, eine Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ 1 zu entwickeln, wird als Atopie bezeichnet. Weitere Erkrankungen, die dem atopischen Formenkreis angehören, sind die atopische Dermatitis und Nahrungsmittelallergien.

Die hohe Prävalenz und steigende Inzidenz sowie die oft resultierende erhebliche Einschränkung der Lebensqualität der Betroffenen haben insbesondere das allergische Asthma zu einer „Volkskrankheit“ und damit zu einem volksgesundheitlich und gesundheitsökonomisch hochrelevanten Krankheitsbild werden lassen (Smith 1997)¹,(AAAAI 2001)².

1.1 Epidemiologie

Epidemiologische Studien konnten für die vergangenen zwei bis drei Jahrzehnte einen Anstieg der Inzidenz und Prävalenz allergischer Erkrankungen in den industrialisierten Ländern belegen (ISAAC 1998)³,(NAEPP 1999)⁴. Heute leiden 20 – 30% der Bevölkerung dieser Länder an einer oder mehreren Manifestationen. Häufig liegt der Zeitpunkt der Erstmanifestation einer Allergie bereits in der Kindheit und ist gefolgt von einer regelrechten „Allergikerkarriere“ mit „Organ- und Etagenwechsel“. In Deutschland liegt die Prävalenz für allergisches Asthma bei Kindern derzeit bei etwa 10% (Duhme 1998)⁵,(Maziak 2003)⁶, und ist damit die häufigste chronische Erkrankung in dieser Altersgruppe.

1.2 Genese und protektive Faktoren

Den Allergien liegt eine multifaktorielle Genese zugrunde. Neben der genetischen Prädisposition spielen weitere externe Faktoren in der Genese der immunologischen Dysregulation eine Rolle.

1.2.1 Genetik

Epidemiologische Zwillings- und Familienstudien belegen eine genetische Determinante allergischer Erkrankungen (Skadhauge 1999)⁷,(Kulig 1998)⁸. Kinder von Allergikern haben im Vergleich zu Kindern nicht allergischer Eltern ein erhöhtes Risiko, ebenfalls an Allergien zu erkranken. Genetische Untersuchungen haben gezeigt, daß eine Vielzahl von Genen Faktoren kodieren, die pathogenetisch an der allergischen Immunantwort beteiligt sind. Aufgrund deren komplexer Interaktion im Krankheitsgeschehen konnte eine direkte Kausalität zwischen den einzelnen Gen-Loci und dem sich manifestierenden Phänotyp nicht gezeigt werden.

Großes Interesse richtet sich beispielsweise auf Chromosom 5q, das u.a. die Gene für die Zytokine IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 und die Gene des IL-4- bzw. β 2-Rezeptors beherbergt. Diese Genprodukte sind durch die Rolle in der allergischen Immunantwort,

inklusive der IgE -Regulation und bei der Eosinophilen- und Mastzell- Differenzierung, von zentraler Bedeutung (Marsh 1994)⁹,(Mayers 1994)¹⁰,(Doull 1996)¹¹. Weitere Kandidaten-Gene befinden sich auf Chromosom 6 (HLA), Chromosom 12q (IFN- γ , Mast-Zell-Wachstums-Faktor etc.), Chromosom 14q (T-Zell-Antigen-Rezeptor, NF κ B-1) und zahlreichen anderen Chromosomen (Daniels 1996)¹²,(Moffatt 2001)¹³,(Young 1994)¹⁴,(Howard 2002)¹⁵.

Wenn auch eine genetische Prädisposition einen bedeutenden Risikofaktor für die Entwicklung allergischer Erkrankungen darstellt (Marsh 1982)¹⁶,(Duffy 1990)¹⁷,(Van Herwerden 1995)¹⁸, so ist sie doch in Anbetracht der rapiden Zunahme insbesondere in den westlichen Industrienationen als isolierte Erklärung nicht ausreichend. Eine Veränderung der Immunantwort auf genomischer Ebene innerhalb von Jahrzehnten ist mehr als unwahrscheinlich. Dies führt zwangsläufig zu der Frage nach Erklärungen für den konstanten Anstieg der Prävalenz allergischer Erkrankungen in den letzten Dekaden.

1.2.2 Exogene Faktoren

In den letzten Jahren verdichten sich die Hinweise, daß für die Induktion und Manifestation allergischer Erkrankungen sowohl Umweltfaktoren als auch veränderten Lebensbedingungen wichtigere Rollen zukommen, als bisher angenommen (D'Amato 2000)¹⁹,(Bråbäck 1995)²⁰.

Eine besondere Situation zur Untersuchung von Umwelteinflüssen auf die unterschiedliche Prävalenz allergischer Erkrankungen bot die Zeit unmittelbar nach der Wiedervereinigung Deutschlands im Jahr 1989: zwei genetisch weitgehend identische Bevölkerungsgruppen waren in vergleichbarer Geographie über Jahrzehnte einem unterschiedlichen sozioökonomischen und ökologischen Umfeld ausgesetzt (von Mutius 1992)²¹.

Durch epidemiologische Studien dieser Art konnten zahlreiche Faktoren ausgemacht werden, die mit der Entwicklung von Allergie im Zusammenhang stehen.

Ernährungsgewohnheiten (von Mutius 1998)²²,(Black 1997)²³,(Fogarty 2000)²⁴, Allergenexposition (Wahn 1997)²⁵ sowie Faktoren des sozialen Umfeldes wie Anzahl der Geschwister (Strachan 1997)²⁶,(von Mutius 1994)²⁷, Reihenfolge der Geburten, die soziale Klasse der Eltern (Heinrich 1998)²⁸, Besuch von Kinderkrippen (Krämer 1999)²⁹,(Ball 2000)³⁰, Wohnungsbeschaffenheit (Wickmann 1994)³¹, Haustierhaltung

etc. scheinen mit allergischen Erkrankungen zu korrelieren und Hinweise auf deren Entstehung zu geben.

Eine herausragende Stellung nimmt in diesem Zusammenhang die Rolle bakterieller Infektionen ein. Bereits 1989 wies Strachan auf einen inversen Zusammenhang zwischen Heuschnupfen und der Anzahl der Geschwister in größeren Familien hin (Strachan 1989)³² und formulierte daraus die sog. „Hygiene-Hypothese“ (Strachan 2000)³³, (Rook 1998)³⁴. Die zentrale Annahme der Hypothese ist, daß der durch Hygiene bedingte Rückgang der kindlichen Infektionen und die Verminderung der Exposition mit bakteriellen Antigenen die natürlicherweise inhibitorische Rolle dieser Faktoren auf die Entwicklung einer allergenspezifischen Reaktion ebenfalls reduziert.

1.2.3 Protektive Faktoren - Die Rolle mikrobieller Stimuli

Aufbauend auf der „Hygiene-Hypothese“ stützten die Ergebnisse weiterer Arbeitsgruppen die Annahme, daß die Exposition gegenüber potentiell pathogenen Keimen möglicherweise einen Schutz vor Allergien bedeuten könnte.

Vor diesem Hintergrund erscheint es bemerkenswert, daß zwischen der Häufigkeit und Schwere viraler und v.a. bakterieller Infektionen einerseits und der Manifestation allergischer Erkrankungen einschließlich des allergischen Asthma bronchiale andererseits eine inverse Korrelation zu bestehen scheint (von Mutius 1994)³⁵, (Martinez 1994)³⁶, (Shaheen 1996)³⁷.

Shirakawa beschrieb 1997 in Japan einen solchen inversen Zusammenhang zwischen Infektionen mit Mycobakterium tuberculosis bei Kindern und der Häufigkeit atopischer Erkrankungen. Bei Kindern mit schwacher oder fehlender Tuberkulinreaktion bildete sich darüber hinaus ein bereits bestehendes Asthma bronchiale langsamer zurück, als bei Kindern mit stark positiver Reaktion auf die Tuberkulintestung (Shirakawa 1997)³⁸. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, daß eine Impfung mit BCG die allergische Sensibilisierung und die Entstehung von Atemwegshyperreagibilität zu unterdrücken in der Lage war (Herz 1998)³⁹.

Schon 1978 beobachtete Anderson bei Kindern im Hochland Papua Neu-Guineas einen umgekehrten Zusammenhang zwischen der Häufigkeit von Atemwegsentzündungen und der Prävalenz von Asthma. In den Küstenregionen des Landes war Asthma bei Kindern häufiger, wohingegen die Rate der Atemwegsentzündungen deutlich geringer

war (Anderson 1978)⁴⁰. Auch die signifikant geringere Prävalenz allergischer Erkrankungen bei Kindern aus der ehemaligen DDR nach der Wende 1989 war im Vergleich zu gleichaltrigen Kindern in den alten Bundesländern korreliert mit einer deutlich höheren Zahl infektbedingter Bronchitiden (von Mutius 1994)⁴¹.

Viele Arbeitsgruppen beschäftigen sich z.Z. mit der Frage, welcher Art die Interaktion der Mikroben mit dem Immunsystem sein muß, um einen protektiven Effekt im Hinblick auf die Entstehung allergischer Erkrankungen zu haben. In diesem Zusammenhang kommt der Darmflora als quantitativ größte Quelle mikrobieller Stimulation und damit zentraler Pathogenitätsfaktor im Hinblick auf die Entstehung von Allergie eine entscheidende Bedeutung zu. Björkstén und Sepp konnten zeigen, daß in Estland - einem Land mit einer niedrigen Allergieprävalenz - der Darm von 80 % der Kinder im Alter von 2 Jahren mit der *Lactobacillus* Spezies kolonisiert ist. Bei gleichaltrigen Kindern aus Schweden - einem Land mit hoher Allergieprävalenz - liegt eine Kolonisierung nur in 30% der Fälle vor (Björkstén 1999)⁴², (Sepp 2000)⁴³. In diesem Zusammenhang scheinen die ersten Lebensmonate, in denen die Keimbeseidlung der Darmflora geschieht, für das Risiko einer späteren allergischen Erkrankung entscheidend zu sein (Björkstén 2001)⁴⁴.

Die möglicherweise entscheidende Rolle der Exposition mit bakteriellen Antigenen für das Risiko einer Allergieentstehung konnte von Riedler und Braun-Fahrlander in Querschnittsstudien zur Allergieprävalenz bei Schulkindern aufgezeigt werden. Es wurden zwei Gruppen von Kindern verglichen, die in einem ruralen, bzw. in einem nicht-bäuerlichen Milieu aufgewachsen waren. Diejenigen Kinder, die in einem bäuerlichen Umfeld (Stall, Tiere, unpasteurisierte Milch) aufgewachsen waren, wiesen ein bis zu 50% niedrigeres Risiko auf an einer Allergie zu erkranken, als die Kinder aus nicht-bäuerlichem Milieu. Braun-Fahrlander fand Hinweise darauf, daß die protektiven Effekte stärkerer Exposition der „Bauernkinder“ mit bakteriellen Antigenen auf LPS-Aerosolinhalation und Trinken unpasteurisierter Kuhmilch - insbesondere im ersten Lebensjahr - zurückzuführen sein könnten (Riedler 2000)⁴⁵, (Riedler 2001)⁴⁶, (Braun-Fahrlander 2002)⁴⁷.

Die oben genannten Studien ließen also deutlich werden, daß gewisse Strukturen von Bakterien oder Viren offensichtlich in der Lage sein mußten, das Immunsystem derart

zu modulieren, daß allergische Reaktionen weniger stark ausfallen bzw. erst gar nicht entstehen.

Dabei ist besonders hervorzuheben, daß die mikrobiellen Stimuli, genauer die Moleküle, die für die beobachteten Effekte verantwortlich sind, strukturell nicht mit den späteren potentiellen Allergenen verwandt sein müssen. Eine „Allergen-Impfung“ im klassischen Sinne scheint hier also nicht vorzuliegen. Vielmehr könnte der Kontakt mit bakteriellen Antigenen eine Modulation des Immunsystems in Gang setzen, die sekundär in einer Toleranz gegenüber den späteren Allergenen mündet. Auch ein Mechanismus der aktiven Suppression könnte für die Effekte verantwortlich sein.

Da nun aber die bakterielle Infektabwehr vorherrschend Aufgabe der sogenannten angeborenen Immunität ist („innate-immunity“), die Immunopathologie der allergischen Erkrankungen sich aber vorwiegend im Zweig der erworbenen Immunität abspielt („adaptive-immunity“), muß für den Effekt bakterieller Faktoren auf die Entwicklung allergischer Erkrankungen eine Interaktionen der Zweige angenommen werden, wie sie in anderem Zusammenhang auch schon in der Literatur beschrieben ist (Fearon 1996)⁴⁸.

Auf der Suche nach den immunologisch entscheidenden Molekülen für die Mechanismen der Protektion wurden unterschiedlichste Vorschläge zur Diskussion gestellt. Den relevanten Molekülen mußte die Eigenschaft gemein sein, dem Immunsystem direkt oder indirekt das Aktivierungssignal der „innate-immunity“ zu vermitteln, im nächsten Schritt dennoch die unerwünschte Reaktion der „adaptive-immunity“ gegenüber dem Antigen zu supprimieren bzw. eine Toleranz zu induzieren.

Yamamoto war es, der bereits 1988 fraktionierte DNA aus *Mycobacterium bovis* für die Aktivierung von NK-Zellen verantwortlich machen konnte (Yamamoto 1988)⁴⁹. Sechs Jahre später konnte dieselbe Arbeitsgruppe diese Effekte, sowie die Interferonproduktion von menschlichen Lymphozyten einer gewissen palindromischen DNA-Sequenz mit einem zentralen, unmethylierten Cytosin-Guanin-Dinukleotid (CpG) zuschreiben und diese isolieren (Yamamoto 1994)⁵⁰.

Jenes DNA-Sequenzmuster wird vom angeborenen Immunsystem eukaryotischer Organismen als Signal für „Gefahr“ erkannt und löst eine Reihe von immunologischen Reaktionen aus, die eine Modulation der erworbenen Immunität bewirken. Für die Erkennung der bakteriellen CpG durch das Immunsystems von Vertebraten scheint die Tatsache entscheidend, daß die prokaryotischen CpG-Motive in unmethylierter Form

vorliegen, die der höheren Organismen jedoch in methylierter Form. Zudem sind CpG bei Wirbeltieren viel seltener.

Die Wirkungen dieser prokaryotischen DNA-Fragmente auf die „innate-immunity“ und die „adaptive-immunity“, sind in den folgenden Jahren auch im Zusammenhang mit Allergien Gegenstand intensiver Forschung geworden und setzen zum Verständnis eine genauere Betrachtung der Pathomechanismen allergischer Erkrankungen voraus.

2 Pathomechanismen allergischer Erkrankungen

2.1 Immunologische Grundlagen

Ein entscheidender Schritt hin zum Verständnis der Pathomechanismen allergischer Erkrankungen war die Identifizierung zweier unterschiedlicher CD4⁺ T-Helferzell-Subpopulationen (Th1 bzw. Th2) (Mosmann 1986)⁵¹, die sich durch die von ihnen sezernierten Zytokinprofile unterscheiden. Die Leitzytokine der Th1 Zellen sind IFN- γ , IL-2 und TNF- α . Th2 Zellen werden durch die Interleukine 4, 5, 6, 9, 10 und 13 charakterisiert (Paul 1994)⁵². Die später beschriebene T-Zell-Effektorpopulation Th3 ist wiederum definiert durch die Produktion von TGF- β , IL-4 und IL-10. Eine Reihe von Zytokinen, kann von allen Subpopulationen produziert werden. Hierzu zählen z.B. IL-3 und GM-CSF.

Diese zunächst im Mausmodell etablierten Effektorsubpopulationen stellen sicherlich zu gewissem Grad künstliche Extremformen der T-Helferzellen dar, die unter physiologischen Bedingungen nur selten vorkommen werden. Die Polarisation der Effektorzellen ist vielmehr ein dynamischer Prozeß, der im Organismus einer ständigen Kontrolle unterliegt, sich aber konzeptionell als durchaus anwendbar auf in vivo Bedingungen –auch beim Menschen– herausgestellt hat.

2.1.1 Das Th1/Th2-Konzept

Ausgehend von einer gemeinsamen Vorläuferzelle (T_{H0}) entwickeln sich die T-Helferzellsubtypen in Abhängigkeit von bestimmten exogenen Bedingungen. Nach Stimulation der Zelle über den T-Zellrezeptor (TCR) entsteht zunächst die sogenannte T_{H0} Zelle, die sowohl Th1- als auch Th2-Zytokine zu produzieren in der Lage ist

(Firestein 1989)⁵³. Eine hohe Effizienz der Antigenbindung an die T_{H0} Zelle durch relativ hohe Antigendosen und eine hohe Affinität des Antigens zum TCR führt in Verbindung mit einem IL-12, IL-18 und IFN- γ Milieu zur Ausdifferenzierung der Th1 Zelle (Hsieh 1993)⁵⁴. Das IL-12 wird dazu von Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Lymphozyten produziert. Mastzellen, eosinophile Granulozyten und T-Zellen selbst produzieren IL-4, welches im Kontext mit niedrigen Antigendosen und niedriger Affinität am TCR zur Ausbildung der Th2-Subpopulation führt (Schmitt 1990)⁵⁵, (Le Gros 1990)⁵⁶.

Die verschiedenen T-Zell Effektorpopulationen beeinflussen sich in vielfältiger Weise selbst (autokrin) und gegenseitig (parakrin). So ist IFN- γ als klassisches Th1-Zytokin ein potenter Inhibitor der Th2 Zellen (Maggi 1992)⁵⁷ und fördert gleichzeitig die Differenzierung der T_{H0} Zelle zur Th1 Zelle (Bradley 1996)⁵⁸. Andererseits reduziert IL-4 die Ansprechbarkeit von T-Zellen auf IL-12, indem es die Expression der Betakette des IL-12 Rezeptors der T-Zellen vermindert und so die Th1-Schiene hemmt (Gollob 1997)⁵⁹, (Szabo 1997)⁶⁰. Auch das von Th2 Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten produzierte IL-10 supprimiert die Th1-Immunantwort (Gong 1996)⁶¹.

Die T-Helferzell-Effektorsubpopulationen interagieren also über ein komplexes Regulationsnetzwerk von Zytokinen, dessen Verständnis für die Immunpathogenese allergischer Erkrankungen von entscheidender Bedeutung ist (**Abb.1**).

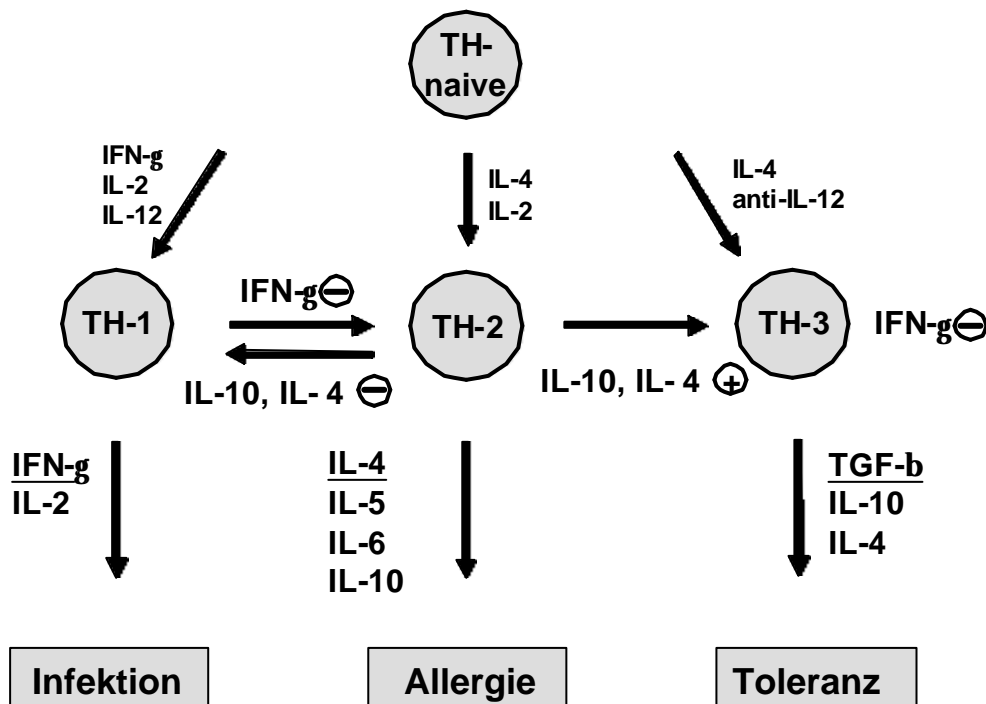


Abbildung 1: Konzept der T-Helfer Effektorsubpopulationen

Heute kann man über die reine Definition der T-Helferzelltypen über das von ihnen sezernierte Zytokinmuster hinausgehen und vielmehr unterschiedliche Immunreaktionen anhand der charakteristischen Effektorfunktionen beschreiben.

Von einer Th1-Immunantwort spricht man bei der Abwehr einer Vielzahl mikrobieller Antigene. Diese schließt die Zerstörung von Tumorzellen, Transplantatabstoßung und die Abwehr fungaler und viraler Antigene ein. Th1 Zellen wirken, indem sie u.a. die IgM- und IgG-Antikörperproduktion regulieren sowie an der Entwicklung von Granulomen und bei zytotoxischen T-Zell-Antworten beteiligt sind.

Die Th2-Immunantwort ist charakterisiert durch die von IgE und eosinophilen Granulozyten bzw. Mastzellen vermittelten Effekte, wie sie bei der Abwehr von Parasiten und bei der Allergie die herausragende Rolle spielen. Dieser Entzündungstyp geht mit der IL-5-abhängigen Rekrutierung und Aktivierung eosinophiler Granulozyten (Bousquet 1990)⁶² sowie dem IL-4- und IL-13-abhängigen Immunglobulinisotypenwechsel von IgM zu IgE und IgG4 beim Menschen bzw. IgG1 bei der Maus einher (Del Prete 1988)⁶³, (Paul 1991)⁶⁴, (Punnonen 1994)⁶⁵, (Levy 1997)⁶⁶, (Yanagihara 1997)⁶⁷, (Van der Pouw-Kraan 1998)⁶⁸.

Die Th3 Zellen spielen mit ihrem charakteristischen Zytokin TGF- β eine Rolle in der mucosal vermittelten Etablierung von Toleranz gegenüber harmlosen Antigenen und der Aufrechterhaltung derselben.

Bei der allergischen Immunantwort sind die Th2 Zellen von entscheidender Bedeutung. Über IL-4 regeln sie die IgE Produktion, welches das wichtigste Effektormolekül der allergischen Soforttypreaktion ist, und durch das von ihnen sezernierte IL-5 steuern sie über die Differenzierung, Aktivierung und Rekrutierung eosinophiler Granulozyten wesentlich die allergische Entzündungsreaktion. Diese ist gekennzeichnet durch den Einstrom von aktivierten T-Zellen, Eosinophilen und Mastzellen sowie lokaler IgE Produktion.

2.1.2 Antigenpräsentation in der Sensibilisierungsphase – Die Rolle der DZ

Man kann die allergische Immunantwort in zwei Phasen unterteilen: die Sensibilisierungs- und die Effektorphase, die auch Entzündungsphase genannt wird.

Am Anfang der „Karriere“ eines Allergikers mit Asthma steht die Sensibilisierungsphase. Diese beginnt mit der mukosalen Aufnahme von Antigenen in antigenpräsentierende Zellen (APZ). Solche APZ sind z.B. Dendritische Zellen (DZ)

der Atemwegsmukosa oder Alveolarmakrophagen, die nun in die regionalen Lymphknoten einwandern, die Antigene intrazellulär prozessieren und Fragmente davon als immunogene Epitope in Verbindung mit den Haupthistokompatibilitätsmolekülen der Klasse II an ihrer Oberfläche präsentieren (Racioppi 1993)⁶⁹. Dieser MHC-II-Peptid-Komplex wird nun von naiven CD4⁺ T-Helferzellen über den antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor erkannt (Davis 1998)⁷⁰. Zusammen mit weiteren kostimulatorischen Signalen durch die Interaktion von Molekülen der CD28 Familie mit ihren Liganden, den B7 Rezeptoren (CD80, CD86) auf den APZ, werden die T-Zellen aktiviert und zur Differenzierung zu Th2 Zellen und zur klonalen Proliferation angeregt (Gajewski 1991)⁷¹,(Palmer 1997)⁷²,(Romagnani 1994)⁷³. Diese T-Zellen sowie aktivierte Makrophagen, peritoneale Lymphozyten und Thymozyten sind in der Lage IL-4 und IL-10 zu produzieren, was in B-Zellen die Expression des MHC-Klasse-II-Rezeptors und die Proliferationsfähigkeit steigert (Alderson 1987)⁷⁴,(Go 1990)⁷⁵,(Paul 1991)⁷⁶.

Wesentlich für die Polarisierung der naiven T-Zelle zur Th1- oder Th2 Zelle ist das initiale Mikromilieu. Dendritische Zellen können ähnlich den T-Zellen in Subklassen unterteilt werden (Kalinski 1999)⁷⁷,(Rissoan 1999)⁷⁸. Antigenaktivierte DZ vom Typ 1 (DZ-1) sezernieren die Zytokine INF- α und IL-12 und dirigieren die Differenzierung somit in Richtung Th1 (Seder 1993)⁷⁹. Die Entwicklung einer Th2-dominierten Immunantwort ist abhängig von der Antigenpräsentation durch APZ vom DZ-2 Phänotyp, welche IL-10, IL-18 und PGE₂ sezernieren. Diese Dichotomie der DZ ist abhängig von unterschiedlichen Faktoren: der Antigen dosis, dem Typ des Antigens, dem Ort der Exposition sowie der Rezeptordichte auf den APZ und T-Zellen. Eine systemische Exposition mit hohen Antigen dosen favorisiert eher eine Th1-Immunantwort. Diese Tatsache könnte die Wirksamkeit der breit und erfolgreich eingesetzten spezifischen Immuntherapie, also der Hyposensibilisierungstherapie erklären, bei der das spezifische Allergen meist über Jahre in ansteigenden Konzentrationen subkutan verabreicht wird. Dabei besteht die begründete Hoffnung, daß der Organismus nach einiger Zeit auf das Allergen nicht mehr im Sinne einer Allergie reagiert, sondern sich tolerant gegenüber dem Antigen verhält.

Niedrige Allergendosen und die enzymatische Aktivität einiger Allergene hingegen induzieren bevorzugt eine Th2-Immunantwort (Secrist 1993)⁸⁰,(Shakib 1998)⁸¹. Eine mukosale Allergenexposition mit niedrigen Dosen kann zur Toleranz (Th3-Phänotyp) oder zu einem Th2-Immunantwort führen.

2.1.3 IgE-Sensibilisierung und Entzündungsphase

Durch die oben genannte Interaktion von T-Zellen und Makrophagen, sowie durch Antigenerkennung über membranständige Immunglobuline der Klasse M werden die B-Zellen angeregt, sich zu Plasmazellen auszudifferenzieren, die jetzt Allergenspezifisches IgE synthetisieren (Bacherier 1998)⁸². Das sezernierte IgE bindet nun an hochaffine FcεI-Rezeptoren auf Mastzellen und basophilen Granulozyten sowie an niedrigaffine FcεII-Rezeptoren (CD23) auf aktivierten Lymphozyten, Monozyten und eosinophilen Granulozyten. Dadurch werden auch diese Zellen allergenspezifisch sensibilisiert.

In der zweiten Phase der allergischen Immunantwort, der Effektor- oder Entzündungsphase, wird nun der Organismus erneut dem Allergen ausgesetzt. Das Allergen kann jetzt spezifisch an die rezeptorgebundenen IgE andocken und diese kreuzvernetzen, was eine Signaltransduktionskaskade in Gang setzt, die schließlich zur Degranulation und somit zu Freisetzung präformierter Soforttyp-Mediatoren aus Vesikeln der Zellen führt. Diese Botenstoffe wie Histamin, Serotonin, Bradikinin sowie Leukotriene und Prostaglandine sind für die Vermittlung der klassischen Soforttypreaktion und der typischen Entzündungszeichen verantwortlich (Siraganian 1998)⁸³. Vasoaktivität führt zur Permeabilisierung der Blutgefäße mit konsekutivem Ödem, Kontraktion der glatten Muskulatur der Atemwege führt zur Atemwegsobstruktion und chemotaktische Eigenschaften der ausgeschütteten Stoffe führen zur Rekrutierung weiterer Entzündungszellen (Lane 1996)⁸⁴. Darunter sind die eosinophilen Granulozyten und T-Lymphozyten als Induktoren der 4 bis 6 Stunden später einsetzenden Spätreaktion zu nennen. Diese späte Phase der Soforttyp-Reaktion ist durch die rechtzeitige Verabreichung von Kortikosteroiden unterdrückbar, was insbesondere beim Asthma bronchiale von großer klinischer Relevanz ist (Barnes 1998)⁸⁵. Die Frühphase läßt sich hingegen durch Kortikosteroide nicht direkt beeinflussen.

2.2 Die Pathophysiologie des Asthma bronchiale

Man definiert das Asthma bronchiale als chronisch-entzündliche Lungenerkrankung mit anfallsweise auftretender, spontan oder nach Therapie reversibler Atemwegsobstruktion, gepaart mit einer Dyskrinie, sowie der erhöhten Bereitschaft der

kleinen und mittleren Atemwege auf unspezifische Reize mit einer Konstriktion der glatten Atemwegsmuskulatur zu reagieren (Atemwegshyperreagibilität, AHR). Die Obstruktion kann mittels der Lungenfunktionsprüfung anhand der forcierten expiratorischen 1-Sekunden-Kapazität quantifiziert werden (Tiffeneau-Test). Im Mausmodell kommt der sogenannte EF₅₀ Wert zur Anwendung (siehe Material und Methoden). Die AHR stellt einen zentralen pathophysiologischen Aspekt des allergischen Asthma bronchiale dar.

80% der Asthmapatienten reagieren auf Inhalations- und/oder Nahrungsmittelallergene mit einem positiven Hauttest vom Soforttyp, sind also allergenspezifisch sensibilisiert mit entsprechend erhöhten Werten für IgE. Man spricht vom allergischen Asthma (Burrows 1998)⁸⁶. Die Erstmanifestation liegt bei diesem Typ meist vor dem 10. Lebensjahr. Bleibt der Hauttest negativ, spricht man vom nicht-allergischen Asthma bronchiale. Diese Patienten reagieren auf Allergene nicht mit einer verstärkten IgE-Produktion (Walker 1992)⁸⁷. Beiden Formen ist jedoch der Einstrom und die Aktivierung CD4 positiver T-Zellen -bevorzugt vom Th2-Typ- assoziiert mit lokaler Eosinophilie gemeinsam. Die IgE-vermittelte Soforttypreaktion scheint also für die Immunpathogenese des Asthma bronchiale förderlich, aber nicht notwendig zu sein.

Die Entzündung ist somit neben der AHR ein weiteres entscheidendes Kriterium beim Verständnis der Pathophysiologie des Asthma bronchiale. Eosinophile Granulozyten sind die zentralen Zellen der allergischen Atemwegsentzündung. Sie tragen maßgeblich zur Zerstörung des Atemwegsepithels bei, wirken kontraktile auf glatte Muskelzellen und erhöhen die Gefäßpermeabilität. Damit sind sie mitverantwortlich für die Atemwegsobstruktion durch das Schleimhautödem und die Engstellung des Atemwegslumens (Sanderson 1992)⁸⁸, (Rothenberg 1998)⁸⁹.

Eine zentrale Rolle spielen auch die T-Zellen, die in vielfältiger Weise dysregulativ in Entzündungsgeschehen und Zell-Zell-Interaktionen eingreifen und so schließlich auf lange Sicht irreversible Umbauprozesse wie Verdickung der Basalmembran, Hypertrophie der glatten Muskulatur und die Entstehung eines Emphysems fördern. Die Lungenfibrose wird dabei durch aktivierte Mastzellen hervorgerufen, die wiederum Fibroblasten zur Kollagensynthese anregen. Das Zusammenwirken verschiedener Zelltypen beim Asthma zeigt vereinfacht **Abbildung 2**.

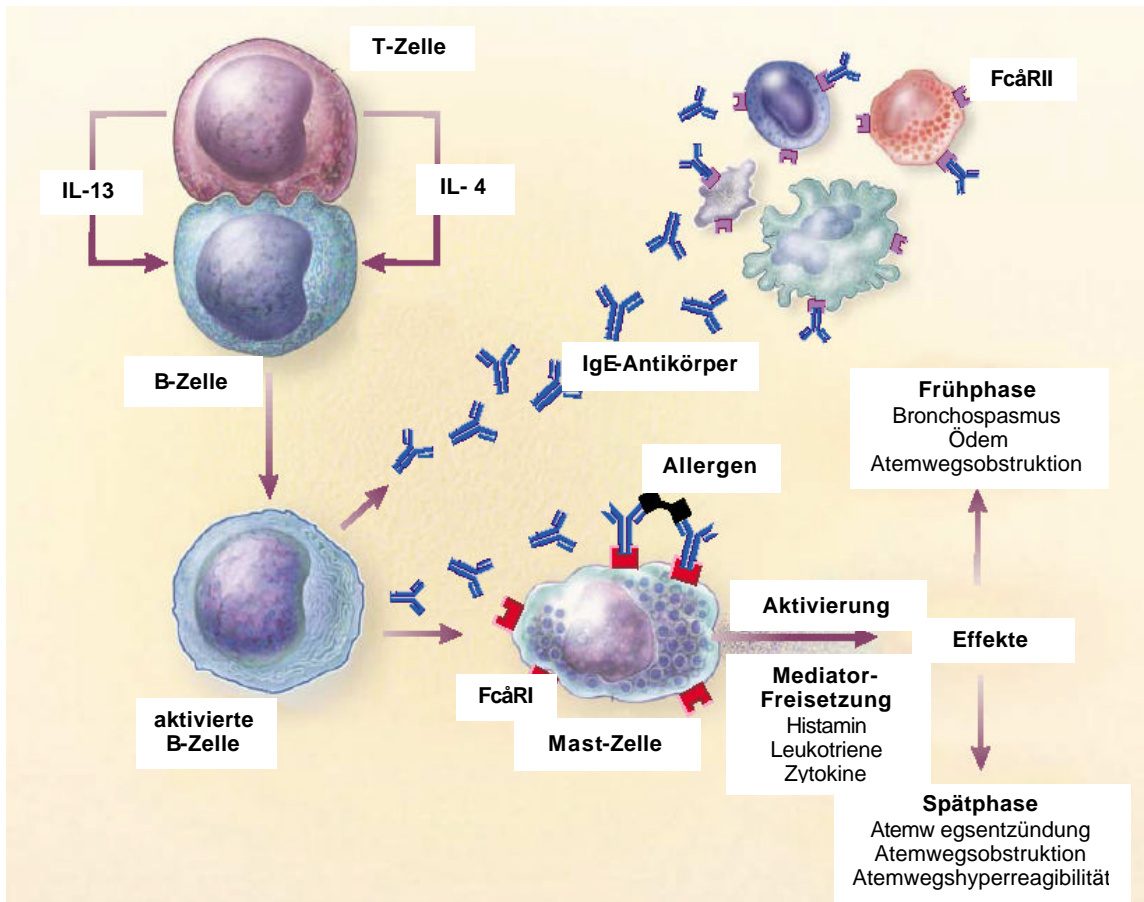


Abbildung 2: Interaktion der pathophysiologisch wichtigsten Zellen beim allergischen Asthma (Modifiziert nach Busse, W.W. und Lemanske R.F.; 2001. *Asthma*. N. Engl. J. Med.; 5: 350-362)

3 Immunintervention bei allergischen Erkrankungen

Unser Verständnis von der Pathophysiologie und Immunopathologie allergischer Erkrankungen hat sich in der letzten Dekade radikal verändert. Insbesondere die Vorstellung der Dysbalance zwischen der „gesunden“ Th1-Immunantwort und der „pathologischen“ Th2-Immunantwort hat zu innovativen Ansätzen für eine mögliche Prophylaxe und/oder Therapie allergischer Erkrankungen wie dem Asthma bronchiale geführt.

Der noch im klinischen Alltag am weitesten verbreitete Ansatz in der Therapie des Asthma ist die Kombination auf längere Sicht wirksamer Kortikoide zur Kontrolle der entzündlichen Komponente mit schnell wirksamen β_2 -Sympathomimetika zur Bronchodilatation (Murphy 1997)⁹⁰. Glukokortikoide sind derzeit die potentesten Medikamente zur symptomatischen Kontrolle des Asthma und zur Verbesserung der Lungenfunktion (Barnes 1996)⁹¹. Unerwünschte Wirkungen, die z.B. bei Langzeittherapie und bei hohen Dosen auftreten können, machen jedoch den Einsatz adjuvanter Medikationen notwendig, um die Dosis der Glukokortikoide senken zu können (Lemanske 1997)⁹²,(Allen 1996)⁹³. Darunter findet man langwirksame β_2 -Agonisten, Theophyllin, sowie Leukotrienantagonisten.

Neuere Ansätze versuchen, direkt in das immunologische Geschehen einzugreifen. Eine Möglichkeit scheint dabei der Einsatz rekombinanter monoklonaler Anti-IgE Antikörper zu sein, die IgE komplexieren und so die Bindung an Mastzellen und Basophile verhindern könnten. Nach ersten klinischen Erprobungen scheint dieser Weg recht vielversprechend (Boulet 1997)⁹⁴,(Fahy 1997)⁹⁵.

Die bisher einzige kausale Therapiemöglichkeit bei allergischem Asthma ist die klassische spezifische Immuntherapie, auch bekannt als Hyposensibilisierungstherapie, die aber nicht in allen Fällen Linderung schafft (Abramson 1995)⁹⁶,(Adkinson 1997)⁹⁷,(Creticos 1996)⁹⁸. Neuere Versuche gehen ebenfalls von einem kausalen Angriffspunkt aus und sollen im Sinne einer „redirection“ dem Th1/Th2-Ungleichgewicht entgegenwirken und so das Gleichgewicht zugunsten der Th1-Immunantwort beeinflussen. Hierunter finden sich experimentelle Ansätze für den Einsatz von BCG (Erb 1998)⁹⁹,(Herz 1998)¹⁰⁰,(Michele 1999)¹⁰¹, LPS (Tulic 2000)¹⁰², INF- α (Iwamoto 1993)¹⁰³,(Lack 1996)¹⁰⁴, IL-12 (Kips 1996)¹⁰⁵ und CpG (Broide

1999)¹⁰⁶,(Krieg 2001)¹⁰⁷,(Kline 2002)¹⁰⁸,(Kline 2000)¹⁰⁹,(Sur 1998)¹¹⁰, wobei sich die vorliegende Arbeit näher mit den CpG beschäftigt.

Für CpG konnten wie für LPS spezifische „pattern recognition receptors“ gefunden werden, welche deren spezifischen Wirkungen auf die „innate-immunity“ vermitteln. Diese Rezeptoren gehören zur Gruppe der Toll-like Rezeptoren (TLR). Sie sind in Anlehnung an die Toll-Rezeptoren der Drosophila benannt, welche eine zentrale Rolle in der „innate-immunity“ dieser Fruchtfliegen und wahrscheinlich aller mehrzelligen Organismen spielen (Medzhitov 1997)¹¹¹.

LPS vermitteln ihre Effekte über den membranständigen TLR-4 (Hoshino 1999)¹¹²,(Beutler 2000)¹¹³, wohingegen TLR-9 für die Signaltransduktion durch CpG-Moleküle entscheidend ist (Hemmi 2000)¹¹⁴. Im Gegensatz zu TLR-4 scheint TLR-9 im intrazellulären Kompartiment angesiedelt, wo der Rezeptor erst nach Endozytose der Bakterien und dem Abläufen lysosomaler Reifungsprozesse die Signaltransduktionskaskade in Gang setzt, welche letztlich in der Synthese proinflammatorischer Zytokine vom Th1-Profil mündet (Häcker 1999)¹¹⁵, (Parviz 2002)¹¹⁶.

Abbildung 3 zeigt eine Übersicht der bekannten Toll-like Rezeptoren und deren potentielle Liganden.

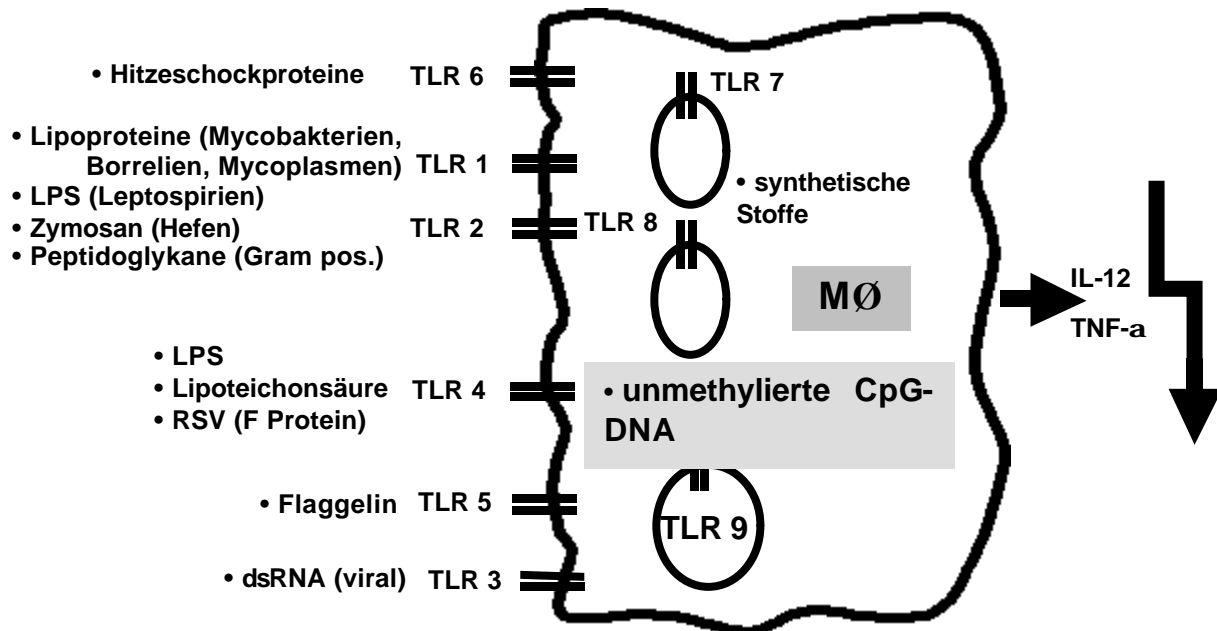


Abbildung 3: Toll-like Rezeptoren und ihre möglichen Liganden am Beispiel eines Makrophagen

Dem Erklärungsmodell für die antiallergische Wirkung von CpG liegt die Annahme zugrunde, daß ein erster mikrobieller Stimulus –hier in Form der bakteriellen DNA– das angeborene Immunsystem derart beeinflusst, daß eine Reaktion auf einen zweiten Stimulus –in Form des Allergens– ausbleibt, also Toleranz erzeugt wird, oder diese Reaktion zumindest im Sinne einer „gesunden“ Th1-Reaktion ausfällt (**Abb.4**).

Gelänge mittels physikalisch-chemischer Kopplung von spezifischem Allergen und CpG-DNA eine gezielte Immunmodulation im Sinne einer Anergie gegenüber diesem Allergen, so wäre dies eine Revolution in der Therapie allergieassoziierter Erkrankungen.

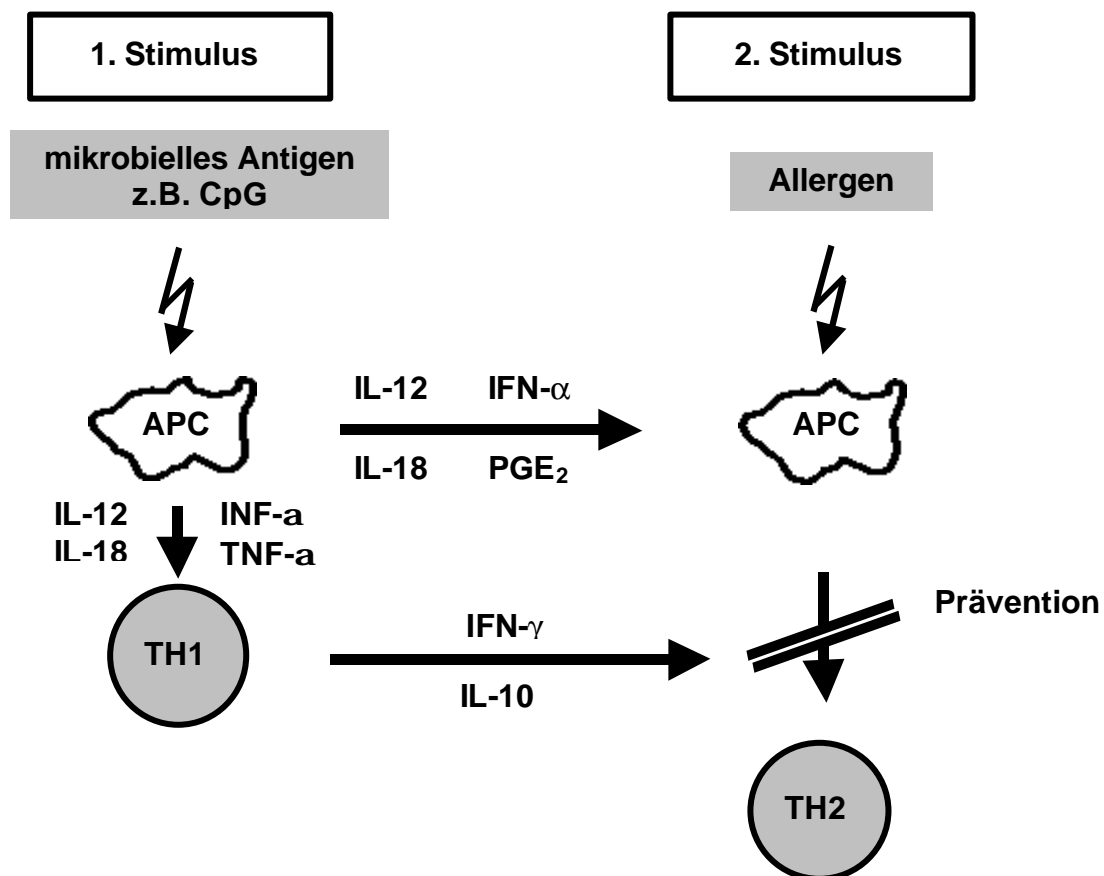


Abbildung 4: Konzept der Wirkung mikrobieller Stimuli auf die Entwicklung des allergischen Phänotyps

4 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

In dieser Arbeit wurde die Hypothese untersucht, ob bakterielle Stimuli in Form von immunstimulierenden DNA-Sequenzen (ISS) in der Lage sind, die Th2-Immunantwort in einem Mausmodell für allergisches Asthma in Richtung einer protektiven Th1-Immunantwort zu dirigieren. Folgende Schritte wurden etabliert, um diese Hypothese zu untersuchen.

1. In einem Mausmodell für allergisches Asthma bronchiale sollte im ersten Schritt überprüft werden, ob durch immunstimulatorische DNA-Sequenzen (ISS) prophylaktisch der allergisch-asthmatische Phänotyp positiv beeinflusst werden kann. (Prophylaktischer Ansatz)
2. Im zweiten Schritt wurde die Anwendbarkeit dieses Modells auf eine bereits bestehende allergische Atemwegsentzündung überprüft und um die klassische Immuntherapie ergänzt. (ISS und spezifische Immuntherapie bei etablierter Atemwegsentzündung)
3. Schließlich wurden in einem Protokoll, das der klinischen Situation eines Asthmatikers am nächsten liegt, die klassische Immuntherapie und die neue ISS-Therapie auf ihre Potenz hin verglichen, einen etablierten allergischen Phänotyp unter wiederholter Allergenexposition kausal zu behandeln. (Therapeutischer Ansatz)

MATERIAL UND METHODEN

1 Versuchstiere

6 bis 8 Wochen alte weibliche C57Bl/6 Mäuse wurden von Harlan Winkelmann (Borchen, D) bezogen. Je 4 Tiere wurden unter keimarmen Bedingungen in einzeln belüfteten Käfigsystemen bei konstanter Raumtemperatur von 20°C gehalten. Die Tiere erhielten ovalalbuminfreies Wasser und Futter ad libitum. Im Tierraum wurde ein künstlicher Hell-Dunkel Rhythmus von je 12 Stunden erzeugt.

2 Sensibilisierung, Immunmodulation und Allergenprovokation

2.1 Sensibilisierung gegen Ovalbumin (OVA)

Prinzip

Um den Einfluß immunstimulatorischer DNA-Sequenzen auf den immunologischen Phänotyp der C57Bl/6-Maus zu untersuchen, wurde mit einem bereits in unserer Arbeitsgruppe etablierten murinen Allergiemodell gearbeitet (Herz 1998)¹¹⁷, (Herz 1996)¹¹⁸, (Herz 1996)¹¹⁹. Zunächst wurden die Tiere gegen das Antigen Ovalbumin (OVA) sensibilisiert. Die systemische Applikation dieses Proteins führt in den Mäusen zur Ausbildung eines immunologischen Th2-Phänotyps, wie er bei Allergien vorkommt. Der Erfolg der Immunisierung wurde anhand der OVA-spezifischen Immunglobuline im Serum nachgewiesen.

Material

- | | |
|--|----------------------------------|
| 1. C57Bl/6-Mäuse, weiblich, 6-8 Wochen alt, 18-22g | Harlan Winkelmann, Borchen, D |
| 2. Sensibilisierungslösung 50µl/Applikation
(10µg OVA+150µg Al[OH] ₃ in PBS) | AllergoPharma, Reinbek, D |
| 3. 1ml-Spritzen (BD Plastipak) | Beckton Dickinson, Heidelberg, D |
| 4. Kanülen (Microlance3 24G 0,55x25) | Beckton Dickinson, Heidelberg, D |

Durchführung

Zur Sensibilisierung erhielten die Tiere zu jedem Protokollzeitpunkt (Tage 1,7,14) eine intraperitoneale (i.p.) und damit systemische Injektion mit 50µl der Sensibilisierungslösung. Diese Menge enthielt 10µg Ovalbumin (OVA) und 150µg Aluminiumhydroxid als Adjuvans Al[OH]₃ gelöst in PBS.

Die Tiere der jeweiligen Negativ-Kontrollgruppe (NIL-NIL) blieben unbehandelt.

2.2 Immunmodulation mit immunstimulatorischen DNA-Sequenzen (ISS)

Prinzip

Nach erfolgter Sensibilisierung, also nach Etablierung des allergischen Th2-Phänotyps, wurde je nach Versuchsprotokoll (siehe dort) vor- oder nach einer Atemwegsprovokation (s.u.) die Immunmodulation durchgeführt. Dies geschah im Falle des ersten und zweiten Experimentes mit dem ISS-Adsorbat bzw. der Kontrollsubstanz. Im Falle des zweiten und dritten Experimentes mit ISS-Adsorbat und OVA+Al[OH]₃ als konservativer Ansatz, sowie im Falle des 3. Experimentes mit ISS in wässriger Lösung statt des Kontroll-ISS.

Entscheidend für den Effekt des ISS-Adsorbats auf das Immunsystem ist ein etwa 20 Basenpaare langer DNA-Strang mit einem zentralen, unmethylierten CpG-Motiv, flankiert von zwei Purinbasen am 5'-Ende und zwei Pyrimidinbasen am 3'-Ende (Krieg 1995)¹²⁰. Kurze DNA Stränge dieser Art werden auch als Oligodinukleotide oder ODN bezeichnet. Als Adjuvans enthielt die Lösung Al[OH]₃ an welches die ISS und das Antigen OVA nicht-kovalent adsorbiert waren. (Dieses Adsorbat ist patentrechtlich geschützt und weitere Informationen zur chemischen Natur der Substanz bei AllergoPharma, Reinbek, Deutschland zu erfragen).

Im Kontroll-Adsorbat war das zentrale Motiv auf GpC invertiert, um die Sequenzspezifität der beobachteten Effekte zu erfassen, bzw. zu kontrollieren.

Bei der im dritten Experiment verwendeten Kontrollsubstanz lag die ISS in ungebundener Form in wässriger Lösung zusammen mit Ovalbumin vor.

Material

1. ISS-Adsorbat 50µl/Applikation
(25µg ISS/2,5µg OVA/150µg Al[OH]₃)

AllergoPharma, Reinbek, D

- | | |
|--|----------------------------------|
| 2. ISS-Kontrolladsorbat 50µl/Applikation
(25µg ISS [revers]/2,5µg OVA/150µg Al[OH] ₃) | AllergoPharma, Reinbek, D |
| 3. ISS wäßrige Lösung 50µl/Applikation
(25µg ISS + 2,5µg OVA + 150µg Al[OH] ₃) | AllergoPharma, Reinbek, D |
| 4. 1ml-Spritzen (BD Plastipak) | Beckton Dickinson, Heidelberg, D |
| 5. Kanülen (Microlance3 26 ^{1/2} G 0,45x13) | Beckton Dickinson, Heidelberg, D |

Durchführung

Zu den jeweiligen Zeitpunkten nach Protokoll (s.u.) wurden den Tieren Dosen von je 50µl der entsprechenden Lösung subkutan (s.c.), d.h. in die Nackenhautfalte appliziert.

2.3 Induktion der Atemwegsentzündung durch Inhalation eines OVA-Aerosols

Prinzip

Zur Erzeugung der lokalen allergenspezifischen Entzündungsreaktion in den Atemwegen und Induktion bronchialer Hyperreagibilität in den Atemwegen der Versuchstiere wurden diese in einem luftdicht verschließbaren Acrylglastasten einem 1%igen OVA-Aerosol ausgesetzt (Challenge). Das Allergen wurde gelöst in PBS über einen Nebulisator zugeführt, so daß Tröpfchen der Größe 1-2µm entstanden, welche bis in die kleinen Atemwege vordringen (Clay 1983)¹²¹. Ein kontinuierlicher Luftstrom wurde durch eine Saugpumpe gewährleistet und mit einem Durchflußmeßgerät überwacht.

Material

- | | |
|--|----------------------------|
| 1. OVA-Lösung (Grad V 1%ig in PBS) | Sigma, Steinheim, D |
| 2. PBS-Puffer (Dublecco's Phosphate Buffered Saline) | PAA Laboratories, Linz, AU |
| 3. Kompressor (Pari-Master [®]) | Pari-Werke, Starnberg, D |
| 4. Nebulisator (Pari-Boy [®]) | Pari-Werke, Starnberg, D |
| 5. Plexiglaskasten 22x23x14 cm | Spezialanfertigung |
| 6. Membran-Vakuumpumpe | Vacuubrand, Wertheim, D |
| 7. Flowmeter (Tempered-Tube) | |

Durchführung

Die Tiere einer Versuchsgruppe (n=12) wurden zu den jeweiligen Protokollzeitpunkten (s.u.) für jeweils 20 Minuten dem OVA-Aerosol ausgesetzt.

3 Versuchsprotokolle

Im Folgenden werden die zeitlichen Abläufe der drei Experimente näher dargestellt.

3.1 Der „prophylaktische“ Ansatz

Dieser Versuchsansatz bestand aus 4 Gruppen:

1. unsensibilisierte, „gesunde“ Kontrolltiere, die keinerlei Behandlung erhielten (NIL-NIL)
2. sensibilisierte Tiere, die jedoch nicht behandelt wurden (OVA-NIL)
3. sensibilisierte Tiere, die die ISS-Lösung erhielten (OVA-ISS)
4. sensibilisierte Tiere, die die ISS-Kontrolllösung erhielten (OVA-ISS_{ctrl})

Nach etabliertem Standard-Sensibilisierungsprotokoll (Herz 1996)¹²², (Herz 1996)¹²³ erhielten die Tiere der Gruppen OVA-NIL, OVA-ISS und OVA-ISS_{ctrl} drei intraperitoneale Injektionen jeweils an den Tagen 1, 7, und 14. Nach einer einwöchigen Pause begann die Immunmodulationsphase. Die subkutanen Injektionen wurden an den Tagen 21, 23, 25, 27 und 29 vorgenommen. Nach einem weiteren Intervall von 7 Tagen wurde eine viermalige OVA-Aerosolprovokation an den Tagen 36, 37, 38 und 39 mit den Tieren der sensibilisierten Gruppen durchgeführt. Blutentnahmen zur Serumgewinnung und anschließenden Bestimmung von Immunglobulinen wurden an den Protokolltagen 1, 20 (also nach Sensibilisierung) und 40 (vor Endanalyse) vorgenommen. Nach Ablauf der Versuchszeit wurde an Tag 40 die Lungenfunktion mittels Head-Out Body-Plethysmographie gemessen. Anschließend wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet, sowie Trachea und Lungen zur Durchführung der broncho-alveolären Lavage und Gewinnung der Lungenhistologie präpariert.

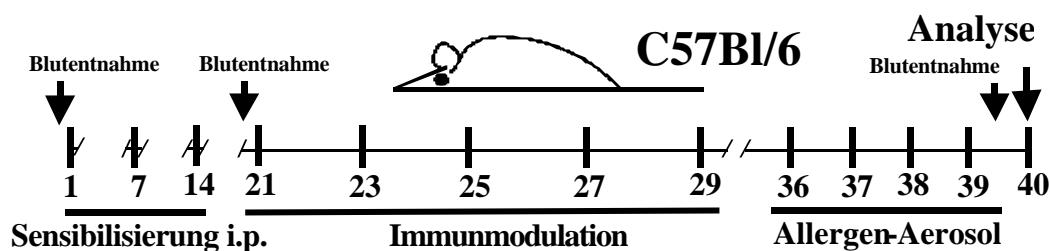


Abbildung 5: Versuchsprotokoll für den „prophylaktischen“ Ansatz

Zeitlicher Ablauf für Sensibilisierung, Immunmodulation und Allergen-Challenge im ersten Experiment.

Tabelle 1: Gruppenübersicht für den „prophylaktischen“ Ansatz

Die Tabelle zeigt als Übersicht, wie mit den jeweiligen Gruppen im Versuchsprotokoll verfahren wurde.

Gruppen-Bezeichnung	Sensibilisierung	Immunmodulation	OVA-Aerosol-Exposition	Anzahl der Tiere n=
NIL-NIL	-	-	-	12
OVA-NIL	OVA + Al(OH) ₃	-	+	12
OVA-ISS	OVA + Al(OH) ₃	ISS-OVA+ Al(OH) ₃	+	12
OVA-ISS _{ctrl}	OVA + Al(OH) ₃	ISS _{ctrl} -OVA+ Al(OH) ₃	+	12

3.2 Die etablierte Atemwegsentzündung und die „klassische“ Immuntherapie

Dieser Versuchsansatz bestand aus 5 Gruppen:

1 bis 4 wie in Experiment 1. Zusätzlich wurde eine fünfte Gruppe (OVA-OVA_{IT}) eingeführt. Diese Gruppe erhielt zur Immunmodulation subkutan eine Lösung aus spezifischem Allergen Ovalbumin und Aluminiumhydroxid in den Konzentrationen 2,5µg OVA und 150µg Al(OH)₃. Zur Sensibilisierung wurde verfahren wie in Experiment 1 (s.o.). Nach einer einwöchigen Pause wurde diesmal jedoch mit der Etablierung einer Atemwegsentzündung durch Allergenexposition begonnen. An den Tagen 21 bis 24 wurden die Tiere täglich 20 Minuten dem OVA-Aerosol ausgesetzt. Es folgte eine siebentägige Ruhephase in deren Anschluß die Immunmodulation begann. Die subkutanen Injektionen wurden an den Tagen 31, 34, 38, 41 und 45 vorgenommen. Es wurde also der Behandlungszeitraum gestreckt, um möglichen Effekten mehr Zeit einzuräumen. Nach einem weiteren Intervall von 14 Tagen wurde die Analyse durchgeführt. Blutentnahmen zur Serumgewinnung und anschließenden Bestimmung

von Immunglobulinen wurden an den Protokolltagen 1, 30 (also nach Sensibilisierung) und 55 (vor Endanalyse) vorgenommen. Nach Ablauf der Versuchszeit wurde an Tag 55 die Lungenfunktion gemessen. Anschließend wurden neben der broncho-alveolären Lavage (BAL) auch noch die Milzpräparation zur Isolierung und Aufbereitung der mononukleären Zellen durchgeführt.

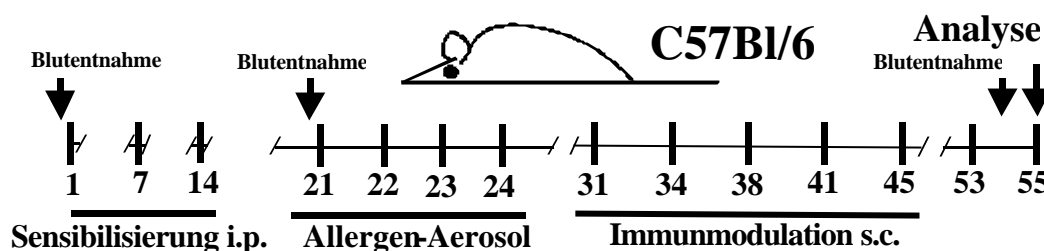


Abbildung 6: Protokoll für die etablierte Atemwegsentzündung und die „klassische“ Immuntherapie

Zeitlicher Ablauf für Sensibilisierung, Immunmodulation und Allergen-Challenge

Tabelle 2: Gruppenübersicht für die etablierte Atemwegsentzündung und die „klassische“ Immuntherapie

Die Tabelle zeigt als Übersicht, wie mit den jeweiligen Gruppen im Versuchsprotokoll verfahren wurde.

Gruppen-Bezeichnung	Sensibilisierung	Immunmodulation	OVA-Aerosol-Exposition	Anzahl der Tiere n=
NIL-NIL	-	-	-	12
OVA-NIL	OVA + Al(OH) ₃	-	+	12
OVA-ISS	OVA + Al(OH) ₃	ISS-OVA+ Al(OH) ₃	+	12
OVA-ISS _{ctrl}	OVA + Al(OH) ₃	ISS _{ctrl} -OVA+ Al(OH) ₃	+	12
OVA-OVA _{IT}	OVA + Al(OH) ₃	OVA+ Al(OH) ₃	+	12

3.3 Der „therapeutische“ Ansatz - ISS versus konventioneller IT

Wie im zweiten Experiment bestand auch hier der Versuchsansatz aus 5 Gruppen. Diese waren in Bezug auf die Immunmodulation bis auf Gruppe 4 identisch mit denen aus Experiment 2. Diese vierte Gruppe (ISS+OVA_{H2O}) erhielt statt der Kontrollsubstanz mit inverser CpG-Sequenz eine wässrige ISS-Lösung. Zur Sensibilisierung wurde verfahren wie in Experiment 1 und 2 (s.o.). Nach einer einwöchigen Pause wurde mit der Etablierung einer Atemwegsentzündung durch Allergenexposition begonnen (s.o.).

Ruhephase und Immunmodulation wurden wie in Experiment 2 durchgeführt. Nach einem weiteren Intervall von 7 Tagen folgte eine erneute Atemwegs-Challenge zur Verstärkung der Atemwegsentzündung. Dieses Protokoll spiegelt damit die klinische Situation eines Asthmatikers mit wiederholter Allergenexposition nach erfolgter Sensibilisierung wider. Die Serumgewinnung erfolgte wie in Experiment 2. Auch hier wurde nach Ablauf der Versuchszeit wieder die Lungenfunktion untersucht, eine BAL durchgeführt, sowie die Milzpräparation zur Isolierung und Aufbereitung peripherer mononukleärer Zellen vorgenommen.

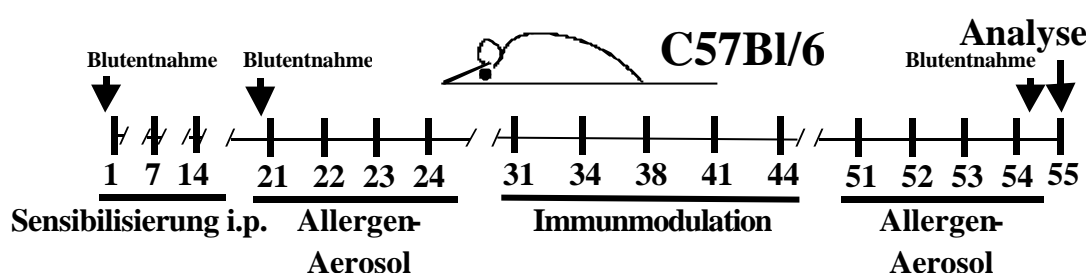


Abbildung 7: Versuchsprotokoll für den „therapeutischen“ Ansatz
Zeitlicher Ablauf für Sensibilisierung, Immunmodulation und Allergen-Challenge

Tabelle 3: Gruppenübersicht für den „therapeutischen“ Ansatz

Die Tabelle zeigt als Übersicht, wie mit den jeweiligen Gruppen im Versuchsprotokoll verfahren wurde.

Gruppen-Bezeichnung	Sensibilisierung	Immunmodulation	OVA-Aerosol-Exposition	Anzahl der Tiere n=
NIL-NIL	-	-	-	8
OVA-NIL	OVA + Al(OH) ₃	-	+	8
OVA-ISS	OVA + Al(OH) ₃	ISS-OVA+ Al(OH) ₃	+	8
ISS+OVA _{H2O}	OVA + Al(OH) ₃	ISS+OVA (wässrig)	+	8
OVA-OVA _{IT}	OVA + Al(OH) ₃	OVA+ Al(OH) ₃	+	8

4 Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay (ELISA)

Das immunologische Profil eines Allergikers wird u.a. charakterisiert durch bestimmte Immunglobuline im Blut. So sind die allergenspezifischen Antikörper IgG1 und IgE typisch bei der durch Sensibilisierung etablierten Th2-Immunantwort der Maus. Das Th1-Profil hingegen ist durch relativ erhöhte Level von allergenspezifischem IgG2a bei geringeren IgG1 Konzentrationen gekennzeichnet. Mittels der im Folgenden beschriebenen ELISA-Technik wurden diese Immunglobuline im Serum der Versuchstiere quantitativ gemessen.

4.1 Gewinnung der Serumproben

Prinzip

Zur Serumgewinnung entnimmt man den Mäusen Blut aus dem Schwanz. Das Anritzen einer oder mehrerer Schwanzvenen würde nicht die erforderlichen Mengen an Material bringen, so daß immer auch die zentrale Schwanzarterie eingeritzt werden muß. Nach Ablauf der Gerinnung wird die Probe zentrifugiert und der Serumüberstand abpipettiert.

Material

- | | |
|--|------------------------------------|
| 1. Wärmeinkubator: Temperaturregler GTR199 | Greisinger, Landsberg, D |
| 2. Skalpell (Disposable Scalpell No. 10) | Feather, J |
| 3. 1,5ml Reaktionsgefäße | Eppendorf, Hamburg, D |
| 4. Alkoholische Lösung (Sterilium®) | Braun, Melsungen, D |
| 5. Zentrifuge (Rotina 48RS) | Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D |
| 6. Pipette | Eppendorf, Hamburg, D |
| 7. 1,3 ml Reaktionsgefäße | Greiner Bio-One, Solingen, D |

Durchführung

Zu den jeweiligen Protokollzeitpunkten (Blutentnahme) der Experimente wurde den Mäusen aller Vergleichsgruppen ca. 0,5 ml Blut aus den Schwanzgefäßen entnommen. Hierzu wurden sie zunächst für 10 Minuten in einem Wärmeinkubator mit 60°C Lufttemperatur gesetzt, um eine maximale Gefäßweitstellung zu erreichen. Anschließend wurden die Tiere entnommen und der Schwanz mit 70%iger

alkoholischer Lösung eingerieben. Nach kurzer Trocknung wurde der Schwanz leicht mit einem Skalpell eingeritzt und das heraustropfende Blut in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bis zur 0,5 ml Marke aufgefangen. Nach kurzem Abdrücken der Wunde kam die Blutung in der Regel schnell zum Stehen.

Nach etwa 3 Stunden, wenn das Blut vollständig geronnen war, wurden die Proben bei 4°C für 20 Minuten bei 2000 g zentrifugiert und die Serumüberstände mit der Pipette in 1,3 ml Reaktionsgefäße abgenommen. Diese wurden bis zur weiteren Analyse bei –80°C eingefroren.

4.2 ELISA zur Messung der Immunglobulinkonzentrationen im Serum

Prinzip

Die Sandwich-ELISA Technik ermöglicht einen spezifischen, quantitativen Nachweis von Immunglobulinen (Ig) aus einer Serumprobe. Hierzu wird eine 96er Mikrotiterplatte mit einem spezifischen, gegen das jeweilige Ig gerichteten Primärantikörper (Ak 1°) beschichtet (coating). Im nächsten Schritt werden ein Standard (St) , der das zu messende Ig in bekannter Konzentration enthält, sowie die Serumproben aufgetragen. Daraufhin bindet ein biotinierter Sekundärantikörper (Ak 2°) seinerseits spezifisch an das vom Ak 1° fixierte Ig. Das jetzt zugegebene Enzym Streptavidinperoxidase bindet an das Biotin des Ak 2° und ist hier in der Lage, das Farbsubstrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in den blauen Farbstoff Cyanin umzusetzen. Eine drastische pH-Wert Senkung durch Hinzugeben von 2 molarer Schwefelsäure stoppt die Reaktion und bewirkt ihrerseits einen Farbumschlag nach gelb. Photometrisch wird die Extinktion gemessen und die Ig Konzentration der Proben aus der Standardkurve mit Abgleich gegen einen mitgeführten Leerwert berechnet. Dabei korrelieren enzymatisch bedingter Farbumschlag und Extinktion mit der Konzentration der Immunglobuline.

Material

- | | |
|--|------------------------------|
| 1. 96-well-Mikrotiterplatten (MaxiSorp™ Surface) | Nunc, DK |
| 2. Mehrkanalpipette (Finnpipette®) | Labsystems, Helsinki, FIN |
| 3. Pipettenspitzen (Fintip®) | Labsystems, Helsinki, FIN |
| 4. Ansaugwanne (10Tip-Tubs) | Eppendorf, Hamburg, D |
| 5. 1,3 ml Reaktionsgefäße | Greiner Bio-One, Solingen, D |

- | | |
|---|----------------------------------|
| 6. Schüttler (IKA-Schüttler MTS4) | IKA-Werke, D |
| 7. Mehrkanalwasher (Nunc-Imuno Wash 12) | Nunc, DK |
| 8. Photometer (Tecan-Photometer Sunrise) | Tecan, Salzburg, AU |
| 9. Photometersoftware (Magellan 2) | Tecan, Salzburg, AU |
| 10. Streptavidinperoxidase (1mg/ml) | Sigma, Steinheim, D |
| 11. Farbsubstrat (BM Blue POD Substrate) | Roche, Mannheim, D |
| 12. Block-Puffer | |
| ➤ PBS (Dublecco's, pH 7) | PAA Laboratories, Linz, AU |
| ➤ BSA (Albumin Bovine 3%ig in PBS) | Sigma, Steinheim, D |
| 13. Waschpuffer/Verdünnungspuffer | |
| ➤ PBS (Instamed PBS Dublecco) | Biochrom, Berlin, D |
| ➤ Polyoyethylene-Sorbitan Monolaurate (Tween ²⁰ , 0,1%ig in PBS) | Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, D |
| 14. Schwefelsäure (2 M) | Merck, Darmstadt, D |
| 15. Natriumhydrogenkarbonat (0,1 M) | |
| 16. Gesamt IgE | |
| ➤ Ak1°: Anti-Maus-IgE (PC284.U) | Binding Site, Heidelberg, D |
| ➤ St: Monoklonales Maus IgE (03121D) | PharMingen, Hamburg, D |
| ➤ Ak2°: Anti-Maus-IgE-Biotin | PharMingen, Hamburg, D |
| 17. OVA-spezifisches IgE | |
| ➤ Ak1°: OVA Grad VI (A-2512) in PBS | Sigma, Steinheim, D |
| ➤ St: Gepooltes Standardserum #49 | Labor-Kontrolle, Marburg, D |
| ➤ Ak2°: Anti-Anti-OVA-Maus-IgE-Biotin (02132D) | PharMingen, Hamburg, D |
| 18. OVA-spezifisches IgG1 | |
| ➤ Ak1°: OVA Grad VI (A-2512) in NaHCO ₃ | Sigma, Steinheim, D |
| ➤ St: Gepooltes Standardserum | Labor-Kontrolle, Marburg, D |
| ➤ Ak2°: Anti-Anti-OVA-Maus-IgG1-Biotin (553441) | Beckton Dickinson, Heidelberg, D |
| 19. OVA-spezifisches IgG2a | |
| ➤ Ak1°: OVA Grad VI (A-2512) in PBS | Sigma, Steinheim, D |
| ➤ St: Gepooltes Standardserum #49 | Labor-Kontrolle, Marburg, D |
| ➤ Ak2°: Anti-Anti-OVA-Maus-IgG2a-Biotin (02012D) | PharMingen, Hamburg, D |

Durchführung

96-well-Mikrotiterplatten wurden mit 50µl/well des jeweiligen Primärantikörpers gecoatet und es wurde bei 4°C über Nacht inkubiert. Durch dreimaliges Spülen mit dem Waschpuffer wurden überschüssige Ak entfernt. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 150µl/well Blockpuffer gesättigt (3 h bei Raumtemperatur auf Schüttler). Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden die Standards (Doppelbestimmungen) und die

verdünnten Proben zu je 50µl/well aufgetragen, und es wurde wieder bei 4°C über Nacht inkubiert. Folgende Konzentrationen wurden bei den Standards eingesetzt:

Gesamt IgE:	1. St 250 ng/ml;	10.St 0,49 ng/ml
á-OVA-IgE:	1. St 1000 LU;	10. St 1,95 LU
á-OVA-IgG1:	1. St 88 ng/ml;	10. St 0,17 ng/ml
á-OVA-IgG2a:	1. St 500 LU;	10. St 0,98 LU

Durch entsprechenden Waschvorgang wurde überschüssiges Material entfernt und anschließend die biotinierten Sekundärantikörper aufgetragen (50µl/well, Inkubation 2 h bei RT geschüttelt). Auch jetzt wurden die überschüssigen Ak 2° durch fünfmaliges Waschen entfernt und dann 50µl/well der 1:1000 verdünnten Streptavidinperoxidase aufgetragen (Inkubation 30min bei Raumtemperatur im Dunkel). Im Anschluß wurde 10 Mal gründlich gewaschen und 150µl/well POD-Farbsubstrat aufgetragen. Dann wurde ca. 5 Minuten im Dunkel inkubiert, bis in den Standardreihen eine deutliche, blaue Farbabstufung zu erkennen, und diese vom mitgeführten Leerwert (nur Waschpuffer) zu unterscheiden war. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Reaktion mit 2 molarer Schwefelsäure gestoppt, was einen Farbumschlag von blau nach gelb bewirkte. Die Extinktion wurde im Anschluß photometrisch gemessen (Meßfilter 450 nm, Referenzfilter 530 nm) und die Konzentrationen über die Standardkurve mit dem Photometerprogramm Magellan 2 berechnet.

5 Broncho-Alveoläre Lavage (BAL)

Die Atemwegsentzündung ist ein zentraler Gesichtspunkt in der Pathophysiologie des Asthma bronchiale und bei der allergischen –IgE-positiven– Form durch ein Infiltrat von eosinophilen Granulozyten charakterisiert, welche durch Mediatoren und zelltoxische Substanzen maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Entzündung, an Umbauprozessen und der Entwicklung der Atemwegshyperreagibilität beteiligt sind. Die broncho-alveoläre Lavage ermöglicht die Gewinnung der residenten Zellen aus den Atemwegen.

5.1 Präparation und Probengewinnung

Prinzip

Die BAL dient der Gewinnung von Untersuchungsmaterial aus den Atemwegen der Maus. Mittels Kanülierung der freipräparierten Trachea und anschließender Spülung der Lungen mit eiskaltem PBS kann man zelluläre Bestandteile aber auch Proteine zur Analyse und Beurteilung von Entzündungsreaktion und Immunologischem Status in den Lungen gewinnen.

Material

1. Präparierbesteck
 - Scheren (HSB 012-11) Hamacher, Solingen, D
 - Pinzetten (Inox 7) A.Dumont+Fils, Schweiz
 - Klemmen (13-323-10) Martin, D
2. Ethanol 70% Merck, Darmstadt, D
3. 1ml-Spritzen (BD Plastipak) Beckton Dickinson, Heidelberg, D
6. Kanülen (Microlance3 26^{1/2}G 0,45x13) Beckton Dickinson, Heidelberg, D
7. PBS-Puffer (Dublecco's Phosphate Buffered Saline) PAA Laboratories, Linz, AU
8. 1,5ml Reaktionsgefäße Eppendorf, Hamburg, D

Durchführung

Nach Abschluß der Analysen am lebenden Tier wurden diese durch zervikale Dislokation getötet und ventral mit 70%igem Ethanol spray benetzt. Zur Präparation wurden die Tiere auf einer Präparationsunterlage fixiert und der Thorax mit der Schere eröffnet. Nach Eröffnung des Halses und Entfernung der Thyroidea wurde die Trachea freigelegt, mit einer Klemme unter Spannung gehalten und fixiert. Mit einer 1 ml Spritze wurden nun zwei mal 0,8ml eiskalten PBS durch eine abgeknickte Kanüle über die Trachea in die Lungen eingespült und wieder abgesaugt. Die Spülflüssigkeit wurde zur weiteren Analyse in 1,5 ml Reaktionsgefäßen auf Eis gelagert. Der Volumenertrag der BAL-Proben betrug $1,3 \pm 0,2$ ml.

5.2 Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl in der BAL

Prinzip

Mit Hilfe der Neubauerzählkammer, die über einem auszählbaren Eckquadrat ein Volumen von $1/10 \text{ mm}^3$, also 0,0001 ml aufweist, kann die Zellkonzentration in der BAL-Probe („Zellen/ml BAL“) bestimmt werden.

Material

- | | |
|--------------------------|-----------------------|
| 1. Mikroskop (BH2) | Olympus, Hamburg, D |
| 2. Pipette | Eppendorf, Hamburg, D |
| 3. Zählkammer (Neubauer) | Marienfeld, D |

Durchführung

Es wurden 4 x 16 Felder bei 400-facher Vergrößerung ausgezählt. Die Berechnung der Leukozytenzahl erfolgte nach der Formel:

Anzahl der gezählten Leukozyten/4 x 10 000 = Leukozyten/ml

5.3 Differenzierung der Leukozytensubpopulationen

Prinzip

Mittels Zytozentrifugation gelingt die Aufbereitung der Zellen aus der BAL für die mikroskopische Differenzierung. Dabei werden nur kleinste Mengen der BAL-Probe benötigt, welche auf handelsübliche Objektträger zentrifugiert werden, wobei ein Filterpapier die Überschüssige Flüssigkeit aufnimmt. Diese sogenannten Cytospin-Präparate werden anschließend gefärbt und können später unter dem Lichtmikroskop untersucht werden.

Material

- | | |
|--|-----------------------------|
| 1. Zytozentrifuge (Cytospin 3) | Shandon, Frankfurt a. M., D |
| 2. Probenkammer | Shandon, Frankfurt a. M., D |
| 3. Zytoklip | Shandon, Frankfurt a. M., D |
| 4. Objektträger (76 x 26 mm Mattrand) | Marienfeld, D |
| 5. PBS-Puffer (Dublecco's Phosphate Buffered Saline) | PAA Laboratories, Linz, AU |
| 6. Pipette | Eppendorf, Hamburg, D |

- | | |
|--------------------------------|--------------------------|
| 7. Färbelösungen (Diff-Quick®) | Dade-Behring, Marburg, D |
| 8. Mikroskop (BH2) | Olympus, Hamburg, D |

Durchführung

Je 50µl der BAL-Proben wurden mit 150µl PBS verdünnt und in die Probenkammern gegeben. Diese wurde zusammen mit einem Trennungsfilterspapier und einem Objektträger in einen Zytoklip-Zentrifugeneinsatz geklemmt und in die Zytocentrifuge platziert. Anschließend wurde 5 Minuten bei 320 G zentrifugiert, die Präparate nach vorsichtiger Entfernung des Filterpapiers 30 Minuten an der Luft getrocknet und mit der kommerziellen Diff-Quick®-Lösung gefärbt. Nach einem erneuten Trocknungsvorgang erfolgte die Zelldifferenzierung anhand morphologischer Kriterien mit 400-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop.

6 Histologie

Die Atemwegsentzündung beim allergischen Asthma läßt sich neben der Analyse zellulärer Bestandteile aus der BAL auch anhand morphologischer Kriterien des Atemwegsepithels beurteilen. Hierzu ist die Anfertigung von histologischen Lungenpräparaten nötig.

6.1 Präparation der Lungen, Anfertigung histologischer Präparate und deren Auswertung

Prinzip

Die Färbung histologischer Lungenschnitte mit der Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE) und der Perjodsäure-Schiff-Methode (PAS) erlaubt eine Analyse sowohl nach morphologischen, als auch nach pathophysiologischen Aspekten. Nach klassischen Formkriterien lassen sich die unterschiedlichen Zellpopulationen in den HE-Präparaten differenzieren und mögliche Entzündungsreaktionen im Gewebe semiquantitativ beurteilen. Bei der PAS-Färbung oxidiert die Periodsäure 1,2-Glykole in unsubstituierten Polysacchariden, neutralen Mukopolysacchariden sowie Muko- und Glykoproteinen zu Aldehydgruppen, welche mit dem Schiff-Reagenz eine leuchtend-

rote Farbreaktion ergeben. Durch diese spezifische Anfärbung der aufgeführten Mukusbestandteile wurde der indirekte Nachweis einer erhöhten Mukusproduktion in den zentralen Atemwegen möglich.

Material

1. Formaldehydlösung (4%ig)	Merck, Darmstadt, D
2. 1ml-Spritzen (BD Plastipak)	Beckton Dickinson, Heidelberg, D
3. Kanülen (Microlance3 26 ^{1/2} G 0,45x13)	Beckton Dickinson, Heidelberg, D
4. Präparatebehältnisse (Polyvials 20ml)	Zinsser Analytik, Frankfurt, D
5. Mikrotom (Accu-Cut [®] SRM TM 200 Rotary microtome)	Sakura, NL
6. Färbelösung (Hämatoxylin II nach Gill)	Merck, Darmstadt, D
7. Färbelösung (Hämatoxylin III nach Gill)	Merck, Darmstadt, D
8. Färbelösung (Eosin G)	Merck, Darmstadt, D
9. Färbelösung (PAS-Färbekit)	Merck, Darmstadt, D
10. Mikroskop (BH2)	Olympus, Hamburg, D

Durchführung

Die bereits für die BAL freipräparierten Lungen wurden in situ fixiert, indem in ähnlicher Weise wie bei der BAL die Trachea kanüliert wurde und diesmal 1 ml Formaldehydlösung (3%ig) in die Lungen gespritzt wurde. Mit derselben Lösung befüllte 20 ml Gefäße dienten der Zwischenlagerung. Nach vollständiger Fixation der Organe wurden diese in Paraffin eingebettet und von ihnen mittels Mikrotom 3 µm Dünnschnitte angefertigt, welche im Anschluß mit Hämatoxylin-Eosin, sowie mit der Perjodsäure-Schiff-Methode (PAS) gefärbt wurden. Die Beurteilung der Entzündungsreaktion geschah am Mikroskop anhand der Auszählung eosinophiler Granulozyten in einem repräsentativen Sichtfeld (HPF), in dem ein Bronchus und ein Begleitgefäß gleichzeitig sichtbar sein mußten. Unter Verwendung des 100er Öl-Immersion Objektivs wurden je Gruppe 12 HPF aus mindestens 4 unterschiedlichen Präparaten ausgezählt.

7 Zytokinmessungen in Überständen der Lymphozytenkultur

7.1 Isolierung und Aufbereitung von Milzzellen für die Kurzzeitstimulation

Prinzip

Ein weiteres Charakteristikum einer allergischen Immunantwort ist der Nachweis Th2-spezifischer Zytokine. Um diese meßbar zu machen, isoliert man zunächst die Zellen aus dem Zellverband des größten Immunorgans, der Milz, und bringt diese in Kultur. Anschließend stimuliert man die Zellen zur Zytokinproduktion und mißt die Konzentrationen im Überstand. Die Stimulation wurde einerseits unspezifisch mit mitogener Lösung (P/I), andererseits mit dem spezifischen Allergen OVA durchgeführt.

Material

- | | |
|---|---------------------------------|
| 1. Falcon Zellsieb 100µm | Becton Dickinson, Heidelberg, D |
| 2. Zentrifuge Rotina 48 RS | Hettich, Tuttlingen, D |
| 3. Neubauerkammer | Marienfeld, D |
| 4. Mikroskop BH 2 | Olympus, Hamburg, D |
| 5. Lympholyte [®] Trennmedium | Cedarlane, Hornby, CAN |
| 6. RPMI 1640 Kulturmedium | PAA Laboratories GmbH, Linz, D |
| 7. + Glutamin [2mM] | PAA Laboratories GmbH, Linz, D |
| 8. + Streptomycin [100mg/ml] | Seromed, Berlin, D |
| 9. + Penicillin[100U/ml] | Seromed, Berlin, D |
| 10. + Amphotericin B (Fungizone [®]) [1,25 mg/ml] | Gibco BRL, Eggenstein, D |
| 11. + Fetales Kälberserum [10%] | Seromed, Berlin, D |

Durchführung

Im Anschluß an die durchgeführte BAL (siehe dort) und nach Desinfektion der Bauchhaut mit 70%igem Alkohol wurde der Peritonealraum der Tiere eröffnet, die Milz freipräpariert und entnommen. Die entnommenen Milzen wurden in Kulturmedium auf Eis gelegt. Die Zellen der steril präparierten Milz wurden mit Hilfe eines feinmaschigen Siebes (Porengröße 100µm) aus dem Zellverband gelöst und in 4ml Kulturmedium suspendiert. Diese Suspension wurde über 15ml Lympholyte[®] Trennmedium geschichtet und für 20 min bei 1200 g zentrifugiert (Beschleunigung 1, Bremse 0). Hierbei wurden die Zellen ihrer Dichte nach aufgetrennt und die gewünschten mononukleären Zellen (Lymphozyten und Makrophagen) reicherten sich im

Interphasering zwischen Kulturmedium und Trennmedium an, von wo sie vorsichtig abgenommen wurden. Bei zwei weiteren Zentrifugationsgängen mit PBS wurden die Zellen gewaschen und das Pellet schließlich in 1ml Kulturmedium resuspendiert.

7.1.1 Zellzählung in der Neubauerkammer

Ein Aliquot (10 µl) der gewonnenen Zellsuspension wurde entnommen und in der Neubauerkammer unter dem Lichtmikroskop mit einem 40er Objektiv ausgezählt. Dabei bezog sich die Zellzählung auf die vier großen Eckquadrate der Kammer.

Berechnung:

ausgezählte Zellzahl / Fläche x Kammerhöhe x Verdünnungsfaktor x 10 000 =
Zellen/ml

Pro Eckquadrat ergibt sich aus einer Kammerhöhe von 0,1 mm und einer Seitenlänge von je 1 mm ein Volumen von 0,1 mm³.

7.1.2 Kurzzeitstimulation der Milzkultur

Die Milzzellsuspensionen wurden auf 24 Well-Zellkulturplatten ausgesät und entweder mit 10 ng/ml PMA sowie 1 mg/ml Ionomycin oder mit OVA in vitro zur Zytokinproduktion stimuliert. Als Negativkontrolle erfolgte die Zellkultivierung ohne Zugabe der Stimulantien. Die Zellen wurden für 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert, dann resuspendiert, 5 min mit 800 g bei RT zentrifugiert und der Überstand in 1,3 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Die Proben wurden unmittelbar bei –80°C eingefroren.

Material

- | | |
|--|------------------------------|
| 1. Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) | Sigma Chemie, Taufkirchen, D |
| 2. Ionomycin | Sigma Chemie, Taufkirchen, D |
| 3. OVA-Lösung (Grad V 1%ig in PBS) | Sigma, Steinheim, D |
| 4. 24-well Gewebekulturplatte | Greiner, Frickenhausen, D |
| 5. Brutschrank | Heraeus, Berlin, D |

7.2 Cytometric Bead Array (CBA)

Prinzip

Mittels CBA-Technik wurden die Zellkulturüberstände auf ihren Gehalt an den Zytokinen IL-4, IL-10, INF- α und TNF- α untersucht. Die Grundlage für die Messung dieser verschiedenen Zytokine bilden fünf verschiedene Arten von Latexpartikeln, die bei Anregung mit einem Laser (488nm) unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten zeigen. Jede Partikelunterart ist mit einem Primärantikörper beschichtet, der ein bestimmtes Zytokin spezifisch zu binden in der Lage ist. Standardlösungen mit bekannten Zytokinkonzentrationen und Zytokine aus den Proben können nun an die Antikörper binden. Ein weiterer PE-konjugierter Antikörper kann nun seinerseits binden und neben dem Signal des Latexpartikels nach Laseranregung ein zweites Fluoreszenzsignal aussenden. Zum einen lassen sich so aufgrund der Antikörperspezifität und der Eigenfluoreszenz der Partikel die Zytokine diskriminieren (FL3: 670nm), zum anderen kann anhand der PE-Fluoreszenzintensität der gebundenen Sekundärantikörper auf die Konzentration der verschiedenen Zytokine geschlossen werden. Die Lösungen wurden schließlich im FACScan[®] (s.u.) gemessen und mit Becton Dickinson CBA Software ausgewertet.

Material

- | | |
|---|------------------------------------|
| 1. Mouse T _{H1} /T _{H2} CBA Kit | PharMingen, Beckton Dickinson, USA |
| 2. FACScan [®] | Beckton Dickinson, USA |
| 3. CBA Software | Beckton Dickinson, USA |

Durchführung

Zu 50 μ l der antikörperbeschichteten Latexpartikel wurden je 50 μ l des unverdünnten Zellkulturüberstandes bzw. der Standardlösung hinzu pipettiert. Als Zytokinstandards wurden neun Verdünnungen im Bereich von 20 bis 5000 pg/ml benutzt. Nach Zugabe von 50 μ l des PE-konjugierten Sekundärantikörpers wurde 2 Stunden bei RT und Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde durch Zentrifugation mit Waschpuffer bei 200 g fünf Minuten lang gewaschen. Das Beadpellet wurde dann in 300 μ l Waschpuffer

resuspendiert und unmittelbar vor der eigentlichen FACS-Messung kurz für 3 bis 5 Sekunden durchmischt.

8 Messung intrazellulär akkumulierter Zytokine

Prinzip

Die Aufbereitung der mononukleären Zellen aus der Milz für die Bestimmung intrazellulär akkumulierter Zytokine entspricht der Methode, wie sie für die Kurzzeitstimulation bereits beschrieben wurde (s.o.). Indem der Golgi-Apparat der kultivierten Zellen *in vitro* funktionell blockiert wurde, reichern sich die synthetisierten Zytokine im Plasma der Zellen an, da somit der Mechanismus zur Ausschleusung aus der Zelle unterbrochen war. Durch Permeabilisierung der Zellmembranen wurden die Zytokine spezifischen, fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpern zugänglich gemacht, welche so an die Zytokine binden konnten. Mit Hilfe der analytischen Durchflusszytometrie konnten anschließend die Zytokine qualitativ unterschieden- und quantitativ gemessen werden.

Material

- | | |
|---------------------------|----------------------------|
| 1. CytoStain™ Kit | PharMingen, San Diego, USA |
| 2. GolgiSTOP™ | PharMingen, San Diego, USA |
| 3. Cytotfix/Cytoperm™ Kit | PharMingen, San Diego, USA |
| 4. Perm/Wash™ Buffer | PharMingen, San Diego, USA |

Durchführung

Die Zellen wurden wie unter 7.1 beschrieben mittels Lympholyte® über den Dichtegradienten isoliert und in Medium ausgesät. Die Stimulation der Zellen zur Zytokinproduktion erfolgte wie beschrieben mit P/I bzw. mit OVA jedoch nur für 6h. Für die weiteren Verfahrensschritte und Färbungen der intrazellulär akkumulierten Zytokine wurde nach Anleitung des CytoStain™ Kit verfahren. Anschließend wurden 250µl der Proben aufgenommen und im unten beschriebenen Verfahren gemessen.

8.1 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Prinzip

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, daß auf der Erfassung von Reflexions- und Streulichtphänomenen beruht, die dabei entstehen, daß Licht definierter Wellenlängen auf Fluoreszenzfarbstoffe trifft und diese zur Emission charakteristischer elektromagnetischer Wellen anregt. Dieses Fluoreszenzspektrum kann detektiert werden. Diese Fluoreszenzfarbstoffe – in diesem Fall Fluorecein-isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) – sind an Antikörper gekoppelt, welche an die jeweiligen Antigene spezifisch binden können. Diese Antigene können Oberflächenmoleküle von Immunzellen, aber auch – wie im beschriebenen Experiment – intrazelluläre Proteine, wie Zytokine sein. Durch Registrierung von Intensität und Wellenlänge lassen sich so quantitative Messungen von intrazellulär akkumulierten Zytokinen machen.

Material

1. Monoklonale Antikörper:
 - Anti-Maus CD3, PE-konjugiert PharMingen, Hamburg, D
 - Anti-Maus CD4, FITC-konjugiert PharMingen, Hamburg, D
 - Anti-Maus CD45/B220, PE-konjugiert PharMingen, Hamburg, D

2. Isotypen-Kontrollen:
 - anti-rat IgG2a, FITC-konjugiert PharMingen, Hamburg, D
 - anti-rat IgG2b, PE-konjugiert PharMingen, Hamburg, D

3. FACS™ Lysing Solution Becton Dickinson, Heidelberg, D
4. CellWASH™ Becton Dickinson, Heidelberg, D
5. Fixier-Lösung (CellWASH, 1% Formaldehyd) Becton Dickinson, Heidelberg, D
6. Falcon Rundbodenröhrchen, 5 ml Becton Dickinson, Heidelberg, D
7. FACScan® Becton Dickinson, Heidelberg, D
8. Cell Quest software (Macintosh) Becton Dickinson, Heidelberg, D

9 Erfassung der Atemwegsreaktivität (AHR)

9.1 Messung der Lungenfunktion mittels Head-Out Body-Plethysmographie an der spontan atmenden Maus

Prinzip

Die Etablierung der Head-Out Body-Plethysmographie durch Yves Alarie (Vijayaraghavan 1993)¹²⁴ Anfang der 90er Jahre ermöglichte erstmals die Erfassung der Lungenfunktion an der nicht-anästhesierten, spontan atmenden Maus. Dieses nicht-invasive Verfahren machte die kontinuierliche Messung physiologischer Lungenparameter möglich. Die reproduzierbare Charakterisierung von Atemwegsreaktionen nach Verlauf und Reaktionsstärke geschieht mittels Erfassung der Atemflußkurve und davon abgeleiteten Parametern.

Direkt wurden „Atemfrequenz“ und „Inspirations“- bzw. „Expirationszeit“ gemessen, das Atemzugvolumen abgeleitet. Der „Midexpiratory Flow“ (auch EF₅₀-Wert oder VD) ist ein Maß für die Obstruktion der Atemwege.

In diesem Experiment diente das Meßverfahren zur quantitativen Ermittlung der Atemwegshyperreagibilität.

Material

- | | |
|---|--|
| 1. Expositions-kammer
USA | Crown Glass, Sommerville, N.J.,
USA |
| 2. 4 gläserne Plethysmographen
USA | Crown Glass, Sommerville, N.J.,
USA |
| 3. Dental-Latexmembran (Kofferdam) | Roeko, Langenau, D |
| 4. Gewebepband (duct tape) | |
| 5. 4 Pneumotachographen (PTM 378/1.2)
Hustetten, D | Hugo Sachs Elektr., March-
Hustetten, D |
| 6. Differenzdruckwandler (8 T-2) | Galtec, Dunvegan, GB |
| 7. Potentiometer (S-13) | Galtec, Dunvegan, GB |
| 8. Oszilloskop (KombiGraf 4) | Gould, Dietzenbach, D |
| 9. Digital/Analog-Wandekarte (DAS-16) | Keitley Germering, D |
| 10. Personal Computer (486DX-33) | |
| 11. PBS-Puffer (Dublecco's Phosphate Buffered Saline) | PAA Laboratories, Linz, AU |
| 12. Metacholin (Acetyl-â-metacholin-chlorid) | Sigma, Steinheim, D |

9.1.1 Aufbau der Meßapparatur

Eine gläserne Expositions-kammer mit etwa 2,5 Litern Volumen bildet das Herzstück der Meßapparatur. Seitlich können hier jeweils zwei Plethysmographen, bestehend aus einem Glaskolben von etwa 3 cm Durchmesser und 10 cm Länge, eingesetzt werden, so daß maximal 4 Tiere gleichzeitig gemessen werden können. Ein konischer Schliff gewährleistet die exakte, dichte Einpassung. Die Expositions-kammer verfügt über eine Einlaßöffnung, über die Luft und Aerosole zugeführt werden, sowie über einen Auslaß, an dem eine Saugpumpe angeschlossen wird, um einen gleichmäßigen Luftstrom zu gewährleisten. Eine Latexmembran, die mit einer kreisrunden Perforation von 4-5mm versehen wird und ein Gewebeband mit 6-7mm Perforation bildet, konzentrisch auf die vordere Plethysmographenöffnung angebracht, eine luftdichte Halskrause, die jeweils individuell angefertigt wird. Sitzt die Maus im Plethysmographen, so wird die hintere Öffnung mit einem Gummipfropf luftdicht verschlossen. Die bei der Atmung der Maus auftretenden Thoraxbewegungen führen zu einer Volumenänderung im Plethysmographen, welche sich als Luftströmung im Ableitungsrohr auswirkt. Pneumotachographen und Differenzdruckwandler greifen hier die Atemflußsignale ab. Potentiometer verstärken das ankommende Signal, welches nun auf einem Oszilloskop graphisch dargestellt wird. Über eine Digital-Analog-Wandlerkarte gelangen die Meßsignale schließlich zur weiteren Analyse und Speicherung zu einem PC.

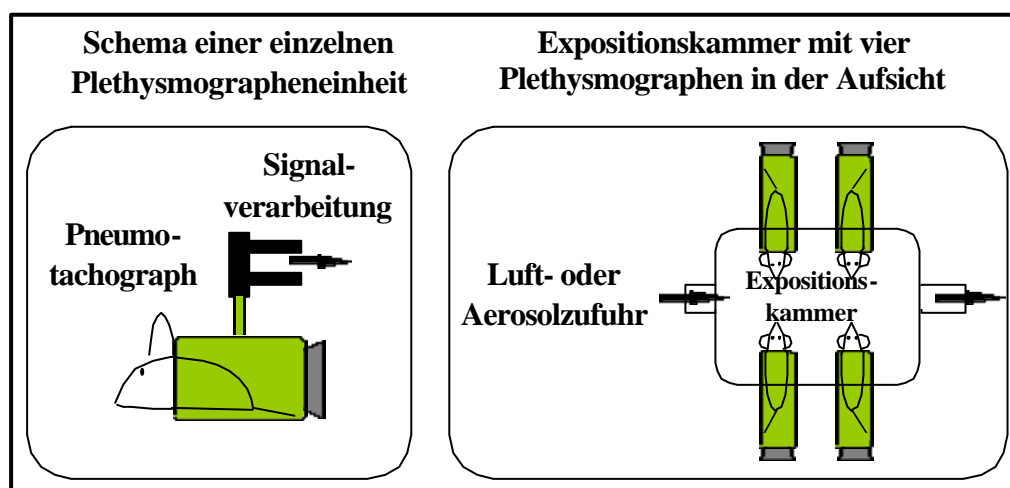


Abbildung 8: Schema der Meßapparatur zur Erfassung der Lungenfunktion

9.1.2 Datenerfassung und –Verarbeitung

Durchführung

Zum Ende eines jeglichen Versuchsprotokolls wurden je vier Tiere aller Vergleichsgruppen in die Meßapparatur plaziert und ihnen wurden 10 bis 15 Minuten Zeit eingeräumt, sich an die Situation anzupassen und ihre Atmung zu beruhigen. Bei einer durchschnittlichen Atemfrequenz von 250 bis 300 Atemzügen pro Minute wurden in dieser knappen viertel Stunde ungefähr 4000 Atemzüge erfaßt. Die registrierten Daten aus Meßintervallen von je 14 Sekunden wurden gemittelt. Die Meßdaten aller 60 Meßintervalle wurden ebenfalls gemittelt und als 100% gesetzt (Baseline). Alle Parameter der nun folgenden eigentlichen Messung wurden als Prozentwerte relativ zur Baselinemessung ausgedrückt.

Bei der anschließenden Messung zur Ermittlung der Atemwegshyperreaktivität wurden die Tiere einem Aerosol des Bronchokonstriktors Metacholin (Derivat des Acetylcholin) in ansteigenden Konzentrationen beginnend mit PBS als Kontrolle ausgesetzt. Die jeweilige Expositionsdauer betrug fünf Meßperioden à 14 Sekunden, also 70 Sekunden mit einer anschließenden Wirkungs- bzw. Erholungsphase von 15 Perioden, also 210 Sekunden. Von 25mg/ml wurde die Konzentration von Metacholin im Aerosol bis 150mg/ml in 25mg/ml-Schritten gesteigert.

Fiel der über 14 Sekunden gemittelte Wert des EF_{50} -Wertes für 5 Meßperioden in Folge unter 50% von der Baseline *oder* waren innerhalb der folgenden 15 Meßperioden nachdem der Wert einmal unter 50% gefallen war mindestens 5 Werte <50% von der Baseline, so schied das jeweilige Tier aus der Messung aus und wurde entfernt. Die Berechnung der Meßgrößen geschah direkt im angeschlossenen PC mittels eines Programmes, das in der Literatur bereits genauer beschrieben wurde (Vijayaraghavan 1994)¹²⁵, (Boylstein 1996)¹²⁶. Die weitere statistische Auswertung der „Rohdaten“ geschah in Microsoft Excel[®] unter Verwendung einer eigens dafür programmierten Berechnungsmatrix. Zur Berechnung des Atemzugvolumens wurde das gemessene Atemflußsignal vom Computer integriert. Ohne Berechnung wurde die Atemfrequenz bestimmt, die als Anzahl der Atemzüge pro Minute definiert ist. Weitere Parameter konnten aus den Gemessenen Daten hergeleitet werden. Die wichtigsten sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 4: Zusammenschau der wichtigsten ableitbaren Parameter bei der Head-Out Body-Plethysmographie

<u>Respirationsparameter</u>	<u>Abk.</u>	<u>Definition</u>	<u>Einheit</u>	<u>Klassifikation</u>
Expiratorischer Mittelfluß	EF ₅₀ (VD)	Atemfluß in der mittleren Expirationsphase (0,5 VTE)	ml/s	<u>Atemwegskonstriktion</u> Basis: Zunahme der Expirationszeit zur Kompensation des erhöhten Atemwegwiderstands
Atemzugvolumen	VT	Das pro Atemzug ein- und ausgeatmete Luftvolumen	ml	Begleitparameter – wurde nicht zur Klassifikation benutzt. Abfallende Werte bei A und P
Inspirationszeit	TI	Zeitstrecke von der Basis zur Spitze der Atemflußkurve	s	Begleitparameter – wurde nicht zur Klassifikation benutzt. Ansteigende Werte bei A
Expirationszeit	TE	Zeitstrecke von der Spitze zur Basis der Atemflußkurve	s	Begleitparameter – wurde nicht zur Klassifikation benutzt. Ansteigende Werte bei S und A
Atemfrequenz	BPM	Anzahl der Atemzüge während einer Meßperiode, umgerechnet in Atemzüge pro Minute	-	Begleitparameter – wurde nicht zur Klassifikation benutzt. Abfallende Werte bei S und A; ebenso bei P, wenn TP sehr groß wurde.

Berechnet wurde diejenige Konzentration an Metacholin im Aerosol, bei der der Median der EF₅₀-Werte aus einem 14 sekündigen Meßintervall unter 50% der Baseline der jeweiligen Maus gefallen war. Die Analyse der Daten geschah mit Microsoft Excel[®].

10 Statistik

Sofern nicht gesondert angegeben, wurden statistische Berechnungen mit GraphPad Prism[®] durchgeführt. Zur Überprüfung von Unterschieden zwischen den Vergleichsgruppen auf statistische Signifikanz kam der Mann-Whitney Test für unverbundene, nicht-normalverteilte Stichproben zur Anwendung. Es wurden Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) berechnet und angegeben. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde vor Beginn des Experimentes als einfaches Signifikanzniveau festgesetzt (* in Abb.). Der Wert $p \leq 0,01$ war zweifach- (** in Abb.), $p \leq 0,001$ dreifach signifikant (***) in Abb.).

ERGEBNISSE

1 Einflüsse der ISS-Prophylaxe auf die Entwicklung des allergischen Phänotyps

In diesem ersten experimentellen Ansatz wurde untersucht, ob durch prophylaktische Applikation von ISS der allergisch-asthmatische Phänotyp positiv beeinflusst werden kann.

1.1 Unter ISS-Immunprophylaxe kommt es zu einer Verschiebung des Th2-Immunglobulinprofils

Zunächst wurde auf Ebene der Immunglobuline untersucht, ob sich durch eine ISS-Prophylaxe die Etablierung einer Th2-Immunantwort nach Sensibilisierung und anschließender Challenge durch den bakteriellen Th1-Stimulus der CpG verhindern läßt. Zu diesem Zweck wurden im Serum der Versuchstiere die Titer für anti-OVA IgG1, anti-OVA IgE, gesamt-IgE und anti-OVA IgG2a mittels ELISA-Technik gemessen (siehe Material und Methoden). Die Serumgewinnung erfolgte jeweils vor und nach der Sensibilisierung, sowie nach Allergen-Rechallenge.

1.1.1 Die ISS-Prophylaxe hat immunmodulatorische Effekte im Sinne einer Th1-Gewichtung

Die OVA-ISS Gruppe zeigte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (OVA-NIL) für *alle* antigenspezifischen Ig's signifikant höhere Titer. Ganz besonders ausgeprägt war dieser Unterschied jedoch bei anti-OVA IgG2a (**Abb.9 D – Skala logarithmisch**).

Bei anti-OVA IgG1 zeigte auch die OVA-ISS_{ctrl} Gruppe einen höheren Titer, als die unbehandelte Kontrollgruppe (OVA-NIL), die ihrerseits einen höheren Titer, als der der gepoolten Gruppen unmittelbar nach der Sensibilisierung aufwies (**Abb.9 A**).

Für anti-OVA IgE zeigte die ISS-Kontrolle keinen Unterschied zur OVA-NIL Gruppe. Gegenüber Tag 20 waren die Titer in der OVA-NIL Gruppe auf das Niveau der unsensibilisierten Tiere (NIL-NIL) abgesunken.

Für Gesamt-IgE zeigte die ISS-Kontrollgruppe (OVA-ISS_{ctrl}) im Vergleich zur OVA-NIL Gruppe ebenfalls einen Anstieg, wobei hier die Titer der OVA-NIL Gruppe sogar unter Niveau von Tag 20 abgesunken waren (**Abb.9 C**).

Für IgG2a fand sich für die ISS-Kontrollgruppe im Vergleich zur OVA-NIL Gruppe kein signifikanter Anstieg. Die Pegel bei OVA-NIL entsprachen wieder denen an Tag 20 (**Abb.9 D – Skala logarithmisch**).

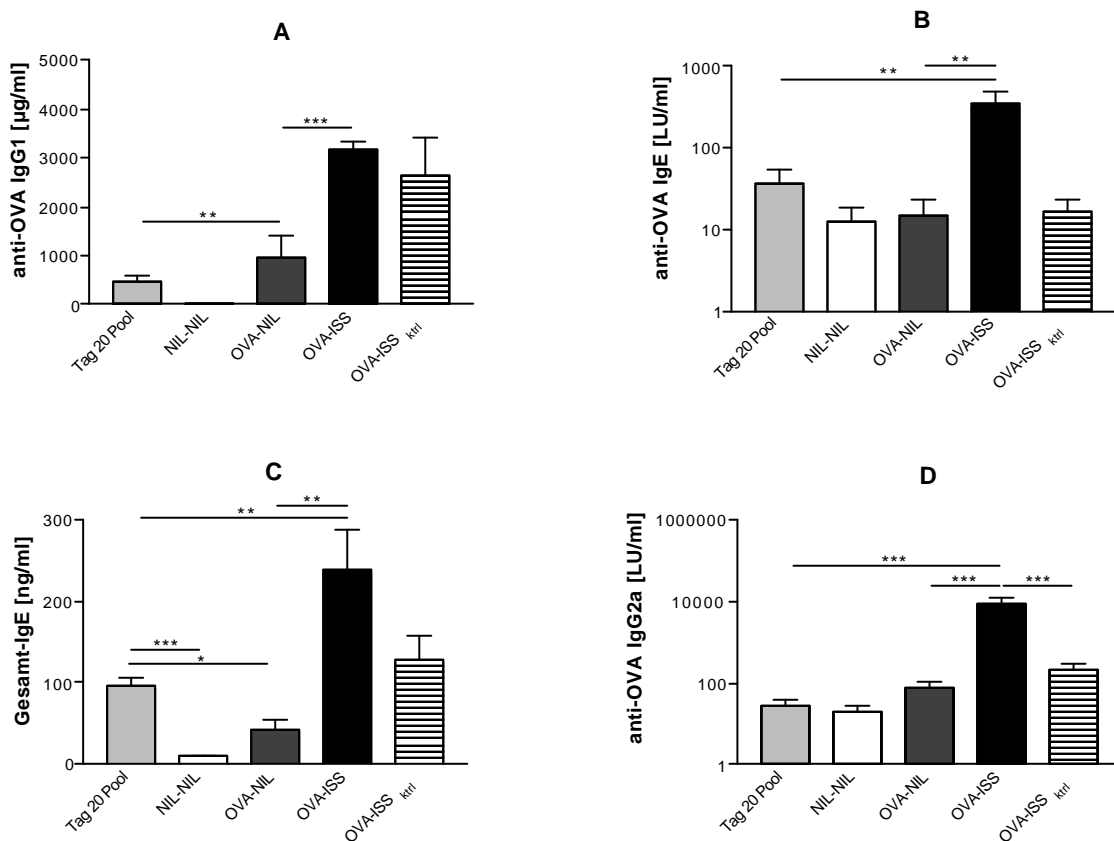


Abbildung 9: Immunglobulintiter nach Sensibilisierung und nach Immunmodulation

Nach erfolgter Sensibilisierung aller Gruppen außer NIL-NIL (n=12) wurde am Tag 20 Serum gewonnen und darin die Immunglobulintiter im ELISA-Verfahren bestimmt (Tag 20 Pool). Nach Ablauf der Immunmodulation in den Behandlungsgruppen wurde an Tag 40 gleich verfahren. Die Diagramme A bis D zeigen Mittelwerte \pm SEM, dabei gilt für die Signifikanzniveaus $p \leq 0,05$ * in Abb., $p \leq 0,01$ ** in Abb. und $p \leq 0,001$ *** in Abb..

Die Ergebnisse der Immunglobulinmessungen belegen, daß die prophylaktische Gabe von ISS vor Allergen-Rechallenge nach erfolgter Sensibilisierung eine potente Immunmodulation im Sinne einer Boosterung der Immunglobulintiter gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe bewirkt. Dieser Effekt war bei anti-OVA IgG2a, dem Markerglobulin der Th1-Immunantwort besonders ausgeprägt. Dies läßt sich als zusätzliche Induktion einer Th1-Antwort durch die ISS-Behandlung erklären, welche möglicherweise auch das Entzündungsgeschehen beim allergischen Asthma beeinflussen könnte.

1.2 Die ISS haben keinen Effekt auf die Etablierung der Entzündung

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die ISS-Prophylaxe einen Einfluß auf die Rekrutierung von Entzündungszellen in die Atemwege hat.

Die Atemwegsentzündung ist gekennzeichnet durch ein rundzelliges perivaskuläres und peribronchiales Infiltrat mit einem hohen Anteil eosinophiler Granulozyten, die wichtige Effektorzellen bei der Soforttypreaktion sind. Die Anzahl und Dichte der Leukozyten in den Atemwegen reflektiert als Marker die Stärke der Entzündungsreaktion. Durch Differenzierung der Leukozytenpopulationen aus der broncho-alveolären Lavage (BAL) läßt sich die Entzündung qualitativ beschreiben.

1.2.1 Leukozyten und deren Differenzierung aus der BAL

Nach morphologischen Kriterien wurden Lymphozytenpopulationen aus der BAL differenziert und die absolute Zahl anhand der Gesamtzellzahl und der prozentualen Anteile der Zellsubpopulationen im Präparat ermittelt. Es wurden eosinophile und neutrophile Granulozyten, sowie Lymphozyten und Makrophagen unterschieden und jeweils pro ml BAL-Flüssigkeit angegeben.

Die ISS behandelte Gruppe (OVA-ISS) zeigte bei keiner Zellsubpopulation im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (OVA-NIL) eine signifikante Änderung (keine Abbildung).

Bei allergischer Genese der Entzündung nimmt der relative Anteil eosinophiler Granulozyten zu. Extravasierte Zellen lassen sich in der BAL nachweisen. Im Vergleich

der Gruppen untereinander zeigten sich zwischen OVA-ISS und OVA-NIL bzw. OVA-ISS_{ctrl} und OVA-NIL keine signifikanten Unterschiede. Die Mittelwerte der Eosinophilenzahlen lagen bei 720 000/ml (OVA-ISS), 650 000/ml (OVA-ISS_{ctrl}) und bei 490 000/ml (OVA-NIL). OVA-NIL unterschied sich von den unsensibilisierten Tieren (NIL-NIL) erwartungsgemäß signifikant ($p \leq 0,001$) (**Abb.10 A**).

Auch bei den Lymphozyten in der BAL wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei sensibilisierten Gruppen gefunden. Die Mittelwerte der einzelnen Gruppen lagen hier bei 103 000/ml (OVA-ISS), 105 000/ml (OVA-ISS_{ctrl}) und 73 000/ml (OVA-NIL) (**Abb.10 B**).

Was bei den Eosinophilen und Lymphozyten tendenziell als ein Anstieg der Zellzahlen in den ISS-Gruppen gegenüber der sensibilisierten aber unbehandelten OVA-NIL zu beobachten war, verkehrt sich bei den neutrophilen Granulozyten und Makrophagen ins Gegenteil. Obwohl auch hier keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den drei sensibilisierten Gruppen zu Tage traten, so ist doch eine tendenzielle Abnahme der absoluten Zellzahlen in den BAL der Gruppen OVA-ISS und OVA-ISS_{ctrl} ersichtlich.

Für die neutrophilen Granulozyten lagen die Mittelwerte bei 12 000 (OVA-ISS), 6500 (OVA-ISS_{ctrl}) und 47 000 (OVA-NIL) (**Abb.10 C**).

Bei den Makrophagenzahlen in der BAL ist die übliche Signifikanz zwischen der unsensibilisierten Kontrollgruppe und den drei sensibilisierten Gruppen nicht gegeben. Alveolarmakrophagen kommen physiologischer Weise auch bei völlig gesunden Tieren in der Lunge vor und können bei der BAL ausgespült werden. Tendenzuell scheint sich die Anzahl in den behandelten Gruppen (OVA-ISS und OVA-ISS_{ctrl}) im Vergleich zur sensibilisierten, aber unbehandelten (OVA-NIL) zu reduzieren. Die Mittelwerte liegen bei 40 000 (OVA-ISS) 46 000 (OVA-ISS_{ctrl}) und 85 000 (OVA-NIL) (**Abb.10 D**).

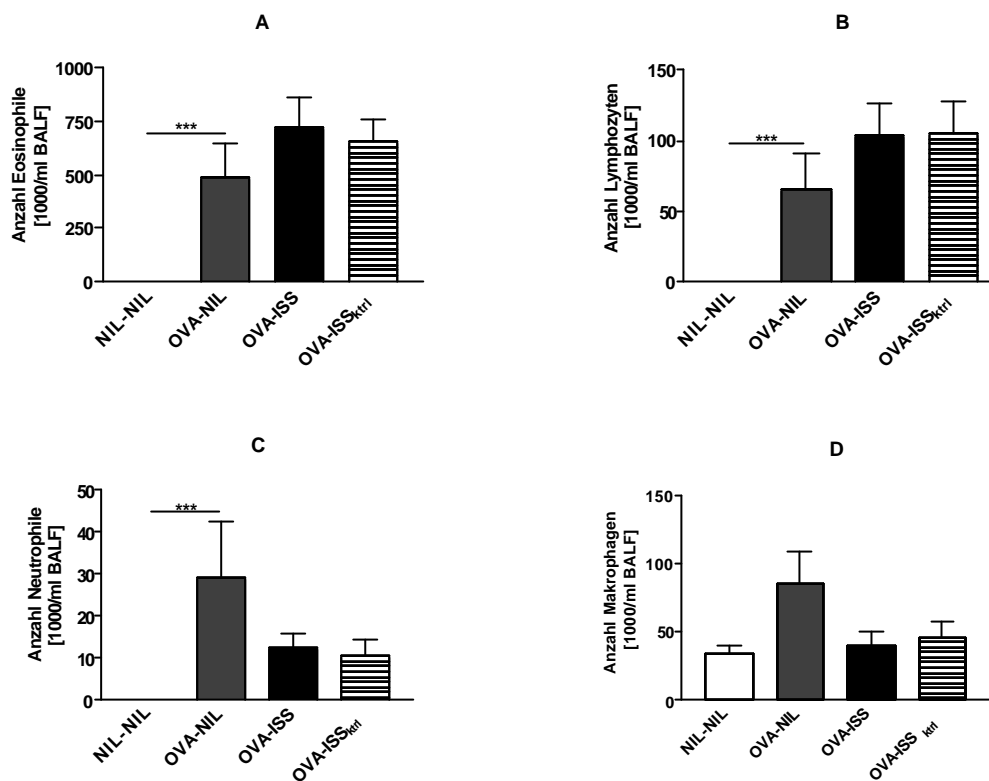


Abbildung 10: Zeldifferenzierung aus der broncho-alveolären Lavage

Die sensibilisierten und behandelten Tiere wurden nach viermaliger Atemwegsprovokation mit dem spezifischen Allergen Ovalbumin an den Tagen 36 bis 39 am Tag 40 durch zervikale Dislokation getötet und nach Präparation der Trachea diese kanüliert und die Lunge gespült. Die so gewonnenen Zellen wurden auf Objektträger aufzentrifugiert, gefärbt und anschließend unter dem Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung nach morphologischen Kriterien differenziert. Die Diagramme A bis D zeigen Mittelwerte \pm SEM, dabei gilt für die Signifikanzniveaus $p \leq 0,05$ * in Abb., $p \leq 0,01$ ** in Abb. und $p \leq 0,001$ *** in Abb..

Es muß schließlich zusammenfassend festgestellt werden, daß trotz gewisser Tendenzen zur Verminderung der Neutrophilen- und Makrophagenzahlen in der OVA-ISS Gruppe gegenüber der unbehandelten Kontrolle sich statistisch keine Signifikanzen finden.

Die prophylaktische Immunmodulation mit ISS zeigte also keinen deutlichen Effekt auf die Rekrutierung von Entzündungszellen im lavagierbaren Kompartiment der Lungen. Diese Beobachtung wurde histologisch überprüft.

1.3 Die Histologie zeigt ein geringeres Infiltrat nach ISS-Immunprophylaxe

Hier wurde untersucht, ob sich durch die ISS-Prophylaxe die durch Allergen-Rechallenge hervorgerufenen histologischen Veränderungen der Lungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beeinflussen lassen.

Wie unter Material und Methoden beschrieben, wurden am Ende der Analyse die Lungen präpariert, Dünnschnitte angefertigt und diese zur mikroskopischen Auswertung nach HE- und PAS-Methode gefärbt.

Die OVS-ISS Gruppe zeigte histologisch eine deutliche Verminderung des mononukleären Zellinfiltrats gegenüber der unbehandelten Kontrolle (OVA-NIL) (**Abb.11/1C vs. B**).

In der OVA-ISS_{ctrl} Gruppe viel diese Verminderung des Infiltrats deutlich geringer aus (**Abb.11/1D vs. B**).

Erwartungsgemäß zeigt die Gruppe der sensibilisierten aber unbehandelten Tier (OVA-NIL) das stärkste Infiltrat gegenüber der Negativkontrolle (NIL-NIL) (**Abb.11/1B vs. A**).

Ähnlich verhielt es sich mit der Hyperplasie der Becherzellen, die in den PAS-gefärbten Bildern sichtbar wird. Hier war eine deutlich geringere Dichte der PAS-positiven, schleimbildenden Becherzellen in der OVA-ISS Gruppe gegenüber der OVA-NIL Gruppe zu beobachten (**Abb.11/2C vs. B**).

Die kontroll-behandelte Gruppe OVA-ISS_{ctrl} zeigte keine Verminderung der schleimbildenden Becherzellen gegenüber der OVA-NIL Gruppe (**Abb.11/2D vs. B**).

Erwartungsgemäß zeigte die Gruppe der sensibilisierten aber unbehandelten Tier (OVA-NIL) die größte Dichte schleimbildender, PAS-positiver Zellen gegenüber der Negativkontrolle (NIL-NIL) (**Abb.11/2B vs. A**).

1.3.1 Semiquantitative Auswertung der Zellpopulationen im Lungenpräparat

Um die histologisch beobachteten Effekte semiquantitativ auszuwerten, wurden Zellen im Entzündungsinfiltrat in sog. „High-Power-Fields“ (HPF) differenziert und gezählt. Unter einem HPF ist jeweils ein markiertes Sichtfeld in repräsentativen Ausschnitten bei 100-facher Vergrößerung zu verstehen. In zwölf HPF wurden jeweils die

eosinophilen Granulozyten als charakteristische Zellen der allergischen Entzündung gezählt und die Gruppen miteinander verglichen.

Hier bestätigte sich die Beobachtung, daß in der OVA-ISS Gruppe signifikant weniger Zellen zu finden waren, als in der unbehandelten Kontrollgruppe (OVA-NIL). Die OVA-ISS_{ctrl} Gruppe zeigte keinen Unterschied zur OVA-NIL Gruppe in der Dichte der Eosinophilen. OVA-NIL- und NIL-NIL Gruppe unterschieden sich erwartungsgemäß hoch signifikant ($p \leq 0,001$) in der Dichte der Eosinophilen. Diese Ergebnisse sind in der **Abb.11/3** zusammengefaßt.

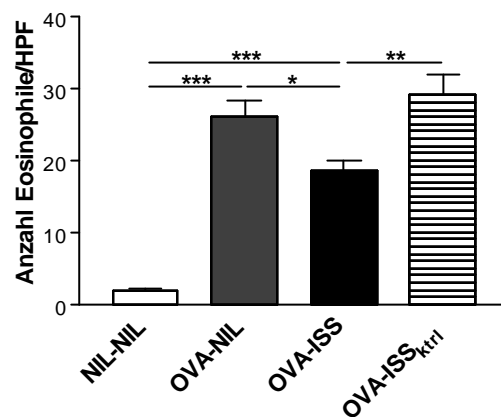


Abbildung 11/3: Anzahl eosinophile Granulozyten im High-Power-Field

Repräsentative Areale der Histologischen Lungenpräparate wurden unter Verwendung eines 100fach vergrößernden Objektivs mikroskopiert und die Zahl der eosinophilen Granulozyten pro Sichtfeld gezählt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte aus Auszählungen von 12 Sichtfeldern (HPF) pro Gruppe \pm SEM. Dabei gilt für die Signifikanzniveaus $p \leq 0,05$ * in Abb., $p \leq 0,01$ ** in Abb. und $p \leq 0,001$ *** in Abb..

Die ISS-Prophylaxe verbessert also entscheidend das histologische Bild im Sinne einer Unterdrückung des zellulären Infiltrats und der Becherzellmetaplasie im Lungengewebe. Dieser Effekt konnte in der semiquantitativen Auswertung der Histologie bestätigt werden. Aus diesen Ergebnissen erwächst nun die Frage, wie sich das ISS-Prophylaxe auf die Lungenfunktion auswirkt.

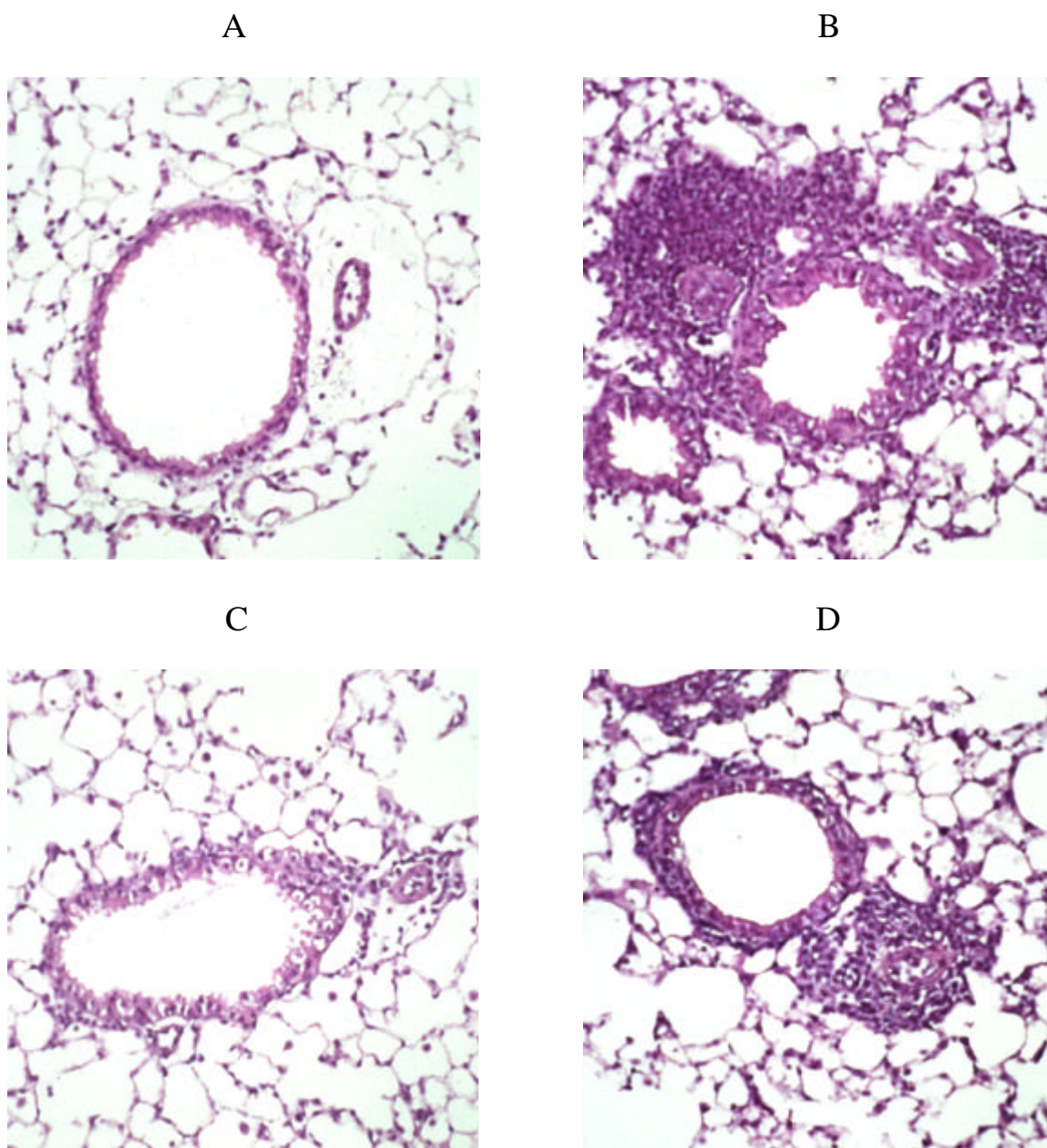


Abbildung 11/1: Histologische Lungenpräparate Färbung HE

Nach Durchführung der BAL am letzten Protokolltag wurden die Lungen der Tiere wie in Material und Methoden beschrieben fixiert, eingebettet und Schnittpräparate angefertigt. A=NIL-NIL, B=OVA-NIL, C=OVA-ISS, D=OVA-ISS_{ctrl}. Erläuterungen siehe Text Abschnitt 1.3.

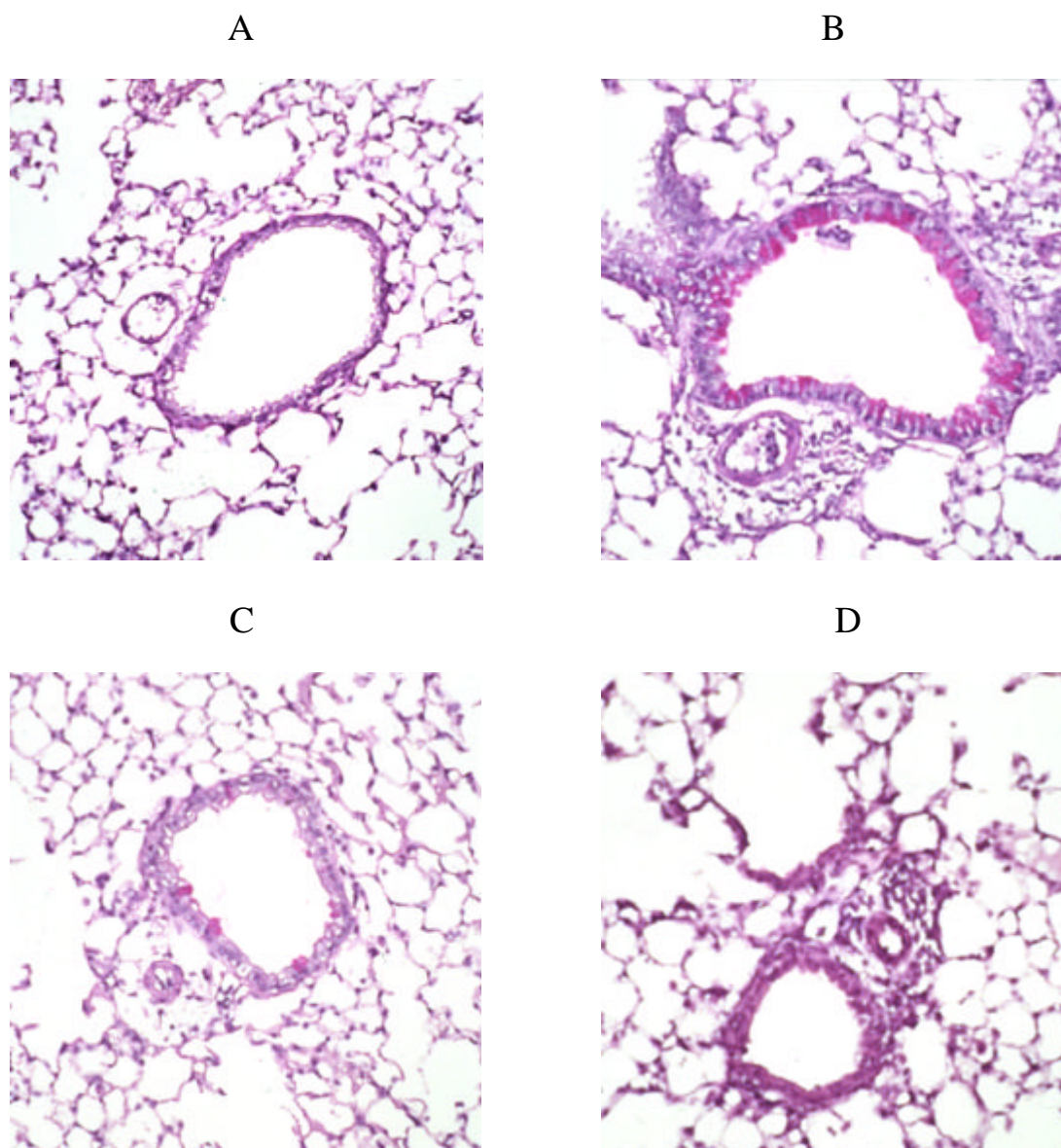


Abbildung 11/2: Histologische Lungenpräparate Färbung PAS

Nach Durchführung der BAL am letzten Protokolltag wurden die Lungen der Tiere wie in Material und Methoden beschrieben fixiert, eingebettet und Schnittpräparate angefertigt. A=NIL-NIL, B=OVA-NIL, C=OVA-ISS, D=OVA-ISSktrl. Erläuterungen siehe Text Abschnitt 1.3.

1.4 Die ISS-Prophylaxe verhindert die Entstehung bronchialer Hyperreagibilität in der C57Bl/6 Maus

Im nun folgenden Abschnitt wurde der Frage nachgegangen, ob sich die ISS-Prophylaxe auf die dem allergischen Asthma eigene Atemwegshyperreagibilität auswirkt.

Am Ende der Versuchszeit wurden die Tiere wie in Material und Methoden beschrieben mittels der Head-Out Body-Plethysmographie auf die Entwicklung bronchialer Hyperreagibilität (AHR) hin untersucht. Der Nachweis der AHR erfolgte durch Vergleich zu einer Kontrollgruppe gesunder, nicht sensibilisierter Tiere (NIL-NIL).

1.4.1 Nachweis bronchialer Hyperreagibilität in der OVA-Gruppe im Vergleich zur unsensibilisierten Negativ-Kontrolle

Der Mittelwert der MCh-Konzentrationen, bei dem der EF_{50} -Wert der einzelnen Tiere unter 50% der Baseline gefallen war, lag in der unbehandelten Kontrollgruppe bei 87,85 mg/ml und bei der OVA-sensibilisierten Positiv-Kontrollgruppe bei 68,52 mg/ml ($p=0,024$). Dies bedeutet, daß die OVA-sensibilisierten Tiere im Vergleich zu den gesunden Tieren der Negativ-Kontrolle eine erhöhte Kontraktionsbereitschaft der Atemwegsmuskulatur, also eine bronchiale Hyperreagibilität entwickelt haben.

1.4.2 Die ISS-behandelte Gruppe entwickelt trotz Sensibilisierung keine AHR

Von besonderer Bedeutung für die vorliegende Arbeit war der Einfluß der prophylaktischen ISS-Immuntherapie auf die Entwicklung einer AHR nach Allergen-Rechallenge in der sensibilisierten C57Bl/6 Maus.

Der Mittelwert der MCh-Konzentration bei $EF_{50}=50\%$ von Baseline lag bei der ISS-behandelten Gruppe (OVA-ISS) mit 82,52mg/ml nur leicht unterhalb dem der völlig unbehandelten, gesunden Tiere (NIL-NIL=87,85mg/ml). Die Gruppen unterschieden sich also im Hinblick auf die AHR statistisch nicht.

Folglich wurde die Entstehung bronchialer Hyperreagibilität nach Allergenaerosolexposition durch die ISS-Immunbehandlung verhindert.

1.4.3 Die Behandlung mit Kontroll-ISS vermag die Entwicklung einer AHR in der sensibilisierten C57Bl/6 Maus nicht zu verhindern

Der Mittelwert der MCh-Konzentration bei $EF_{50}=50\%$ von Baseline lag in der OVA-ISS_{ctrl} Gruppe mit 62,00mg/ml deutlich unter dem der Negativ-Kontrollgruppe (NIL-NIL=87,85mg/ml) und der ISS-Immunbehandlungs-Gruppe (OVA-ISS=82,52mg/ml). Die Überprüfung der statistischen Signifikanz ergab ein deutliches Ergebnis im Hinblick auf die Entstehung bronchialer Hyperreagibilität im Vergleich zur Gruppe der gesunden, nicht sensibilisierten Tiere. Der Effekt war hier vergleichbar mit der Positiv-Kontrollgruppe, die zwar sensibilisiert war, aber keinerlei weitergehenden immunmodulatorischen Eingriff erfahren hatte (OVA-NIL=68,52 mg/ml). Die Behandlung mit Kontroll-ISS hatte also keinen positiven Einfluß auf die AHR. **Abb.12** faßt die Ergebnisse graphisch zusammen.

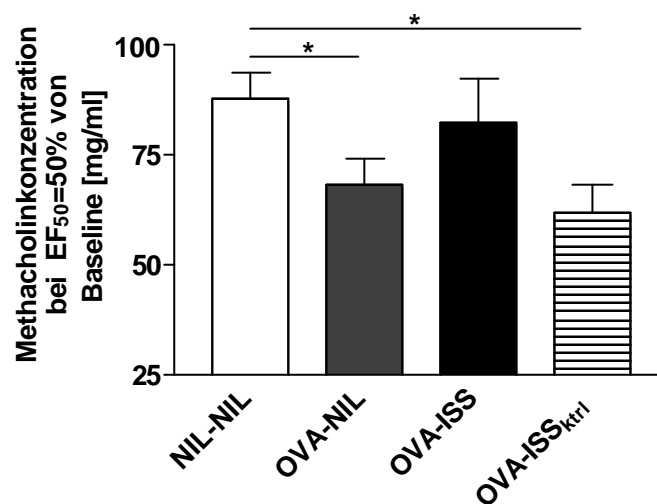


Abbildung 12: Messung der bronchialen Reagibilität mittels Head-Out Body-Plethysmographie

Am Tag 40 des Experimentes wurden die Tiere aller Gruppen mittels der Head-Out Body-Plethysmographie auf die Entwicklung bronchialer Hyperreagibilität (AHR) hin untersucht. Zu diesem Zweck wurde der EF_{50} -Wert als Maß für die Bronchoobstruktion erfaßt und die Konzentration des Bronchokonstriktors Metacholin (MCh) ermittelt, bei der der EF_{50} -Wert auf 50% des Baseline-Wertes gefallen war. Das Diagramm zeigt Mittelwerte \pm SEM, dabei galt $p < 0,05$ als signifikant (*).

Zusammenfassend kann eingeschätzt werden, daß die ISS-Immunprophylaxe in erwünschter Weise die Entstehung einer Atemwegshyperreagibilität verhindert. Dieser Effekt ist sequenzspezifisch, da er bei Behandlung mit der Kontrollsequenz nicht auftrat.

2 Wirkung der ISS und der spezifischen Immuntherapie auf eine etablierte Atemwegsentzündung

Im diesem experimentellen Ansatz wurde untersucht, inwieweit eine Immuntherapie nach vorangegangener Sensibilisierung und etablierter Atemwegsentzündung durch Allergenaerosolprovokation die allergische, Th2-dominierte Immunantwort modifizieren kann.

Wie in Material und Methoden beschrieben, wurde das erste Protokoll um die konventionelle Immuntherapiegruppe OVA-OVA_{IT} erweitert.

2.1 Die Immunglobulintiter werden unter ISS- und Immuntherapie unterschiedlich beeinflusst

Auch hier wurde zunächst auf Ebene der Immunglobuline untersucht, ob sich durch eine ISS-Immunmodulation oder durch eine konservative Immuntherapie eine etablierte Th2-Immunantwort nach Sensibilisierung und Allergen-Challenge modifizieren läßt.

Zu diesem Zweck wurden im Serum der Versuchstiere die Titer für anti-OVA IgG1, anti-OVA IgE, und anti-OVA IgG2a mittels ELISA-Technik gemessen (siehe Material und Methoden). Die Serumgewinnung geschah jeweils vor der Sensibilisierung, sowie vor und nach erfolgter Immunmodulation.

2.1.1 Die ISS-Immunmodulation zeigt spezifische Unterschiede zur konventionellen Immuntherapie

Als einzige war die konventionelle Immuntherapie (OVA-OVA_{IT}) in der Lage, die Titer für IgG1 im Vergleich zur OVA-NIL Gruppe niedrig zu halten. Die Erhöhung der anti-OVA IgG2a Titer war bei der ISS-Immunbehandlungs-Gruppe am ausgeprägtesten.

Bei den anti-OVA IgG1 Globulinen zeigte die ISS-Immunbehandlung keine Beeinflussung gegenüber der unbehandelten Kontrolle (OVA-NIL), so auch nicht die ISS-Kontrollgruppe (OVA-ISS_{ctrl}). Hingegen verhinderte die konventionelle Immuntherapie einen Anstieg der Titer im Vergleich zur OVA-NIL Gruppe und hielt sie somit auf dem Niveau vor der Immunintervention (**Abb.13A**).

Für anti-OVA IgE zeigte die ISS-Immunbehandlung keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur OVA-NIL Gruppe. Gleiches galt für OVA-ISS_{ctrl} und OVA-OVA_{IT}. Die Titer aller dieser Gruppen waren aber signifikant niedriger, als vor Beginn der Immunintervention. Eine verstärkte Absenkung zusätzlich zu diesem allgemeinen Rückgang der Titer war am ehesten in der ISS-Immunbehandlungs-Gruppe anzutreffen (**Abb.13B**).

Bei den anti-OVA IgG2a Titern war der herausragendste Anstieg gegenüber der OVA-NIL Gruppe in der OVA-ISS Gruppe zu beobachten. OVA-OVA_{IT} zeigte diesen Anstieg der anti-OVA IgG2a Titer schwächer, OVA-ISS_{ctrl} nicht mehr signifikant (**Abb.13C**).

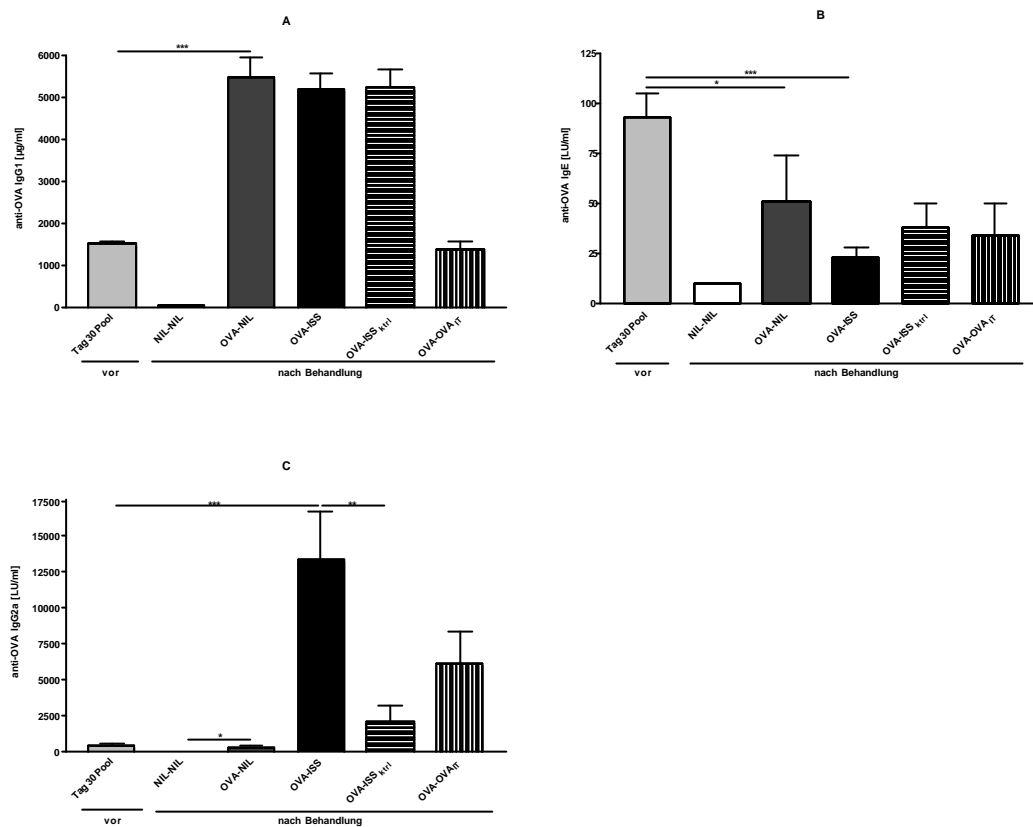


Abbildung 13: Immunglobulintiter nach Immunmodulation mit ISS versus konservativer IT

Nach erfolgreicher Sensibilisierung aller Gruppen außer NIL-NIL (n=12) wurde am Tag 30 Serum gewonnen und darin die Immunglobulintiter im ELISA-Verfahren bestimmt. Nach Ablauf der Immunmodulation in den Behandlungsgruppen wurde an Tag 55 gleichermaßen verfahren. Die Diagramme A bis C zeigen Mittelwerte \pm SEM, dabei gilt für die Signifikanzniveaus $p \leq 0,05$ * in Abb., $p \leq 0,01$ ** in Abb. und $p \leq 0,001$ *** in Abb..

Es bleibt festzustellen, daß die zu vermutenden Effekte einer „redirection“ vom anti-OVA IgG1 und anti-OVA IgE bestimmten Th2-Profil zum anti-OVA IgG2a betonten Th1-Profil in dieser Reinform unter keiner der durchgeführten Behandlungen zu beobachten waren.

Der ausgeprägte Anstieg der anti-OVA IgG2a Titer unter ISS-Immunbehandlung und teils auch unter konventioneller Immuntherapie ist jedoch bereits als Teilerfolg in diese Richtung zu werten. Auch der verhinderte Anstieg der anti-OVA IgG1 Titer durch die konventionelle Immuntherapie ist hochgradig erwünscht. Die Einflüsse der Behandlungen auf die anti-OVA IgE Titer sind als eher indifferent einzustufen.

Genauere Hinweise auf die systemischen Wirkungsweisen der beiden unterschiedlichen Behandlungsmethoden könnte die Messung der Zytokinproduktion mononukleärer Zellen in diesen Gruppen liefern.

2.2 Die Immunmodulation beeinflusst die Zytokinproduktion der mononukleären Zellen

Um den systemischen Effekt der ISS-Immunbehandlung bzw. der konventionellen Immuntherapie im Hinblick auf das Th1/Th2-Gleichgewicht zu untersuchen, wurde hier die Zytokinproduktion mononukleärer Zellen erfaßt. Dabei wurden IFN- γ als Marker eines Th1-Profiles, sowie IL-4 und IL-10 als Marker eines Th2-Profiles gemessen. Darüberhinaus wurde TNF- α bestimmt.

Wie in Material und Methoden beschrieben, wurden mononukleäre Zellen aus den Milzen der Tiere isoliert und anschließend mit P/I bzw. mit dem spezifischen Allergen (Ovalbumin) *in vitro* zur Zytokinproduktion stimuliert.

2.2.1 ISS-Immunbehandlung und konventionelle Immuntherapie haben ergänzende Effekte im Sinne einer Th1-Gewichtung

Wurde mit Allergen stimuliert, so fand sich nur in der OVA-ISS Gruppe ein Anstieg des Th1-Zytokins IFN- γ . Eine Supprimierung des Th2-Zytokins IL-4 war in der Gruppe der konventionellen Immuntherapie (OVA-OVA_{IT}) zu beobachten.

In der OVA-ISS Gruppe blieb die Zytokinproduktion von IL-4, IL-10 und TNF- α gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe (OVA-NIL) nach Allergenrestimulation unverändert. Gleiches gilt für IFN- γ und IL-10 in der OVA-OVA_{IT} Gruppe. In der OVA-ISS-Kontrollgruppe fanden sich keinerlei signifikante Änderungen der Zytokinproduktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Unter Mitogenstimulation war in den Gruppen OVA-ISS und OVA-OVA_{IT} ein Rückgang der Produktion aller gemessenen Zytokine im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (OVA-NIL) zu beobachten. In der OVA-ISS_{ctrl} Gruppe hingegen stieg die Produktion von IFN- γ , IL-4 und IL-10 an. Die TNF- α Produktion blieb hier im Vergleich zur OVA-NIL Gruppe unverändert (siehe **Tabelle 5**).

Tabelle 5: Synoptische Darstellung der Effekte einer konventionellen Immuntherapie (OVA-OVA_{IT}), im Vergleich zur Therapie mit OVA-ISS und einer Kontroll-Sequenz (OVA-ISS_{ktrl}). Die dargestellten Effekte verstehen sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (OVA-NIL).

	OVA-ISS	OVA-OVA _{IT}	OVA-ISS _{ktrl}
Zytokine nach P/I-Stimulation (IFN-γ, IL-4; TNF-α; IL-10)	↓	↓	IFN- γ ↑ IL-4 ↑ IL-10 ↑ TNF- α ∅
Zytokine nach OVA-Stimulation	IFN- γ ↑ IL-4 ∅ IL-10 ∅ TNF- α ∅	IFN- γ ∅ IL-4 ↓ IL-10 ∅ TNF- α ↓	∅

Sowohl die ISS-Immunbehandlung als auch die konventionelle Immuntherapie lassen Effekte im Sinne einer Th1-Gewichtung erkennen. ISS verstärkt die IFN- γ Produktion und die konventionelle Immuntherapie senkt die IL-4 und TNF- α Produktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (OVA-NIL). Beide Beobachtungen stellen Effekte dar, die im Sinne einer „redirection“ erwünscht sind. Ob sich diese Effekte in der Lungenfunktion widerspiegeln, wurde im nächsten Schritt untersucht.

2.3 Die AHR normalisiert sich in allen Behandlungsgruppen

Wie auch schon im prophylaktischen Ansatz der ISS-Immuntherapie wurde der Einfluß der Immunmodulation auf die bronchiale Reagibilität untersucht. Am Ende des Protokolls wurde wieder mittels Body-Plethysmographie die Metacholinkonzentration ermittelt, die zur 50%igen Reduktion des halbmaximalen Atemflusses führte.

Keine der Behandlungsgruppen zeigte signifikante Unterschiede in den Metacholinkonzentrationen im Vergleich zu nichtsensibilisierten Kontrolltieren (NIL-NIL). Sowohl ISS-Immunbehandlung und Kontroll-ISS (OVA-ISS_{ktrl}) als auch konventionelle Immuntherapie waren also in der Lage die Atemwegshyperreagibilität zurückzubilden, die sich erwartungsgemäß in der unbehandelten Kontrollgruppe OVA-NIL zeigte.

Die Werte der konservativ behandelten Gruppe (OVA-OVA_{IT}) waren denen der Negativkontrollen (NIL-NIL) am nächsten (94,93mg/ml \pm 6,06 für NIL-NIL und 98,68mg/ml \pm 4,46 für OVA-OVA_{IT}). Aber auch die Behandlung mit ISS zeigte einen ähnlichen Erfolg 90,31mg/ml \pm 8,79 für OVA-ISS).

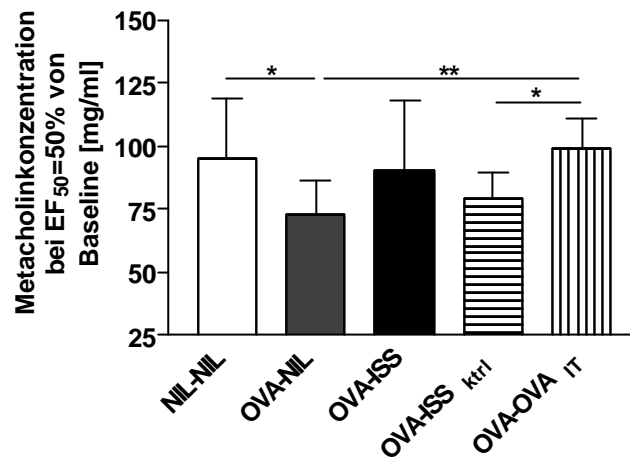


Abbildung 14: Messung der bronchialen Reagibilität mittels Head-Out Body-Plethysmographie

Am Tag 55 der zweiten Experimentalserie wurden die Tiere aller Gruppen mittels der Head-Out Body-Plethysmographie auf die Entwicklung bronchialer Hyperreagibilität (AHR) hin untersucht. Zu diesem Zweck wurde der EF₅₀-Wert als Maß für die Bronchoobstruktion erfaßt und diejenige Konzentration des Bronchokonstriktors Metacholin (MCh) berechnet, bei der der EF₅₀-Wert unter 50% des Baseline-Wertes gefallen war. Das Diagramm zeigt Mittelwerte \pm SEM, dabei gilt für die Signifikanzniveaus $p \leq 0,05$ * in Abb., $p \leq 0,01$ ** in Abb. und $p \leq 0,001$ *** in Abb..

3 ISS-Therapie versus konventionelle Immuntherapie im Mausmodell für allergisches Asthma

Im Dritten Schritt wurde nun der Frage nachgegangen, inwieweit sich die ISS-Immunbehandlung und die klassische Immuntherapie zur Therapie eines etablierten allergischen Phänotyps in einem Protokoll mit wiederholter Allergenexposition eignen. Diese im Mausmodell geschaffene Situation ist der eines Asthmatikers am ähnlichsten. Sie bietet die Möglichkeit, beide Therapieansätze im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung qualitativ und quantitativ miteinander zu vergleichen.

Wie in Material und Methoden beschrieben, lag hier die Phase der Immunmodulation zwischen zwei Allergenaerosol-Provokationen. Dieses Protokoll spiegelte somit die

klinische Situation wiederholter Allergie- und Asthmaattacken am ehesten wider. Neben der konventionellen Immuntherapie (OVA-OVA_{IT}) wurden die Tiere wiederum mit OVA-ISS Adsorbat behandelt. Zur Kontrolle wurde diesmal statt einem ISS-Adsorbat mit inverser Kontrollsequenz eine wäßrige ISS Lösung appliziert (OVA-ISS_{H₂O}). Dies diente der Kontrolle möglicher Effekte, die von der Art der Applikation, oder der Struktur des Agens abhängen könnten.

3.1 Die Immunglobulintiter entwickeln sich in den Untergruppen ähnlich

Auch im therapeutischen Ansatz wurde wieder zunächst auf Ebene der Immunglobuline untersucht, ob ISS-Immunmodulation oder konservative Immuntherapie einen positiven Einfluß auf eine etablierte Th2-Immunantwort unter wiederholter Allergen-Challenge haben.

Hierzu wurden im Serum der Versuchstiere die Titer für anti-OVA IgG1, anti-OVA IgE und anti-OVA IgG2a mittels ELISA-Technik gemessen (siehe Material und Methoden). Die Serumgewinnung erfolgte jeweils vor der Sensibilisierung, sowie vor Beginn der Immunmodulation und nach Abschluß der zweiten Challengephase.

Auffallend bei diesem therapeutischen Ansatz war, daß die Behandlungsarten untereinander kaum Unterschiede im Hinblick auf die Beeinflussung der Immunglobulintiter zeigten.

Anti-OVA IgG1 war in keiner der Gruppen (OVA-ISS, ISS+OVA_{H₂O} und OVA-OVA_{IT}) gegenüber der OVA-NIL Gruppe signifikant verschieden. Am ehesten war noch die konventionelle Immuntherapie in der Lage, die Titer für anti-OVA IgG1 auf dem Niveau vor der Immunmodulation zu halten.

Für anti-OVA IgE zeigten alle Behandlungsgruppen vergleichbare Titer mit dem der OVA-NIL Gruppe. Diese waren in allen Gruppen im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Therapie signifikant abgesunken.

Bei anti-OVA IgG2a zeigte sich für alle Behandlungsarten ein signifikanter Anstieg der Titer gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe (OVA-NIL). Der deutlichste Th1-Effekt war aber bei den Gruppen zu beobachten, die ISS entweder als Adsorbat, oder in wäßriger Lösung erhalten hatten.

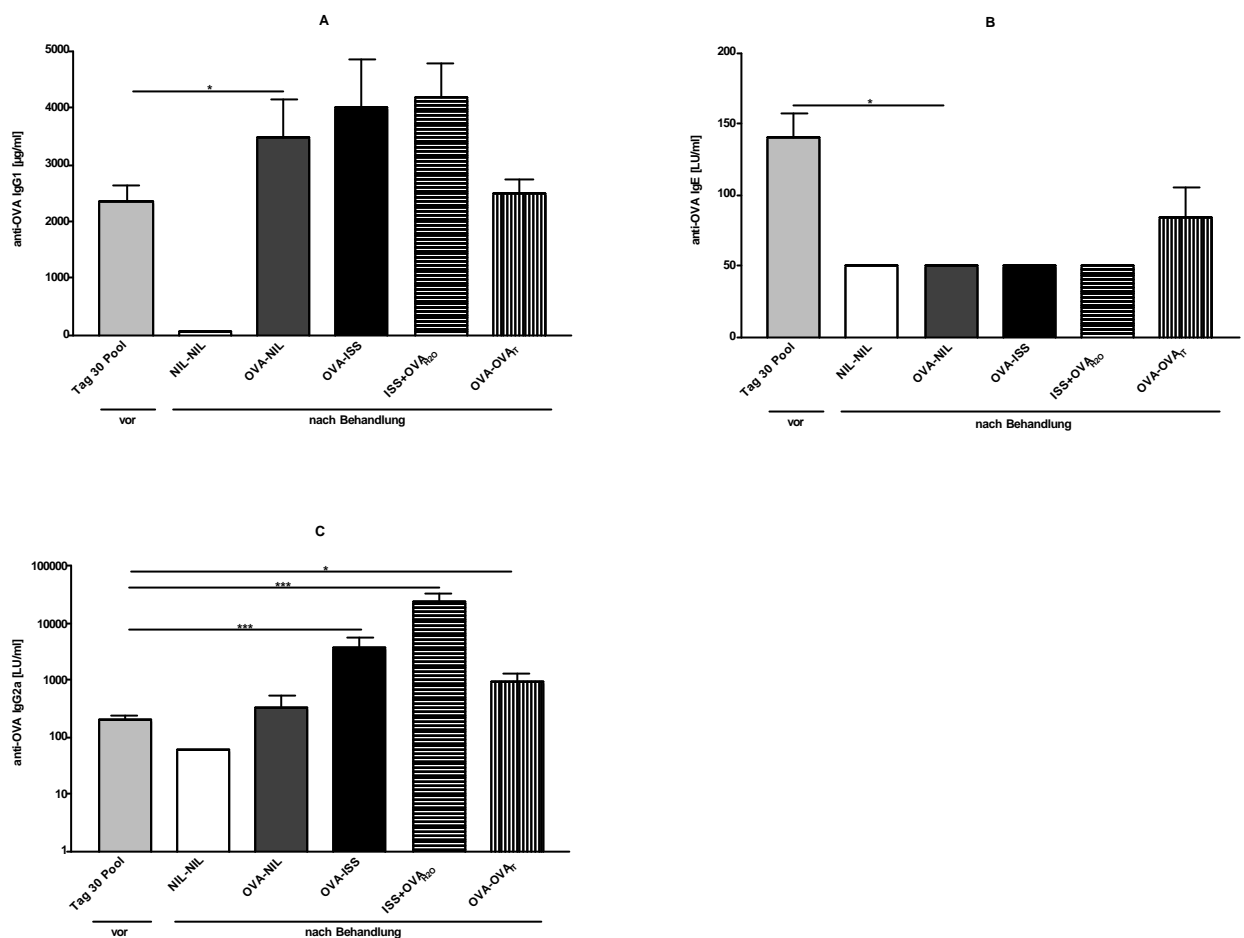


Abbildung 15: Immunglobulintiter nach Immuntherapie mit ISS-Adsorbat, ISS in wäßriger Lösung und konservativer IT

Nach erfolgreicher Sensibilisierung aller Gruppen außer NIL-NIL (n=8) wurde am Tag 30 Serum gewonnen und darin die Immunglobulintiter im ELISA-Verfahren bestimmt. Nach Ablauf der Immunmodulation in den Behandlungsgruppen wurde an Tag 55 gleich verfahren. Die Diagramme A bis C zeigen Mittelwerte \pm SEM, dabei gilt für die Signifikanzniveaus $p \leq 0,05$ * in Abb., $p \leq 0,01$ ** in Abb. und $p \leq 0,001$ *** in Abb..

Es zeigte sich auf Ebene der Immunglobuline der schon im Abschnitt 2.1.1 beobachtete Effekt, daß die ISS-Immunbehandlung in der Lage ist, die Titer der Th1-bezogenen Immunglobuline IgG2a positiv zu beeinflussen. Dieser trat ebenso ausgeprägt nach Applikation der wäßrigen Lösung ein. Auch hier fand sich ein Unterschied zum Effekt der konventionellen Immuntherapie. Die Effekte auf die Th2-spezifischen Immunglobuline anti-OVA IgG1 und anti-OVA IgE weisen, wie bereits beobachtet, nicht auf eine Abschwächung der Th2-Aktivität hin. Ob diese Befunde mit der Atemwegsentzündung korrelieren, wurde im nächsten Abschnitt untersucht.

3.2 Die Atemwegsentzündung wird nicht beeinflusst

Hier wurde der Frage nachgegangen, ob im therapeutischen Ansatz der Immunmodulation mit ISS oder mit der konventionellen Immuntherapie die Atemwegsentzündung bei wiederholter Allergenprovokation unterdrückt, oder zumindest geschwächt werden kann.

Hierzu wurden, wie unter Material und Methoden beschrieben, die Tiere nach Abschluß der Messungen getötet und eine broncho-alveoläre Lavage durchgeführt. In der BAL wurden anschließend Leukozyten gezählt und differenziert.

Die Tiere aller sensibilisierten Gruppen zeigten eine deutliche leukozytäre Infiltration der Lungen im Vergleich zur unsensibilisierten Kontrollgruppe (NIL-NIL). Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen waren im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (OVA-NIL) nicht festzustellen. Gleiches galt für die Zellsubpopulationen in der Differenzierung

Unter den Bedingungen des therapeutischen Ansatzes war also keine der Behandlungsformen in der Lage, auf die Atemwegsentzündung Einfluß zu nehmen.

Mögliche Effekte der Therapieformen auf die Aktivierung von Immunzellen konnten so allerdings nicht untersucht werden. Hierzu war die Bestimmung der Zytokinproduktion mononukleärer Zellen notwendig.

3.3 Messung der Zytokine im therapeutischen Ansatz

Wie bereits unter 2.2 erläutert, gelten die von mononukleären Zellen sezernierten Zytokine als empfindliche Marker für die Unterscheidung der Effektorsubpopulationen.

Beim therapeutischen Ansatz wurden zunächst in den Kulturüberständen die Zytokinkonzentrationen für IFN- α , IL-2, IL-4, IL-5 und TNF- α gemessen.

In einem weiteren Verfahren wurden, intrazellulär akkumulierte Zytokine (IFN- α und IL-10) in aufgereinigten, mononukleären Zellen der Milz gemessen, um eine zusätzliche Aussage über die Frequenz zytokinproduzierender Zellen zu erhalten. So könnte ggf. der Th1/Th2-Profilwechsel direkt auf zellulärer Ebene gezeigt werden.

3.3.1 Nach Restimulation kaum Effekte auf die Zytokine im Überstand

Nach spezifischer Restimulation mit OVA für 72 Stunden konnten in keiner der Behandlungsgruppen Veränderungen der Zytokinkonzentrationen gegenüber der unbehandelten Kontrolle (OVA-NIL) beobachtet werden. In diesem Zusammenhang erscheint lediglich die signifikante Differenz zwischen OVA-ISS Gruppe und OVA-OVA_{IT} Gruppe erwähnenswert, die Konzentrationen für IL-4, IL-5 und TNF- α lagen in der konservativ behandelten Gruppe deutlich niedriger.

Nach 24 Stunden P/I-Stimulation war eine signifikante Senkung der Zytokinlevel von IL-2, IL-4 und IL-5 lediglich in der konservativ behandelten Gruppe (OVA-OVA_{IT}) zu vermerken. IFN- α und TNF- α blieben hier unbeeinflusst. In allen anderen Gruppen konnten keine Unterschiede zur NIL-NIL- bzw. OVA-NIL-Gruppe detektiert werden.

Tabelle 6: Zytokinmessungen im Überstand der Zellkultur

Zellen aus den Milzen der Tiere aller Gruppen wurden in Kultur genommen und unspezifisch für 24 Stunden (P/I), bzw. spezifisch für 72 Stunden (OVA) restimuliert. Anschließend wurden die Konzentrationen der Zytokine IFN- α , IL-2, IL-4, IL-5 und TNF- α mittels ELISA bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus n=4.

	OVA 72h					P/I 24h				
	IFN- α	IL-2	IL-4	IL-5	TNF- α	IFN- α	IL-2	IL-4	IL-5	TNF- α
NIL-NIL	41,43 \pm 12,83	12,58 \pm 3,84	1,53 \pm 1,77	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	1960 \pm 677,5	3620 \pm 1167	11,15 \pm 1,95	25,23 \pm 16,41	1061 \pm 247,9
OVA-NIL	105,3 \pm 45,32	21,78 \pm 4,05	2,53 \pm 1,71	25,13 \pm 23,06	144,0 \pm 145,6	2090 \pm 624,3	4269 \pm 853,5	10,93 \pm 1,95	27,75 \pm 5,05	1480 \pm 730,2
OVA-ISS	233,4 \pm 103,4	19,03 \pm 4,12	3,88 \pm 2,21	50,33 \pm 15,20	506,6 \pm 328,3	1899 \pm 181,4	3932 \pm 393,8	9,53 \pm 2,44	38,48 \pm 11,80	1163 \pm 74,02
ISS+ OVA_{H2o}	83,73 \pm 43,96	26,28 \pm 5,10	0,98 \pm 1,95	27,05 \pm 25,02	99,95 \pm 138,2	2173 \pm 353,7	4201 \pm 591,8	8,68 \pm 4,64	30,83 \pm 13,61	809,8 \pm 375,4
OVA-OVA_{IT}	109,2 \pm 57,49	17,00 \pm 4,35	0,35 \pm 0,70	13,15 \pm 7,80	124,1 \pm 113,3	1681 \pm 459,2	2704 \pm 496,9	5,58 \pm 1,04	15,35 \pm 4,04	871,8 \pm 384,9

3.3.2 Messung intrazellulär akkumulierter Zytokine

Die Messung intrazellulär akkumulierter Zytokine erbrachte keinen Hinweis auf eine Veränderung in den Behandlungsgruppen gegenüber der unbehandelten Kontrolle. IFN- α und IL-10 waren lediglich in der Subpopulation der CD4⁺ T-Zellen deutlich höher

gegenüber den Werten der CD4⁻ T-Zellen Population. Die Behandlungsgruppen unterschieden sich jedoch untereinander nicht signifikant.

Tabelle 7: Messung intrazellulär akkumulierter Zytokine in mononukleären Zellen der Milz

Am Tag 55 wurden aus den Milzen einiger Tiere mononukleäre Zellen aufgereinigt und mittels FACS Technik intrazellulär akkumulierte Zytokine getrennt nach Subpopulationen gemessen. Die Tabelle zeigt Mittelwerte \pm Standardabweichung.

	IFN- α		IL-10	
	CD4 ⁺	CD4 ⁻	CD4 ⁺	CD4 ⁻
NIL-NIL	17,48 \pm 9,73	4,35 \pm 1,34	5,71 \pm 3,27	0,55 \pm 0,35
OVA-NIL	9,06 \pm 1,89	3,28 \pm 0,93	2,72 \pm 0,4	0,45 \pm 0,08
OVA-ISS	8,49 \pm 0,89	2,94 \pm 0,27	2,77 \pm 0,66	0,36 \pm 0,1
ISS+OVA_{H2O}	10,61 \pm 2,61	2,77 \pm 1,08	2,21 \pm 0,71	0,35 \pm 0,11

Die Ergebnisse der Zytokinanalyse vermitteln den Eindruck, daß von den im therapeutischen Ansatz untersuchten Immunbehandlungsarten die konventionelle Immuntherapie die größte Potenz besitzt, eine Th2-Immunreaktion auf Ebene der Zytokinproduktion zur Th1-Immunreaktion umzudirigieren, auch wenn diese Effekte sehr diskret sind. Spannend bleibt in diesem klinisch orientierten Modellansatz die Frage nach der Beeinflussung der Atemwegsreagibilität.

3.4 ISS- und konventionelle Immuntherapie haben beide einen positiven Einfluß auf die Entwicklung einer AHR

Schließlich wurde auch im therapeutischen Ansatz untersucht, ob die unterschiedlichen Immunbehandlungen positive Effekte im Hinblick auf die Atemwegshyperreagibilität entfalten. Dazu wurde wieder die in Material und Methoden beschriebene Head-Out Body-Plethysmographie eingesetzt.

Auch im therapeutischen Modell zeigte sich, daß die Therapie mit ISS-Adsorbat in der Lage war, die Hyperreagibilität zu unterdrücken. In ähnlicher Weise war hierzu auch die konventionelle Immuntherapie mit dem spezifischen Allergen in der Lage. Die Gruppe, die mit ISS in wäßriger Kontrollösung behandelt wurde (ISS+OVA_{H2O}) zeigte hingegen

wie die unbehandelte Kontrolle (OVA-NIL) eine deutliche Hyperreagibilität im Vergleich zu den nichtsensibilisierten Negativkontrollen (NIL-NIL).

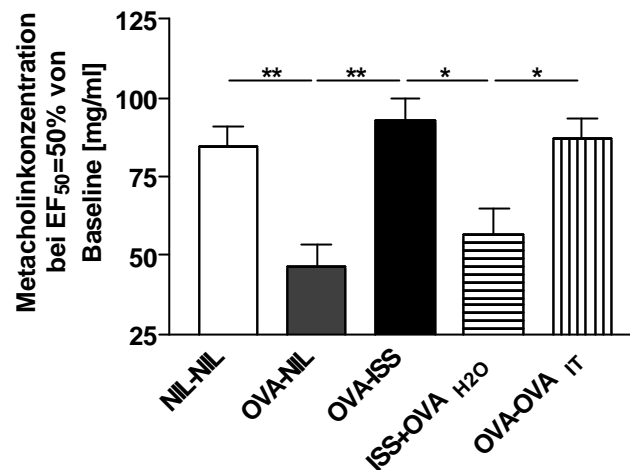


Abbildung 16: Messung der bronchialen Hyperreagibilität mittels Head-Out Body-Plethysmographie

Am Tag 55 der dritten Experimentalserie wurden die Tiere aller Gruppen mittels der Head-Out Body-Plethysmographie auf die Entwicklung bronchialer Hyperreagibilität (AHR) hin untersucht. Zu diesem Zweck wurde der EF_{50} -Wert als Maß für die Bronchoobstruktion erfaßt und diejenige Konzentration des Bronchokonstriktors Metacholin (MCh) berechnet, bei der der EF_{50} -Wert unter 50% des Baseline-Wertes gefallen war. Das Diagramm zeigt Mittelwerte \pm SEM, dabei gilt für die Signifikanzniveaus $p \leq 0,05$ * in Abb., $p \leq 0,01$ ** in Abb. und $p \leq 0,001$ *** in Abb..

Sowohl die Immuntherapie mit ISS-Adsorbat, als auch die „klassische“ Hyposensibilisierungstherapie sind also in der Lage, den Phänotyp „bronchiale Hyperreagibilität“ positiv zu beeinflussen.

4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der am Mausmodell durchgeführten Untersuchungen mit immunstimulatorischen DNA-Sequenzen (ISS) lassen sich für die unterschiedlichen Ansätze wie folgt zusammenfassen.

4.1 Die ISS-Prophylaxe

- Bei den Immunglobulinen zeigt sich unter ISS-Gabe die stärkste Steigerung aller Ig-Titer gegenüber dem Zeitpunkt vor der Behandlung. Dieser Effekt ist bei den „allergieprotektiven“ IgG2a-Antikörpern am ausgeprägtesten.
- Die Zahl der freien Entzündungszellen in der BAL wird durch keine der prophylaktischen Behandlungsmethoden signifikant gesenkt.
- Die ISS-Prophylaxe verbessert entscheidend das histologische Bild im Sinne einer Unterdrückung des mononukleären Zellinfiltrats und der Becherzellmetaplasie im Lungengewebe. Dieser Effekt konnte durch semiquantitative Auswertung histologischer Präparate bestätigt werden.
- Die ISS-Behandlung ist in der Lage, die Entstehung bronchialer Hyperreagibilität zu verhindern. Das Kontroll-ISS zeigt diesen Effekt nicht.

4.2 Einfluß der Therapieform auf die etablierte Atemwegsentzündung

- Es bleibt festzustellen, daß die zu erwartenden Effekte einer „redirection“ vom anti-OVA IgG1 und anti-OVA IgE bestimmten Th2-Profil zum anti-OVA IgG2a betonten Th1-Profil in dieser Reinform unter keiner der durchgeführten Behandlungen zu beobachten waren. Der ausgeprägte Anstieg der anti-OVA IgG2a-Titer unter ISS-Immunbehandlung ist jedoch auch schon als Teilerfolg in diese Richtung

zu werten. Auch die Unterdrückung des Anstieges der anti-OVA IgG1-Titer durch die konventionelle Immuntherapie ist hochgradig erwünscht.

- Sowohl die ISS-Immunbehandlung als auch die konventionelle Immuntherapie lassen Effekte im Sinne einer Th1-Gewichtung erkennen. ISS verstärkt die IFN- γ -Produktion und die konventionelle Immuntherapie senkt die IL-4 und TNF- α Produktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (OVA-NIL). Beides für sich sind Effekte, die im Sinne einer „redirection“ erwünscht sind.
- ISS-Immunbehandlung und Kontroll-ISS (OVA-ISS_{ctrl}) sowie konventionelle Immuntherapie sind in der Lage, die Atemwegshyperreagibilität zu unterdrücken. Dies zeigte sich erwartungsgemäß in der unbehandelten Kontrollgruppe OVA-NIL nicht.

4.3 Die ISS-Therapie in der klinischen Situation

- Die ISS-Immunbehandlung ist in der Lage, die Titer der Th1-bezogenen Immunglobuline IgG2a positiv zu beeinflussen. Dieser Effekt trat ebenso ausgeprägt bei Applikation als wässrige Lösung ein. Die konventionelle Immuntherapie zeigte diese Wirkung schwächer ausgeprägt.
- Keine der drei Behandlungsformen hatte einen positiven Einfluß auf die Ausprägung der zellulären Infiltration in den Atemwegen.
- Die Zytokinproduktion nach P/I und OVA Restimulation wurde nicht maßgeblich beeinflusst. Lediglich die konventionelle IT vermochte IL-2, IL-4 und IL-5 signifikant zu senken.
- Die Messung intrazellulär akkumulierter Zytokine IFN- α und IL-10 erbrachte keinen Hinweis auf eine Veränderung in den Behandlungsgruppen gegenüber der unbehandelten Kontrolle.
- ISS und konventionelle IT unterdrücken die bronchiale Hyperreagibilität als wichtigen Parameter der Pathophysiologie des Asthma bronchiale.

Im Sinne der Fragestellung kann also festgehalten werden, daß

1. eine Prophylaxe mit ISS den allergisch-asthmatischen Phänotyp positiv beeinflusst.
2. nach etablierter Atemwegsentzündung sowohl ISS-Immunbehandlung als auch konventionelle Immuntherapie Effekte im Hinblick auf eine Verlagerung von einer Th2-Immunantwort hin zu einer Th1-Immunantwort zeigen.
3. auch eine Therapie mit ISS vergleichbar mit der konventionellen Immuntherapie den Verlauf eines allergischen Asthma im Mausmodell positiv beeinflusst.

Die Anfangs aufgestellten Hypothesen finden sich also bestätigt, was aus diesem Modell weitläufige Möglichkeiten zur klinischen Erprobung einer ISS-Immuntherapie erwachsen läßt.

DISKUSSION

1 Von der „Hygiene-Hypothese“ zur Allergie-Impfung – CpG-Motive in der Allergieprävention

Allergien werden als fehlgeleitete Reaktion des Immunsystems gegen ansonsten harmlose Antigene verstanden. Dieser Reaktion liegt eine T-Zell Antwort vom Typ 2 zugrunde. Th2 Zellen spielen die zentrale Rolle in der allergischen Sensibilisierung und Entzündung. Es ist seit langem bekannt, daß eine Th1-Immunantwort die T-Zell Antwort vom Typ 2 gegenreguliert. Bakterielle Expositionen, die eine Th1-dominante Immunantwort auslösen, scheinen in diesem Zusammenhang protektiv zu wirken.

Diese „Hygiene-Hypothese“ entwickelte sich aus den Beobachtungen von Strachan 1989, der einen inversen Zusammenhang zwischen Heuschnupfen und Anzahl der Geschwister in Familien beschrieb (Strachan 2000)¹²⁷. Diese Beobachtung schrieb er einer stärkeren bakteriellen Exposition in größeren Familien zu. Daraufhin richtete sich das Interesse verstärkt auf die Einflüsse nicht-pathologischer bakterieller Stimulationen auf die Entwicklung allergischer Erkrankungen. Björkstén fand, daß die frühe Besiedlung des Darmes mit physiologischen *Lactobacillus* Spezies in den ersten Lebensmonaten mit einer niedrigeren Allergieprävalenz bei Kindern einher geht (Björkstén 1999)¹²⁸. Die Wirkung sowohl atenuierter –aber lebender– Bakterien (Herz 1998)¹²⁹, als auch die von abgetöteten (Zuany-Amorim 2002)¹³⁰ Erregern auf die Entstehung und Ausprägung allergischer Erkrankungen wurde in der Folge intensiv untersucht. Die beobachteten Wirkungen konnten schließlich einzelnen Bakterienbestandteilen zugeschrieben werden, darunter Teile der bakteriellen DNA. Die 1994 von Yamamoto beschriebenen Palindrome aus der DNA von *Mycobacterium bovis* konnten für eine Reihe von anti-allergischen Effekten verantwortlich gemacht werden (Yamamoto 1994)¹³¹. Die im wörtlichen Sinne zentrale Rolle spielt hier ein CpG-Motiv. Synthetische Oligodeoxynukleotide mit zentralen CpG Motiven lassen sich in großen Mengen herstellen und deren Wirkung auf allergische Erkrankungen untersuchen. Entscheidend für diese Wirkung ist der Methylierungsgrad der Nukleotide. Die im Vertebraten-Genom viel selteneren CpG-Motive sind im Gegensatz zu denen der

Bakterien und Viren methyliert und lösen keine lymphozytäre Immunreaktion aus (Heeg 2000)¹³²,(Krieg 2000)¹³³.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, ob bakterielle Stimuli in Form von CpG-Motiven gekoppelt an das Allergen (ISS-OVA Adsorbat) in der Lage sind, die allergische Immunantwort in einem Mausmodell zu unterdrücken. Dies wurde im Hinblick auf die Effektivität in unterschiedlichen Behandlungsprotokollen auf den zwei Ebenen „Prophylaxe“ und „Therapie“ untersucht.

Beim Umgang mit allergischen Erkrankungen unterscheidet die AAAAI gemäß einem Konsensuspapier aus dem Allergy Report (www.aaaai.org/ar/working_voll/044.asp) drei Ebenen der Prävention. Während bei der primären Prävention bereits die Sensibilisierung verhindert werden soll, sucht die sekundäre, die Manifestation der Erkrankung trotz Sensibilisierung zu unterdrücken. Bei der tertiären Prävention geht es um die Kontrolle der Faktoren, die Symptome auslösen können. Entsprechend dieser Richtlinie haben wir schrittweise unser Modell zur Erforschung der ISS-Wirkungen auf den allergischen Phänotyp entwickelt.

Der prophylaktische Ansatz der vorliegenden Arbeit mit einem ISS-OVA Adsorbat ist im Sinne der sekundären Prävention gegenüber Kontrolltieren wirksam. Die Behandlung fand *vor* der künstlichen Auslösung der Symptome statt. Die Entstehung bronchialer Hyperreagibilität wird effektiv verhindert, die IgG2a Antikörperproduktion stimuliert und das histologische Bild der Lungen verbessert.

Nach etablierter Atemwegsentzündung -also *nach* der künstlichen Auslösung der Symptome- zeigten sowohl das Adsorbat als auch das Allergen in hohen Dosen positive Effekte im Sinne einer Th2-Verdrängung bzw. Th1-Stärkung.

Insbesondere der therapeutische Einsatz des CpG-Adsorbats führte zu einer deutlichen Besserung allergiespezifischer Parameter. Durch die Wahl des Behandlungszeitpunktes *zwischen* den Symptomprovokationen kommt dieser sekundäre Präventionsansatz einer klinischen Situation sehr nahe. Die bronchiale Hyperreagibilität wurde unterdrückt, die IgG2a-Stärkung konnte therapeutisch bestätigt werden und auch auf Zytokinebene zeigten sich proinflammatorische Signale im Sinne einer Th1-Immunantwort.

Im Vergleich der ISS-Adsorbat Behandlung mit der konventionellen Immuntherapie durch hohe Allergendosen fanden sich insbesondere auf Ebene der humoralen

Parameter bemerkenswerte Unterschiede sowohl in Qualität, also auch in Quantität der Effekte, was auf die unterschiedlichen Wirkprinzipien der beiden Behandlungsformen zurückzuführen ist (Th1-Induktion versus Toleranz).

Aus dem vorliegenden Modell ergeben sich vielfältige Möglichkeiten für weitergehende Erforschung der zugrundeliegenden Mechanismen, sowie interessante Ausblicke auf einen möglichen Einsatz des Adsorbats in der Therapie des allergischen Asthma beim Menschen.

2 Primäre Prävention – ein erfolgreicher Ansatz hat seine Grenzen

Die „Hygiene-Hypothese“ schuf den Boden für neue Ansätze zur Allergiebehandlung.

Die Annahme, daß die Verringerung bakterieller Expositionen für die steigende Inzidenz allergischer Erkrankungen verantwortlich sein könnte, begründete die Hoffnung auf eine Verhinderung der allergischen Sensibilisierung durch artifizielle bakterielle Stimuli.

Der von Shirakawa 1997 beobachtete inverse Zusammenhang zwischen Reaktion auf einen Tuberkulin-Test und der Häufigkeit allergischer Erkrankungen bei Kindern führte zur Erforschung einer möglichen „Allergie-Impfung“ mit Mycobakterium Bovis (Shirakawa 1997)¹³⁴.

Sowohl Erb (Erb 1998)¹³⁵, als auch Herz (Herz 1998)¹³⁶ nahmen sich 1998 dieser Frage an und benutzten für ihre Studien handelsüblichen BCG-Impfstoff, der komplette, atenuierte Mycobakterien enthält. Parallel zur allergischen Sensibilisierung verabreicht, war diese „Allergie-Impfung“ in der Lage, Bildung spezifischer IgE zu unterdrücken. Auch andere beobachtete Effekte waren vielversprechend, mußten aber zunächst noch einer- oder mehreren bakteriellen Strukturen zugeordnet werden. Die zur erwünschten anti-allergischen Wirkung benötigten Bakterienmengen bergen jedoch im klinischen Einsatz das Risiko einer unerwünschten pathologischen Immunreaktion. Agenzien mit größerer immunogener Potenz und gleichzeitig geringerer Pathogenität wären also wünschenswert. Sowohl Oberflächenantigene gramnegativer Bakterien wie LPS, als auch bakterielle DNA, oder deren Bestandteile kommen als potentielle Kandidaten in Frage. Erstere wurden von Vannier 1991 und 2000 von Tulic für die Verdrängung der entzündlichen Bronchokonstriktion nach Allergen-Challenge verantwortlich gemacht (Vannier 1991)¹³⁷, (Tulic 2000)¹³⁸. Die protektive Wirkung der LPS entfaltet sich nur bei

Exposition *vor* Sensibilisierung. Erfolgt die LPS-Exposition *nach* Sensibilisierung, so birgt sie die Gefahr des TNF- α -vermittelten „toxischen Schocks“.

Raz zeigte 1996, daß virale plasmid-DNA in BALB/c Mäusen eine Th1-Immunantwort auslöst, sowie allergenspezifische IgE-Produktion inhibiert (Raz 1996)¹³⁹.

In vitro-Versuche mit immunstimulierenden DNA Sequenzen, wie sie von Krieg 1995 durchgeführt wurden, enthüllten das enorme Potential der synthetischen CpG-Motive, eine Immunreaktion vom Th1-Typ zu etablieren. Diese Hinweise machten Hoffnung auf einen möglichen Einsatz der CpG-Motive in der Allergieprävention (Krieg 1995)¹⁴⁰. Peng konnte zeigen, daß bereits eine einzelne CpG Dosis in der Lage war, die Entstehung allergenspezifischer IgE im Mausmodell zu verhindern (Peng 2001)¹⁴¹.

Wenn auch die beschriebenen Konzepte erfolgreich die allergische Sensibilisierung unterdrückten, so hat diese beim Allergiker in der Regel längst stattgefunden. Behandlungsmöglichkeiten im Sinne einer sekundären Prävention nach dem Konzept der AAAAI wären also erstrebenswert.

3 Allergie-Prophylaxe mit CpG – Ein Ansatz zur sekundären Prävention

Die stetig steigende Inzidenz und damit gesundheitsökonomische Relevanz allergischer Erkrankungen, und insbesondere des Asthma gibt genug Anlaß zur Suche nach präventiven Behandlungsformen. Dabei werden unterschiedliche Ansätze verfolgt.

Die Behandlung des allergischen Asthma beschränkt sich im Gros auf die Dämpfung der Symptomatik mittels Steroiden und β -Sympathomimetika. Einziger potentiell kurativer Ansatz, der sich klinisch bewährt ist bisher die Spezifische Immuntherapie (SIT) mit ansteigenden Dosen des verantwortlichen Allergens (Abramson 2000)¹⁴². Dieses Prinzip ist bereits seit 1911 mit Allergenextrakten angewandt worden. Eine hohe Versagerquote und die potentiell lebensbedrohlichen Nebenwirkungen gerade bei ohnehin ernsteren Allergieformen wie den Lebensmittelallergien und dem allergischen Asthma fordern alternative Wege oder zumindest eine Verbesserung von Sicherheit und Wirksamkeit der konventionellen SIT (Creticos 1997)¹⁴³, (Nelson 1997)¹⁴⁴.

Bei erfolgreichen SIT-Behandlungen wurde eine verminderte Proliferation allergenspezifischer T-Zellen, eine Verkleinerung des Verhältnisses der IL-4, IL-5 oder IL-13 Produktion relativ zu der von IFN- γ , sowie ein Anstieg des Verhältnis von allergenspezifischen IgG4 zu IgE zu beobachtet (Gabrielsson 2001)¹⁴⁵. Die verstärkte

Produktion von IL-10 durch regulatorische T-Zellen wird bei der SIT für die Vermittlung von Toleranz gegenüber aero gener Allergenexposition verantwortlich gemacht (Akdis 2001)¹⁴⁶,(Akbari 2001)¹⁴⁷.

Zur Verbesserung der konventionellen Immuntherapie, liegt die Anwendung Immunstimulierender Agenzien wie Bakterien und CpG als Adjuvans oder gar als eigenständiger Ansatz nahe (Davis 2000)¹⁴⁸,(Horner 1998)¹⁴⁹. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, daß Extrakte aus abgetötetem *Mycobacterium vaccae*, *Listerien* und *Lactobacillus* in der Lage sind, die allergiespezifische IgE-Produktion zu unterdrücken (Wang 1998)¹⁵⁰,(Yeung 1998)¹⁵¹,(Murosaki)¹⁵². Nach neueren Erkenntnissen scheint auch hier eher eine von regulatorischen T-Zellen abhängige Toleranz für die anti-allergischen Effekte verantwortlich zu sein, als die bisher angenommene Th1-Immunantwort. IL-10- und TGF- β -vermitteln allem Anschein nach auch hier die Effekte (Zuany-Amorim 2002)¹⁵³.

Wenn auch IL-10 ein potenter Inhibitor unterschiedlicher Funktionen von T-Zellen und APC ist (Moore 2001)¹⁵⁴, so kann es doch die allergische Atemwegshyperreagibilität und sogar die Eosinophilie in Allergiemodellen fördern (Makela 2000)¹⁵⁵,(Justice 2001)¹⁵⁶,(Yang 2000)¹⁵⁷. Immunstimulatorische Oligodeoxynukleotide mit zentralem CpG-Motiv vermitteln eine robuste Th1-Immunantwort. Diese wird u.a. charakterisiert durch Expression von IL-12, IL-18 und IFN- γ und scheint die Nachteile einer potentiellen pro-allergischen Komponente nicht zu bergen (Horner 2001)¹⁵⁸. Ganz im Gegenteil: Als Prophylaxe gegen allergische Erkrankungen haben sich CpG in einigen Studien, wie bei Broide (Broide 1998)¹⁵⁹, Kline (Kline 1998)¹⁶⁰ und Sur (Sur 1998)¹⁶¹ als potente Th1-Stimuli und Allergieinhibitoren bewährt (s.u.).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die prophylaktische Gabe der ISS vor Auslösung der Symptome durch Allergen-Challenge in der Lage war, die Entstehung des allergischen Phänotyps zu verhindern. Dies beinhaltete insbesondere die Atemwegshyperreagibilität und stellt somit eine Verbesserung auf Funktioneller Ebene dar. Die CpG-Immunbehandlung mußte also in der Lage gewesen sein, ein Signal im Sinne einer Th1-Immunantwort zu geben.

Zwei getrennte Mechanismen werden für die Entstehung einer AHR verantwortlich gemacht. Einerseits ein Effekt, der durch Interaktion allergenspezifischer IgE- bzw. IgG1 Antikörper mit dem Allergen hervorgerufen wird, andererseits ein entzündungsabhängiger Mechanismus, der maßgeblich auf die Eosinophilen

zurückzuführen ist (Herz 1998)¹¹⁷. In der Vorliegenden Arbeit war die Zahl der freien Eosinophilen in der BAL durch ISS nicht signifikant gesenkt worden. Dies konnte also nicht zur Verhinderung der AHR beigetragen haben. Die Titer der allergenspezifischen Immunglobuline G1 und E waren ebenfalls nicht im Sinne der zu erwartenden Th1-Modulation gesenkt. Vielmehr fand sich ein Effekt auf die allergenspezifischen B-Zellen der sowohl für eine Th2-abhängige Aktivierung spricht (IgG1/IgE) als auch für eine gleichzeitige Th1-abhängige Schiene der B-Zell Aktivierung (IgG2a). Weder die Verringerung der Eosinophilie, noch ein IgG1/IgE abhängiger Prozeß konnten also für die Unterdrückung der AHR alleine verantwortlich sein. Hieraus kann gefolgert werden, daß neben den beschriebenen Mechanismen der AHR-Entstehung noch mindestens ein weiterer existiert, der durch die hier durchgeführte ISS-Immunbehandlung effektiv unterdrückt wurde. Diese Hypothese wird gestützt durch die Untersuchungen von Wilder, die zeigen konnte, daß die Entstehung einer AHR tatsächlich nicht zwingend an eine Atemwegseosinophilie und/oder eine Erhöhung der allergenspezifischen IgE Level gebunden ist, sondern vielmehr einer genetisch determinierten Reaktionsbereitschaft auf Sensibilisierung und anschließende Rechallenge unterliegt (Wilder 1999)¹⁶².

Die Wirkung der CpG-Sequenzen als eine Art isolierter bakterieller Th1-Stimulus ist prinzipiell über zwei Wege denkbar:

1. Entweder der CpG-Stimulus nimmt direkt Einfluß auf die Ausbildung der DC-Subpopulationen. Es entsteht der DC-1 Typ, was dazu führt, daß ein zweiter Stimulus in Form des Allergens nicht in einer Th2-Immunantwort resultiert, oder
2. Der CpG-Stimulus auf die DC über IL-12 und IFN- γ führt zur indirekten Stimulation einer Immunantwort vom Typ 1, die ihrerseits bei Allergenstimulation über IFN- γ eine Th2-Immunantwort antagonisiert.

Siehe hierzu **Abb.17**

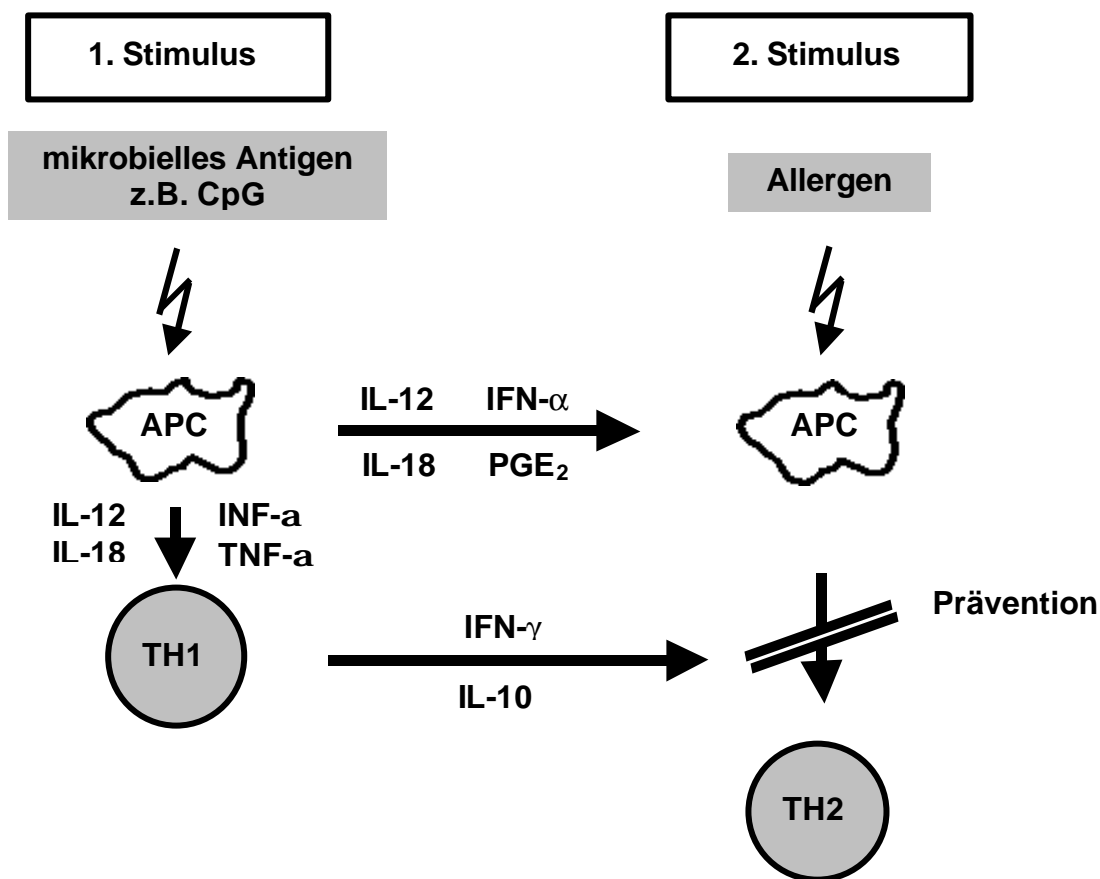


Abbildung 17: Konzept der Wirkung von CpG-Motiven auf die Entwicklung des allergischen Phänotyps

Wie weiter oben erwähnt haben u.a. Broide (Broide 1998)¹⁶³, Kline (Kline 1998)¹⁶⁴ und Sur (Sur 1998)¹⁶⁵ CpG in prophylaktischen Ansätzen untersucht. Je nach Versuchsaufbau und Applikationsform sind unterschiedliche Mechanismen für die CpG Wirkungen anzunehmen. So postuliert Broide drei Mechanismen zur Unterdrückung der Atemwegseosinophilie. Einmal via Zytokinproduktion der T-Zellen, zum anderen über das Recruitment der Eosinophilen. Diese beiden Mechanismen werden bei Broide der „innate-immunity“ zugesprochen. Den dritten Mechanismus –die Generation einer allergenspezifischen Th1-Immunantwort– schreibt er als langanhaltenden Prozeß einer Modulation der „adaptive-immunity“ auf Ebene der T-Zell Reifung zu (Th0-Th1/2).

Die Resultate der vorliegenden Arbeit stützen die letztgenannte Hypothese, zumal danach die Eosinophilie der Atemwege nicht als alleiniger Indikator für die Wirkung der CpG angesehen werden kann. Vielmehr sprechen die Erkenntnisse einer eosinophilenunabhängigen Regulation der Atemwegshyperreagibilität und die Stärkung

der Th1-abhängigen IgG2a Antikörper für einen Mechanismus, der zumindest in der Endstrecke über die „adaptive-immunity“ die Wirkung der CpG entfaltet.

Dies wird auch durch die Studie von Sur gestützt, der in seinen Untersuchungen Langzeiteffekte der CpG in einem Mausmodell auf ein IFN- γ und IL-12 abhängiges „Th1-Gedächtnis“ zurückführt. Sur konnte jedoch keine Steigerung der CpG-Effekte beobachten, wenn sie zusammen mit dem spezifischen Allergen appliziert wurden. Dies führt er auf getrennte Mechanismen für die Wirkungen von Allergen und CpG auf das Immunsystem zurück. Den schnellen Weg des Allergens über das angeborene IS, und den langsamen Wirkungsweg der CpG über den Schenkel der erworbenen Immunität. Sur fand keine Effekte auf die Atemwegseosinophilie, wenn die CpG intratracheal appliziert wurden, Shirota hingegen sah eine Reduktion der Eosinophilie, wenn die CpG zusammen mit dem Allergen appliziert wurden (Shirota 2000)¹⁶⁶. Ob es sich hier um einen ISS-vermittelten Effekt, oder nur um eine Induktion von Toleranz durch das Antigen handelt, bleibt in dieser Studie unbeantwortet.

In der Vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein Adsorbat zur Immunmodulation verwandt, in dem das spezifische Allergen, das Adjuvans Aluminiumhydroxid sowie das CpG-Motiv nicht-kovalent gekoppelt sind (siehe Material und Methoden). Diese Verbindung ist von entscheidender Bedeutung für den Mechanismus der Immunmodulation durch dieses Adsorbat. Vor der Erkennung der CpG-Motive durch APZ, die -wie in der Einleitung beschrieben- intrazellulär am Toll-like Rezeptor 9 geschieht, ist eine Aufnahme des Adsorbatkomplexes in die Zelle notwendig. Hierfür ist die Endozytose des Komplexes verantwortlich. Dies führt nun zur Überlegung, daß ein und dieselbe Zelle möglicherweise durch das Adsorbat auf zwei unterschiedlichen Wegen aktiviert wird. Einerseits durch das CpG-Motiv nach Endozytose und entsprechenden Reifungsprozessen über die Stimulation des TLR-9 Rezeptors und konsekutiver Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, andererseits aber auch schon vor Aufnahme in die Zelle über membranständige Rezeptoren, die das Allergen erkennen. Dies könnte eine Erklärungsansatz für unterschiedliche Wirkungen des CpG-Adsorbats auf „innate-“ und „adaptiv-immunity“ in der vorliegenden Arbeit sein.

Eine alleinige Gabe des Allergens bietet demnach die Möglichkeit den letztgenannten Mechanismus und dessen Wirkungen von dem des Adsorbats mit seiner komplexeren Wirkungsweise zu differenzieren. Dies geschah in der Weise im zweiten Schritt der

Vorliegenden Arbeit, als zur CpG-Immunbehandlung die „klassische“ Immuntherapie eingesetzt als Kontrolle hinzu kam.

4 Die Wirkung der ISS bei bestehender Atemwegsentzündung

Unter der Bedingung einer bereits etablierten Atemwegsentzündung im nächsten Schritt der vorliegenden Arbeit fand sich die Wirkung der ISS in Bezug auf die Immunglobuline und AHR bestätigt. Das Besondere an dieser Situation war, daß die bereits etablierte Th2-Immunantwort zurückgedrängt wurde. Zimmermann hat eine solche Umkehr einer etablierten Th2-Immunantwort durch CpG bereits für die sonst letal verlaufende Leishmaniose im Mausmodell beschrieben (Zimmermann 1998)¹⁶⁷. Die Wirkung auf eine etablierte Atemwegsentzündung in einem Mausmodell für allergisches Asthma, wie sie hier für das CpG-Adsorbat untersucht wurde, wurde erstmals von Serebrisky im Jahre 2000 beschrieben (Serebrisky 2000)¹⁶⁸. In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, daß die IgG2a Antikörper als Markerglobuline der Th1-Immunantwort unter ISS ansteigen. Auch die Entwicklung der Atemwegshyperreagibilität wurde trotz Entzündung verhindert. Die IgG1 und IgE Antikörperproduktion konnte allerdings durch das ISS-Adsorbat nicht signifikant gesenkt werden, wenn auch die ISS-Gruppe tendenziell beim IgE dafür Anzeichen erkennen ließ. Dies stärkt die Annahme, daß neben einer fortbestehenden, durch Sensibilisierung und Challenge etablierten Th2-Immunantwort, das Adsorbat eher in der Lage ist, über Mechanismen der „adaptive-immunity“ eine parallele Th1-Immunantwort zu etablieren, als ein Th2-Profil vollständig zu beseitigen. Dies bestätigt sich auch bei den Zytokinen, wo ISS zwar in der Lage war, die Level des Th1-Markerzytokins IFN- γ signifikant gegenüber der Kontrollgruppe zu heben, die Th2-Zytokine IL-4, IL-10 und TNF- α aber nicht zu senken vermochte. IL-4 ist für den Immunglobulinklassenswitch zum IgE entscheidend, so daß unverändert hohe IgE-Titer durchaus mit nicht-gesenkten IL-4 Pegeln zusammenpassen.

Unter der Bedingung einer bereits etablierten Th2-Immunantwort fanden sich in der vorliegenden Arbeit also persistierend hohe Titer für allergenspezifisches IgG1 und IgE parallel zu erhöhten IgG2a Titern. Unter ganz ähnlichen Bedingungen konnte Peng dieses Ergebnis bestätigen (Peng 2001)¹⁶⁹. Er untersuchte CpG-Effekte sowohl auf die Ausprägung der IgE Titer, wenn sie vor Sensibilisierung verabreicht wurden, als auch

nach etablierter Th2-Immunantwort. Dabei kam als Immunmodulator eine Mischung aus dem spezifischen Allergen und einem synthetischen CpG zum Einsatz. Deutlich konnte er zeigen, daß selbst wiederholte CpG Behandlungen nicht in der Lage waren, etablierte IgE und IgG1 Level zu senken. In Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit wies Peng dasselbe auch für ein Modell mit OVA in C57BL/6 Mäusen nach.

Diesem Phänomen liegt wahrscheinlich zugrunde, daß zum Zeitpunkt der ISS-Immunmodulation etwa 4 Wochen nach erfolgter Sensibilisierung bereits sekretorische B-Zellen im Knochenmark ansässig geworden sind, wo sich ihre IgE-Produktion refraktär gegenüber späteren Th1-Stimuli fortsetzt. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, daß sich IgE-produzierende B-Zellen als resistent gegenüber exogenen Stimuli wie IL-4 und anti-CD40 Antikörpern erwiesen haben (Steinberger 1995)¹⁷⁰. In der Konsequenz heißt das, daß die durch CpG induzierte Th1-Immunantwort nicht in der Lage ist, eine etablierte IgE Produktion zu unterdrücken. Dies wird ebenfalls durch eine Studie von Randolph gestützt, bei der passiv transferierte Th1 Zellen in vivo nicht in der Lage waren, eine Th2-Immunantwort effektiv zu unterdrücken (Randolph 1999)¹⁷¹.

Im Hinblick auf die erfolgreiche Behandlung der AHR in diesem Modell sowohl durch ISS-Adsorbat, als auch durch die konventionelle Immuntherapie muß angenommen werden, daß hier unterschiedliche Mechanismen zum tragen kommen. Unter Therapie mit dem Allergen, die mit dem Adjuvans Aluminiumhydroxid durchgeführt wurde, konnten die Zytokine IL-4 und TNF- α signifikant gesenkt werden. Dies resultierte allerdings ebenfalls nicht in einer Senkung der IgE Titer. Hier wurde aber ein Anstieg der IgG1, wie der unter ISS-Therapie zu beobachten war, nicht festgestellt. Dies steht im Einklang mit der Literatur, wo unterschiedliche Wege der Regulation antigenspezifischer IgE bzw. IgG1 sowohl in vitro (Snapper 1988)¹⁷², wie auch in vivo (HayGlass 1991)¹⁷³, (Van Halteren 1997)¹⁷⁴ beschrieben sind. Unter ISS-Immunbehandlung ist folglich möglicherweise eine Toleranzinduktion viel mehr als eine aktive Suppression der Th2-Antwort anzunehmen, wie sie durch die konventionelle Immuntherapie ausgelöst wird. Um die Wirkungen von ISS-Immunbehandlung und konventioneller Immuntherapie in einer kliniknahen Situation beurteilen zu können, wurde im dritten Schritt der vorliegenden Arbeit ein Mausmodell zur Therapie des allergischen Asthma entwickelt.

Was unter kontrollierten Versuchsbedingungen als zeitliche Abfolge von Sensibilisierung, Challenge und Immuntherapie eingehalten werden kann, hat mit der

klinischen Situation eines Allergikers mit wiederholten Allergenexpositionen unter einer Therapie wenig gemein. Ein weitergehendes Modell war also nötig.

5 Die Wirkung der ISS in der klinischen Situation

Wie in den Abschnitten 1 und 2 beschrieben, finden sich in der Literatur zahlreiche Modelle für eine ISS-Immunbehandlung im Sinne einer Prophylaxe, sowie unter etablierter Atemwegsentzündung. Modelle, die der klinischen Situation geprägt von repetitiver Allergenexposition und wiederholten Asthmaattacken nahe kommen, sind dünn gesät.

Kline entwickelte erstmals 2002 ein der vorliegenden Arbeit ähnliches Modell, in dem er der Immuntherapie mit Allergen und CpG nach etablierter Atemwegsentzündung durch Allergen-Challenge weitere Challenges folgen ließ (Kline 2002)¹⁷⁵. Erst nach dieser neuerlich provozierten Immunantwort führte er die Analysen durch. Kline setzte in seinem Modell eine Kombination von Allergen und ISS neben der einfachen Gabe von nur OVA bzw. nur CpG ein. Dabei kam er zu dem Ergebnis, daß grade die Kombination von spezifischem Allergen und CpG am eindrucksvollsten in der Lage waren, die Th2-Immunantwort auf Rechallenge zu unterbinden. Shirota untersuchte die Rolle der Konjugation von CpG an das Antigen und fand, daß diese Konjugate effektiv die Entwicklung einer allergenspezifischen Entzündungsreaktion zu unterdrücken vermochten und daß dieser Effekt andauernd war (Shirota 2000)¹⁷⁶. Er stellte dabei fest, daß das Konjugat besser wirkte, als die Applikation von Allergen und CpG in Lösung.

Das in der vorliegenden Studie verwendete ISS-Adsorbat geht noch einen Schritt weiter, indem Allergen, CpG-Sequenzen und Adjuvans miteinander gekoppelt sind. Überraschend war nun aber, daß die von Shirota und Kline beobachteten Effekte im Sinne einer Umlenkung von Th2 nach Th1 in dieser Deutlichkeit nicht zu beobachten waren. So fand Kline im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit eine Reduktion der Atemwegseosinophilie, sowie eine Senkung der allergenspezifischen IgE Titer. Übereinstimmend fand auch er die Beseitigung der AHR. Ursachen für die abweichenden Beobachtungen insbesondere die Eosinophilie betreffend, kann die im hier vorliegenden Protokoll massiv ausgedehnte Allergen-Rechallenge sein (4 mal im Abstand von je 2 Tagen im Gegensatz zu zweimaliger Challenge an 2

aufeinanderfolgenden Tagen bei Kline). Des weiteren könnte die in unserem Modell durchgeführte Langzeitsensibilisierung mit dreimaliger intraperitonealer Injektion des Allergens mit Adjuvans eine stärkere und damit schwieriger zu antagonisierende Th2-Immunantwort ausgelöst haben, als dies bei Kline mit nur einer Injektion der Fall war. Dem Shirota-Protokoll ist zu entnehmen, daß er die CpG Behandlung sogar durchführte, als sich noch gar keine Eosinophilie in den Atemwegen der Versuchstiere hatte etablieren können. In der hier vorgelegten Studie sind die Bedingungen also ungleich schwieriger im Hinblick auf die Reversibilität der Th2-Immunreaktion. Unser Modell ist aber andererseits in Bezug auf eine fiktive klinische Situation eines Allergikers mit Asthma als das realistischere einzustufen.

Interessanterweise war unter den gewählten Bedingungen auch die ISS-Behandlung in wäßriger Lösung in der Lage, die Titer für IgG2a als indirekten Indikator einer Th1-Antwort signifikant zu heben. Für diesen Effekt scheint also die chemische Kopplung von ISS und Allergen hinreichend, aber nicht notwendig zu sein. Die Behandlung im Sinne der konventionellen Immuntherapie mit OVA und Adjuvans zeigte diesen Effekt aber wesentlich weniger ausgeprägt (einfache gegenüber dreifacher Signifikanz). Wie schon unter 2 beschrieben war diese jedoch in der Lage die Zytokine IL-4 und IL-5 zu senken, wie es für diese Art der konventionellen Immuntherapie mit Allergen vielfach in der Literatur beschrieben wurde (Secrist 1993)¹⁷⁷, (Jutel 1995)¹⁷⁸.

Für die ISS-Adsorbat- aber auch für die ISS- wäßrige Lösung finden sich also zusammenfassend jeweils Teilaspekte einer Th1-Stärkung und einer Th2-Schwächung. Das immunologische Bild, das die Resultate der vorliegenden Studie zeichnen, ist am ehesten mit der Hypothese zu vereinbaren, daß die Dichotomie der T-Zellsubpopulationen, wie sie in den letzten Jahren angenommen wurde, in einem komplexen Modell einer klinisch anmutenden Situation für allergisches Asthma in dieser Einfachheit nicht zu halten ist. Vielmehr stützen die Ergebnisse der vorliegenden Studie die These, daß sich Th1 und Th2 Zellen über ihre Effektorfunktionen nicht in jeder Situation wie Agonist und Antagonist verhalten. Dies konnte auch Hansen in einem T-Zell Transfer Modell zeigen, bei dem transferierte Th1 Zellen nicht in der Lage waren, eine etablierte Th2-Immunreaktion auf Allergen zu stoppen (Hansen 1998)¹⁷⁹. T-Zellen sind zwar scheinbar in der Lage die Entwicklung naiver T-Zellen zu Th2 Zellen zu blockieren. Ein wirkliches Umlenken von Th2 nach Th1 auf zellulärer Ebene scheint aber nicht möglich zu sein. Dies wird in der vorliegenden Arbeit durch die Beobachtung

bestätigt, daß auf zellulärer Ebene kein Switch der Zytokinproduktion von Th1 nach Th2 nachweisbar war.

Die Immuntherapie wird beim allergischen Asthma in ihrem Stellenwert unterschätzt. Dies mag an den gefürchteten Komplikationen, wie etwa der Anaphylaxie liegen, die bei Asthmatikern häufiger vorzukommen scheint, als beispielsweise bei Pollenallergikern (Lockey 1996)¹⁸⁰,(Reid 1993)¹⁸¹,(Umetsu 1985)¹⁸². Dennoch bietet die Immuntherapie auch heute noch die einzige Behandlungsmöglichkeit mit einer Chance auf Heilung der Erkrankung. Der Einsatz von ISS-Allergen-Adsorbaten zur Immuntherapie könnte in diesem Zusammenhang ein vielversprechender Ansatz sein. Auch im Bewußtsein der Schwächen von Tiermodellen für allergisches Asthma (OVA ist beispielsweise kein natürliches Allergen des Menschen) stellen sie doch eine -wenn nicht die einzige- Möglichkeit zur Weiterentwicklung innovativer Therapieformen dar. Das hier entwickelte Modell, welches der klinischen Situation eines Asthmaticus näher kommt, eröffnet somit die Möglichkeit zum weiteren Studium der ISS-Immuntherapie und kann für die Zukunft den vielen Patienten eine Hoffnung auf verbesserte Therapieformen geben.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Prävalenz und Inzidenz allergischer Erkrankungen haben in den industrialisierten Ländern in den vergangenen Jahrzehnten stetig zugenommen. Für die Entwicklung des allergischen Phänotyps sind genetische- und Umwelteinflüsse im weitesten Sinne verantwortlich. Die „Hygiene-Hypothese“ geht davon aus, daß mikrobielle Stimuli allergie-protektiv wirken. Insbesondere bakterielle Antigene und bakterielle DNA-Sequenzen mit einem zentralen, unmethylierten Cytosin/Guanin Motiv (CpG) konnten für immunostimulatorische Effekte im Sinne einer anti-allergischen Immunantwort (Th1) verantwortlich gemacht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob ein CpG-Allergen-Adsorbat (ISS) in der Lage ist, den allergischen (Th2-) Phänotyp im Sinne einer Th1-Protektion zu beeinflussen. Dazu wurde schrittweise ein Mausmodell etabliert, das die Beurteilung der ISS-Wirkung auf klinische und immunologische Parameter erlaubt.

In einem prophylaktischen Ansatz, bei dem die Behandlung vor der Auslösung der Allergiesymptome stattfand, ist ISS in der Lage, die Zahl der Entzündungszellen sowie die der mukusproduzierenden Becherzellen zu verringern, die Entstehung bronchialer Hyperreagibilität (AHR) zu unterdrücken und Th1-assoziierte IgG2a Antikörper zu stärken. Nach Auslösen der Symptome konnte die Wirksamkeit der CpG-Behandlung im Sinne einer sekundären Prävention erneut belegt werden. Die Sekretion des Th1-Leitzytokins IFN- γ wird erhöht. In einem Therapieansatz, der der klinischen Situation eines Allergikers mit Asthma nahe kommt, kann ISS die AHR unterdrücken und die IgG2a Titer anheben. Auf Zytokinebene wird ein Wechsel von Th2 nach Th1 nicht erreicht.

Die Ergebnisse zeigen, daß die ISS-Adsorbat-Immuntherapie einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung des allergischen Asthma darstellt, wenn auch die beobachteten Effekte nicht auf eine isolierte „Verdrängung“ einer Th2- durch eine Th1-Immunantwort zurückzuführen sind. Vielmehr scheinen sich die erwünschten Th1-Effekte parallel zur bestehenden Th2-Antwort zu entwickeln. Das hier vorgestellte Mausmodell bietet erstmals die Möglichkeit, Immunmodulationswirkungen in einer kliniknahen Situation zu untersuchen und eröffnet damit neue Perspektiven zur Erforschung dieses innovativen Therapiekonzeptes.

LITERATUR (nach Nummern)

- 1 Smith, D., Malone DC, Lawson KA, Okamoto LJ, Battista C, Saunders WB, 1997. *A nationale estimate of economic costs of asthma*. Am. J. Respir. Cirt. Care Med.; 165: 787-793
- 2 American Academy of Allergy and Immunology (AAAAI). *The Allergy Report: Science Based Findings on the Diagnosis & Tratment of Allergic Disorders*, 1996-2001
- 3 ISAAC, The International Study of Asthma and Allergies in Childhood, Steering Committee, 1998. *Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, alergic rhinoconjunctivitis and atopic eczema: ISAAC*. Lancet; 351: 1225-1232
- 4 NAEPP, N.A.E.a.P.P., 1999. National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) National Institutes of Health, USA.
- 5 Duhme, H., Weiland SK, Rudolph P, Wienke A, Kramer A und Keil U, 1998. *Asthma and allergies among children in West and East Germany: Acoparison between Münster ans Greifswald using ISAAC phase I protocol*. Eur. Respir. J.; 11: 840-847
- 6 Maziak, W., Behrens T, Brasky TM, Duhme H, Rzehak P, Weiland SK und Keil U, 2003. *Are asthma and allergies in children and adolescents increasing? Results from ISAAC phase I and phase III surveys in Münster, Germany*. Allergy; 58(7): 572-579
- 7 Skadhauge, A.; Christensen K, Kyvik KO und Sigesgaard T, 1999. *Genetic and environmental influence on asthma: a population-based study of 11 688 Danich twin pairs*. Eur. Respir. J.; 13: 8-14
- 8 Kulig, M., Bergmann R, Niggemann B, Burow G und Wahn U., 1998. *Predicion of sensitization to inhalant allergens in childhood: evaluating family history, atopic dermatitis and sensitization to food allergens*. Clin. Exp. All.; 28: 1397-1403
- 9 Marsh, D.G, Neely JD, Breazeale DR, et al., 1994. *Linkage analysis of IL-4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations*. Science; 264: 1152-1156
- 10 Mayers, D., Postma DS, Panhysen CI, et al., 1994. *Evidence for a locus regulating total serum IgE levels mapping to chromosome 5*. Genetics; 23: 464-470

- 11 Doull, I., Lawrence S, Watson m, et al., 1996. *Allelic association of gene markers on chromosome 5q and 11q with atopy and bronchial hyperresponsiveness.* Am. J. Respir. Crit. Care Med.; 153: 1280-1284
- 12 Daniels, S., Bhattachary S, James A, et al., 1996. *A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma.* Nature; **383**: 247-250
- 13 Moffatt, M., Schou C, Faux JA, et al., 2001. *Association between quantitative traits underlying asthma and the HLA-DRB1 locus in a family-based population sample.* Eur. J. Hum. Genet.; **9**: 341-346
- 14 Young, R., Dekker JW, Wordsworth BP, et al.; 1994. *HLA-DR and HLA-DP genotypes and immunoglobulin E responses to common major allergens.* Clin. Exp. All.; **24**: 431-439
- 15 Howard, T., Postma DS, Koppelman GH, et al.; 2002. *Fine mapping of an IgE-controlling gene on chromosome 2q: Analysis of CTLA4 and CD 28.* J. Allergy. Clin. Immunol.; **110**: 743-751.
- 16 Marsh, D.G., Hsu SH, Roebber M, Erlich E, Kautzky, Freidhoff LR, Meyers DA, Pollard MK und Bias WB, 1982. *HLA-Dw2: A genetic marker for humane immune response to short ragweed pollen allergen Ra5. I. Response resulting primarily from natural antigen exposure.* J. Exp. Med.; 155: 1439-1451
- 17 Duffy, D.L., Martin NG, Battisutta D, Hoffer JL und Mathews JD, 1990. *Genetics of asthma and hay fever in Australien twins.* Am. Rev. Respir. Dis.; 414: 1351-1358
- 18 Van Herwerden, L., Harrap SB, Wong ZYH, et al., 1995. *Linkage of high-affinity IgE receptor gene with bronchial hyperreactivity, even in absence of atopy.* Lancet; 346: 894-900
- 19 D'Amato, G., Liccardi G und D'Amato M, 2000. *Environmental risk factors (outdoor air pollution and climatic changes) and increased trend of respiratory allergy.* J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.; 10: 123-128
- 20 Bråbäck, L.A., Breborowicz K, Julge K, Knutsson A, Riikjarv Ma, Vasar M und Bjorksten B, 1995. *Risc factors for respiratory symptoms and atopic sensitization in the baltic area.* Arch. Dis. Child.; 72: 487-493
- 21 Von Mutius, E., Fritsch C, Weiland SK, Roll G und Magnussen H, 1992. *Prevalence of asthma and allergic disorders among children in united Germany: a descriptive comparison.* B.M.J.; 305: 1395-1399

- 22 Von Mutius, E., Weiland SK, Fritzsich C, Duhme H und Keil U, 1998. *Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East germany*. Lancet; 351 (9106): 862-866
- 23 Black, P. und Sharpe S, 1997. *Dietary fat and asthma: is there a connection?* Eur. Respir. J. ; **10**: 6-12
- 24 Fogarty, A., Lewis S, Weiss S und Britton J, 2000. *Dietary vitamin E, IgE concentrations and atopy*. Lancet; **356**: 1573-1574
- 25 Wahn, U., Lau S, Bergmann R, et al., 1997. *Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during first three years of life*. J. Allergy Clin. Immunol.; 99: 763-769
- 26 Strachan, D.P., Harkins LS, Golding J, 1997. *Sibship size and self-reported inhalant allergy among adult woman*. Clin. Exp. All.; 27: 151-155
- 27 Von Mutius, E., Martinez FD, Fritzsich C, Nicolai T, Reitmeir P und Thiemann HH, 1994. *Skin test reactivity and number of siblings*. B.M.J; 308: 692-695
- 28 Heinrich, J., Popescu M, Wjst M, Goldstein I und Wichmann HE, 1998. *Atopy in children and parental social class*. Am. J. Public Health; 88: 1319-1324
- 29 Krämer, U., Heinrich J, Wjst M und Wichmann HE, 1999. *Age of entry to day nursery and allergy in later childhood*. Lancet; **353**: 450-454
- 30 Ball, T.M., Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martinez FD and Wright AL, 2000. *Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood*. N. Engl. J. Med.; 343: 538-543
- 31 Wickmann, E. G., Egmar AC, Axelsson G und Pershagen G, 1994. *Reduced mite allergen levels in dwellings with mechanical exhaust and supply ventilation*. Clin. Exp. All.; **24**: 1164-1168
- 32 Strachan, D., 1989. *Hay fever, hygiene and household size*. B.M.J.; 299: 1259-1260
- 33 Strachan, D.P., 2000. *Family size, infection and atopy: the first decade of the „hygiene hypothesis“*. Thorax; 55: Suppl. 1: S2-S10
- 34 Rook, G., Stanford JL, 1998. *Give us this day our daily germs*. Immunol. Today; 19: 113-116

- 35 Von Mutius E., Martinez FD, Fritzscher C, Nicolai T, Roell G und Thiemann HH, 1994. *Prevalence of asthma and atopy in two areas of East and West Germany*. Am. J. Respir. Crit. Care. Med.; 149: 358-364.
- 36 Martinez, F.D., 1994. *Role of viral infections in the inception of asthma and allergies during childhood: could they be protective?* Thorax; 49: 1189-1191
- 37 Shaheen, S.O., Aaby P, Hall AJ, Barker DJP, Heyes CB, Shiell AW und Goudaby A, 1996. *Measles and atopy in Guinea-Bissau*. Lancet; 347: 1792-1796
- 38 Shirakawa, T., Enomoto T, Shimazu SI, und Hopkin JM, 1997. *Inverse association between tuberculin responses and atopic disorder*. Science; 275: 77-79
- 39 Herz, U., Gerold K, Grüber C, Braun A, Wahn U, Renz H und Paul K, 1998. *BCG infection suppresses allergic sensitization and development of increased airway reactivity in an animal model*. J. Allergy Clin. Immunol.; 14: 867-874
- 40 Anderson, H.R., 1978. *Respiratory abnormalities in Papua New Guinea children: the effects of locality and domestic wood smoke pollution*. Internat. J. Epidemiol.; 7: 63-72
- 41 Von Mutius E., Martinez FD, Fritzscher C, Nicolai T, Roell G und Thiemann HH, 1994. *Prevalence of asthma and atopy in two areas of East and West Germany*. Am. J. Respir. Crit. Care. Med.; 149: 358-364.
- 42 Björkstén, B., Naaber P, Sepp E, Mikelsaar M, 1999. *The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children*. Clin. Exp. All.; 29: 342-346
- 43 Sepp, E., Naaber P, Voor T, Mikelsaar M, Björkstén B, 2000. *Development of intestinal microflora during the first month of life in Estonian and Swedish infants*. Microbiol. Ecol. Health. Dis.; 12: 22-26.
- 44 Björkstén, B., Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M, 2001. *Allergy development and the intestinal microflora during first year of life*. Allerg. Clin. Immunol.; 108: 516-20.
- 45 Riedler, J., Eder W, Oberfeld G und Schreuer M, 2000. *Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization*. Clin. Exp. Allergy; 30: 194-200
- 46 Riedler, J., Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, Carr D, Schierl R, Nowak D and von Mutius E, 2001. *Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey*. Lancet; 358: 1129-1133

- 47 Braun-Fahrlander, C., Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A, Lauener RP, Schierl R, Renz H, Nowak D and von Mutius E, 2002. *Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children*. N. E. J. M.; 347: 869-877
- 48 Fearon, D.T und Locksley RM, 1996. *The instructive role of innate immunity in acquired immune response*. Science; 272: 50-53
- 49 Yamamoto, S., Kuramoto E, Shimada S und Tokunaga T, 1988. *In vitro augmentation of natural killer cell activity and production of interferon- α/β and γ with deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG*. Jpn. J. Cancer. Res.; 79: 866-873
- 50 Yamamoto, T., Yamamoto S, kataoka T, Komuro K, Kohase M und Tokunaga T, 1994. *Synthetic oligonucleotides with certain palindromes stimulate interferon production of human peripheral blood lymphocytes in vitro*. Jpn. J. Cancer. Res.; 85: 775-779
- 51 Mosmann, T., Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA und Coffman RL, 1986. *Two types of murine T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J. Immunol.; 136: 2348-2357
- 52 Paul, W.E. und Seder RA, 1994. *Lymphocyte responses and cytokines*. Cell; 76: 241-251
- 53 Firestein, G.S., Roeder WD, Laxer JA, Townsend KS, Weaver CT, Hom JT, Linton J, Torbett BE und Glasebrook AL, 1989. *A new murine CD4+ T cell subset with an unrestricted cytokine profile*. J. Immunol.; 143: 518-525
- 54 Hsieh, C.S., Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A und Murphy KM, 1993. *Development of Th1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages*. Science; 260: 547-549
- 55 Schmitt, E.R., VanBrandwijk R, Fischer HG und Rude E, 1990. *Establishment of different T cell sublines using either interleukin 2 or interleukin 4 as growth factors*. Eur. J. Immunol.; 20: 1709-1715
- 56 Le Gros, G., Ben sasson SZ, Seder R, Finkelman FD und Paul WE, 1990. *Generation of interleukine 4 (IL-4) producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4 producing cells*. J. Exp. Med.; 172: 921-929
- 57 Maggi, E., Parronchi P, Manetti R, Simonelli C, Piccini MP, Rugiu FS, De Carli M, Ricci M und Romagnani S, 1992. *Reciprocal regulatory effect of IFN- α and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones*. J. Immunol.; 148: 2142-2147

- 58 Bradley, L.M., Dalton DK und Croft M, 1996. *A direct role of IFN-gamma in regulation of Th1 cell development.* J. Immunol.; 157: 1350-1358
- 59 Gollob, J.A., Kawasaki H und Ritz J, 1997. *Interferon-gamma and interleukin-4 regulate T-cell interleukin-12 responsiveness through the differential modulation of high-affinity interleukin-12 receptor expression.* Eur. J. Immunol.; 27: 647-652
- 60 Szabo, S.J., Dighe AS, Gubler U und Murphy KM, 1997. *Regulation of the interleukin 12 receptor beta 2 subunit expression in developing Th1 and Th2 cells.* J. Exp. Med.; 185: 817-824
- 61 Gong, J.H., Zhang M, Modlin RL, Linsley PS, Iyer D, Lin Y und Barnes PF, 1996. *Interleukin-10 downregulates Mycobacterium tuberculosis-induced Th1 responses and CTLA-4 expression.* Infect. Immun.; 64: 913-918
- 62 Bousquet, J., Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlsted S, Simony Lafontaine J, Godard P, et al., 1990. *Eosinophilic inflammation in asthma.* N. E. J. M.; 323: 1033-1039
- 63 Del Prete, G., Magg E, Parronchi P, Chretien I, Tiri A, Macchia D, Ricci M, Banchereau J, DeVries J und Romagnani S, 1988. *IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants.* J. Immunol.; 137: 4193-4198
- 64 Paul, W.E., 1991. *Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine.* Blood; 77: 1859-1870
- 65 Punnonen, J., Aversa G, Cocks BG und DeVries, 1994. *Role of interleukin-4 and interleukin-13 in synthesis of IgE and expression of CD23 by human B cells.* Allergy; 49: 576-586
- 66 Levy, F., Kristofic C, Heusser C und Brinkmann V, 1997. *Role of IL-13 in CD4 T cell-dependent IgE production in atopy.* Int. Arch. Allergy Immunol.; 112: 49-58
- 67 Yanagihara, Y., Kajiwara K, Basaki Y, Ikizawa K, Akiyama K und Saito, 1997. *Induction of human IgE synthesis in B cells by a basophilic cell line, KU812.* Clin. Exp. Immunol.; 108 (2): 295-301
- 68 Van der Pouw-Kraan, T.C., Van der Zee JS, Boeijs JC, De Groot ER, Stapel SO und Aarden LA, 1998. *The role of IL-13 in IgE synthesis by allergic asthma patients.* Clin. Exp. Immunol.; 111 (1): 129-135

- 69 Racioppi, L., Ronchese F, Matis LA und Germain R, 1993. *Peptide-major histocompatibility complex class II complexes with mixed agonist/antagonist properties provide evidence for ligand-related differences in T cell receptor-dependent intracellular signalling.* J. Exp. Med.; 181: 1569
- 70 Davis, M.M., Boniface JJ, Reich Z, Lyons D, Hampl J, Arden B, und Chien Y, 1998. *Ligand recognition by alpha beta T cell receptors.* Annu. Rev. Immunol.; 16: 523-544
- 71 Gajewski, T.F., Pinnas M, Wong T und Fitch FW, 1991. *Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen-presenting cell populations.* J. Immunol.; 146: 1750-1758
- 72 Palmer, E.M. und Van Severter, 1997. *Human T helper cell differentiation is regulated by the combined action of cytokines and accessory cell-dependent costimulatory signals.* J. Immunol; 158: 2654-2662
- 73 Romagnani, S., 1994. *Regulation of the development of type 2 T-helper cells in allergy.* Curr. Opin. Immunol.; 6: 838-846
- 74 Alderson, M.R., Pike BL und Nossal GJ, 1987. *Single cell studies on the role of Bcell stimulatory factor 1 in B-cell activation.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 84: 1389-1393
- 75 Go, N.F., Castle BE, Barrett R, Kastelein R, Dang W, Masman TR, Moore KW und Howard M, 1990. *Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X-linked immunodeficient B cells.* J. Exp. Med.; 172: 1625-1631
- 76 Paul, W.E., 1991. *Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine.* Blood; 77: 1859-1870
- 77 Kalinski, P., Hilkens CM, Wierenga EA und Kapsenberg ML, 1999. *T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal.* Immunol. Today; 10: 561-567
- 78 Rissoan, M., Soumelis V, Kadowaki N, et al., 1999. *Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation.* Science; 283: 1183-1186
- 79 Seder, R., Gazzinelle R, Sher A und Paul WE, 1993. *Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming.* J. Immunol.; 90: 10188-10192.
- 8 Secrist, H., DeKruyff R und Umetsu D, 1995. *Interleukin 4 production by CD+ T cells from allergic individuals is modulated by antigen concentration and antigen-presenting cell-type.* J. Exp. Med.; 182: 1081-1089

- 81 Shakib, F., Schulz O und Sewell H 1998. *A mite subversive cleavage of CD23 and CD25 by Der pI enhances allergenicity*. Immunol. Today; 19: 313-316
- 82 Bacharier, L.B., Jabara H und Geha RS, 1998. *Molecular Mechanisms of immunoglobulin E regulation*. Int. Arch. Allergy Immunol.; 115: 257-269
- 83 Siraganian R.P., 1998. *Biochemical events in basophil or mast cell activation and mediator release*. In: Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF Jr, Yunginger JW, Busse WW, eds. Allergy: principles & practice. 5th ed. Vol. 1 St. Louis: Mosby-Year Book: 204-227
- 84 Lane, S.J. und Lee TH, 1996. *Mast cell effector mechanisms*. J. Allergy Clin. Immunol.; 98: 67-72
- 85 Barnes, P.J. und Adcock IM, 1998. *Transcription factors and asthma*. Eur. Respir. J.; 12: 221-234
- 86 Burrows, B., Martinez FD, Halonen M, Barbaa RA und Cline MG, 1989. *Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens*. N. Engl. J. Med.; 320: 271-277
- 87 Walker, C., Bode E, Boer L, Hansel TT, Blaser K und Virchow JC Jr, 1992. *Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage*. Am. Rev. Respir. Dis.; 146: 109-115
- 88 Sanderson, C.J., 1992. *Interleukin-5, eosinophils and disease*. Blood; 79: 3101-3109
- 89 Rothenberg, M.E., 1998. *Eosinophilia*. N. Engl. J. Med.; 338: 1592-1600
- 90 Murphy, S., Bleecker ER, Boushey H, et al., 1997. *Practical guide for the diagnosis and management of asthma: based on the Expert Panel Report 2: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma*. Bethesda, MD.: National Heart, Lung, and Blood Institute; (NIH publication no. 97-4053)
- 91 Barnes, P.J., 1996. *Mechanisms of action of glucocorticoids in asthma*. Am. J. Respir. Crit. Care Med.; 154: 21-26
- 92 Lemanske, R.F. Jr. und Allen DB, 1997. *Choosing a long-term controller medication in childhood asthma: the proverbial two-edged sword*. Am. J. Respir. Crit. Care Med.; 156: 685-687

- 93 Allen, D.B., 1996. *Growth suppression by glucocorticoid therapy*. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.*; 25: 699-717
- 94 Boulet, L-P., Chapman KR, Cote J, et al., 1997. *Inhibitory effects of an anti-IgE antibody E25 on allergen-induced early asthmatic response*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*; 155: 1835-1840
- 95 Fahy, J.V., Fleming HE, Wong HH, et al., 1997. *The effect of an anti-IgE monoclonal antibody on early- and late-phase responses to allergen inhalation in asthmatic subjects*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*; 155: 1828-1834
- 96 Abramson, M.J., Puy RM und Weiner JM, 1995. *Is allergen immunotherapy effective in asthma?* *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*; 151: 969-974
- 97 Adkinson, N.F., Eggleston PA, Eney D, et al., 1997. *A controlled trial of immunotherapy for asthma in allergic children*. *N. Engl. J. Med.*; 336: 324-331
- 98 Creticos, P.S., reed CE, Norman PS, et al.; 1996. *Ragweed immunotherapy in adult asthma*. *Int. Arch. Allergy Immunol.*; 118: 453-456
- 99 Erb, K.J., Holloway JW, Sobeck A, Moll H und Le Gros G, 1998. *Infection of mice with Mycobacterium bovis Bacillus-Calmette-Guérin (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia*. *J. Exp. Med.*; 187: 561-569
- 100 Herz, U., Gerold K, Grüber C, Braun A, Wahn U, Renz H und Pual K, 1998. *BCG infection suppresses allergic sensitization and development of increased airway reactivity in an animal model*. *J. Allergy Clin. Immunol.*; 102: 867-874
- 101 Michele, T.M., Kuperman D, Luyimbazi J, Santeliz JA, Bishai WR, und Wills-Karp M, 1999. *Heat-killed BCG reverses antigen induced airway hyperresponsiveness in a murine model of asthma*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*; 159: A 510
- 102 Tulic, M.K., et al., 2000. *Modification of the inflammatory response to allergen challenge after exposure to bacterial lipopolysaccharide*. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*; 22: 604-612
- 103 Iwamoto, I., Nakajima H, Endo H und Yoshida, 1993. *Interferon- α regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4⁺ T cells*. *J. Exp. Med.*; 177: 573-576

- 104 Lack, G., Bradley KL, Hamelmann E, Renz H, Loader J, Leung DYM, Larsen G und Gelfand EW, 1996. *Nebulized IFN- α inhibits the development of secondary allergic responses in mice.* J. Immunol.; 157: 1432-1439
- 105 Kips, J.C., Brusselle GJ, Joos GF, Peleman RA, Tavernier JH, Devos RR und Pauwels RA, 1996. *Interleukin-12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness in mice.* Am. J. Respir. Crit. Care Med.; 153: 535-539
- 106 Broide, D. und Raz E, 1999. *DNA-based immunization for asthma.* In. Arch. Allergy Immunol.; 118: 453-456
- 107 Krieg, A.M., 2001. *From bugs to drugs: therapeutic immunomodulation with oligodeoxynucleotides containing CpG sequences from bacterial DNA.* Antisense Nucleic Acid Drug Dev.; 11: 181-188
- 108 Kline, J.N., Kitagaki K, Businga TR und Jain VV, 2002. *Treatment of established asthma in a murine model using CpG oligodeoxynucleotides.* Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.; 283: L170-179
- 109 Kline, J.N., 2000. *Effects of CpG DNA on Th1/Th2 balance in asthma.* Curr. Top. Microbiol. Immunol.; 247: 211-225
- 110 Sur, S., Wild JS, Choudhury BK, Sur N, Alam R und Klinmann DM, 1999. *Long term prevention of Allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG Oligodeoxynucleotides.* J. Immunol.; 162: 6284-6293
- 111 Medzhitov, R., Preston-Hurlburt P und Janeway CA Jr. 1997. *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity.* Nature; 388: 394-397
- 112 Hoshino, K. et al. 1999. *Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product.* J. Immunol.; 162: 3749-3752
- 113 Beutler, B. 2000. *Endotoxin, toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity.* Curr. Opin. Microbiol.; 3: 23-28
- 114 Hemmi, H., et al. 2000. *A toll-like receptor recognizes bacterial DNA.* Nature; 408: 740-745
- 115 Häcker, H. et al. 1999. *Cell type-specific activation of mitogen-activated protein kinases by CpG-DNA controls interleukin-12 release from antigen-presenting cells.* EMBO J.; 18: 6973-6982

- 116 Parviz, A-N., Häcker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM und Wagner H, 2002. *Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments.* Eur.J.Immunol.; 32: 1958-1968
- 117 Herz, U., Braun A, Rückert R und Renz H 1998. *Various immunological phenotypes are associated with increased airway responsiveness.* Clin. Exp. Allergy; 28: 625-634
- 118 Herz, U., Lumpp U, Da Palma JC, et al. 1996. *The relevance of murine animal models to study the development of allergic bronchial asthma.* Immunol. Cell Biol.; 74: 209-217
- 119 Herz, U., Lumpp U, Daser A, Gelfand EW, Renz H, 1996. *Murine animal models to study the central role of T cells in immediate-type hypersensitivity responses.* Adv. Exp. Med. Biol.; 409: 25-32
- 120 Krieg, AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA und Klinman DM 1995. *CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation.* Nature; 374: 546-549
- 121 Clay, M.M., Pavia, D., Newman, S.P. und Clarke, S.W. 1983. *Factors influencing the size distribution of aerosol from jet nebulization.* Thorax; 38: 755-759
- 122 Herz, U., Lumpp U, Da Palma JC, et al. 1996. *The relevance of murine animal models to study the development of allergic bronchial asthma.* Immunol. Cell Biol.; 74: 209-217
- 123 Herz, U., Lumpp U, Daser A, Gelfand EW, Renz H, 1996. *Murine animal models to study the central role of T cells in immediate-type hypersensitivity responses.* Adv. Exp. Med. Biol.; 409: 25-32
- 124 Vijayaraghavan, R., Schaper, M., Thompson, R., Stock, M.F. und Alarie, Y. 1993. *Characteristic modifications of the breathing pattern of mice to evaluate the effects of airborne chemicals on the respiratory tract.* Arch. Toxicol.; 67(7): 478-490
- 125 Vijayaraghavan, R., Schaper, M., Thompson, R. und Alarie, Y. 1994. *Characterisation of the effects of an airborne mixture of chemicals acting at different areas of the respiratory tract in mice.* Arch. Toxicol.; 86: 490-99
- 126 Boylstein, L., Anderson, J., Thompson, R. und Alarie, Y. 1996. *Characterisation of the effects of an airborne mixture of chemicals on the respiratory tract and smoothing polynomial spline analysis of the data.* Arch. Toxicol.; 70: 567-578
- 127 Strachan, D.P., 2000. *Family size, infection and atopy: the first decade of the „hygiene hypothesis“.* Thorax; 55: Suppl. 1: S2-S10

- 128 Björkstén, B., Naaber P, Sepp E, Mikelsaar M, 1999. *The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children*. Clin. Exp. All.; 29: 342-346
- 129 Herz, U., Gerold K, Grüber C, Braun A, Wahn U, Renz H und Pual K, 1998. *BCG infection suppresses allergic sensitization and development of increased airway reactivity in an animal model*. J. Allergy Clin. Immunol.; 102: 867-874
- 130 Zuany-Amorim, C., Sawicka E, Manilus C, Le Moine A, Brunet LR, Kemeny DM, Bowen G, Rook K und Walker C, 2002. *Suppression of airway eosinophilia by heat killed Mycobacterium vaccae-induced allergen specific regulatory T-cells*. Nat. Med.; 8: 625-629
- 131 Yamamoto, T., Yamamoto S, kataoka T, Komuro K, Kohase M und Tokunaga T, 1994. *Synthetic oligonucleotides with certain palindromes stimulate interferon production of human peripheral blood lymphocytes in vitro*. Jpn. J. Cancer. Res.; 85: 775-779
- 132 Heeg, K. und Zimmermann S, 2000. *CpG DNA as a Th1 Trigger*. Int. Arch. Allergy Immunol.; 121: 87-97
- 133 Krieg, A.M. et al, 2000. *The role of CpG motifs in innate Immunity*. Curr. Opin. Immunol.; 12: 35-43
- 134 Shirakawa, T., Enomoto T, Shimazu SI, und Hopkin JM, 1997. *Inverse association between tuberculin responses and atopic disorder*. Science; 275: 77-79
- 135 Erb, K.J., Holloway JW, Sobeck A, Moll H und Le Gros G, 1998. *Infection of mice with Mycobacterium bovis Bacillus-Calmette-Guérin (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia*. J. Exp. Med.; 187: 561-569
- 136 Herz, U., Gerold K, Grüber C, Braun A, Wahn U, Renz H und Pual K, 1998. *BCG infection suppresses allergic sensitization and development of increased airway reactivity in an animal model*. J. Allergy Clin. Immunol.; 102: 867-874
- 137 Vannier, E., et al., 1991. *Lipopolysaccharide from Escherichia coli reduces antigen-induced bronchoconstriction in actively sensitized guinea pigs*. J. Clin. Invest.; 87: 1936-1944
- 138 Tulic, M.K., et al., 2000. *Modification of the inflammatory response to allergen challenge after exposure to bacterial lipopolysaccharide*. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.; 22: 604-612

- 139 Raz, E., Tighe H, Sato Y, Corr M, Dudler JA, Roma M, Swain SL, Spiegelberg HL und Carson DA, 1996. *Preferential induction of Th₁ immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization.* Immunology; 93: 5141-5145
- 140 Krieg, AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA und Klinman DM 1995. *CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation.* Nature; 374: 546-549
- 141 Peng, Z., Wang H, Mao X, HayGlass KT und Simons FER, 2001. *CpG ologodeoxynucleotide vaccination suppresses IgE induction but may fail to down-regulate ongoing IgE responses in mice.* Int. Immunol.; 13: 3-11
- 142 Abramson, M.J., Puy RM und Weiner JM, 2000. *Allergen immunotherapy for asthma.* Cochrane Database Syst. Rev.; 2
- 143 Creticos, P.S., 1997. *Immunotherapy.* Aus Kaplan, AP: Allergy. 2nd ed. Philadelphia: Saunders: 726-739
- 144 Nelson, H.S., Lahr J, Rule R, Bock A, Leung D, 1997. *Treatment of anaphylactic sensitivity to peanuts by immunotherapy with injections of aqueous peanut extract.* J. Allergy Clin. Immunol.; 99: 744-751
- 145 Gabrielsson, S., Soderlung A, Paulie S, van der Pouw Kraan TC, Troye-Blomberg M und Rak S, 2001. *Specific immunotherapy prevents increased levels of allergen-specific IL-4 and IL-13-producing cells during pollen season.* Allergy; 56: 293-300
- 146 Akdis, C.A. und Blaser K, 2001. *Role of IL-10 in allergen-specific immunotherapy and normal response to allergens.* Microbes Infect.; 3: 891-898
- 147 Akbari, O., DeKruyff RH und Umetsu DT, 2001. *Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen.* Nat. Immunol.; 2: 827-833
- 148 Davis, H.L., 2000. *CpG motifs for optimization of DNA vaccines.* Dev. Biol.; 104: 165-169
- 149 Horner, A.A., Ronaghy A, Cheng PM, Nguyen MD, Cho HJ, Broide D und Raz E, 1998. *Immunostimulatory DNA is a potent mucosal adjuvant.* Cell. Immunol.; 190: 77-82
- 150 Wang, C.C. und Rook GA, 1998. *Inhibition of an established allergic response to ovalbumin in BALB/C mice by killed Mycobacterium vaccae.* Immunology; 93: 307-313

- 151 Yeung, V.P., et al., 1998. *Heat-killed Listeria monocytogenes as an adjuvant converts established murine Th1-dominated immune responses into Th1-dominated responses.* J. Immunol.; 161: 4146-4152
- 152 Murosaki, S. et al.; 1998. *Heat-killed lactobacillus plantarum L-137 suppresses naturally fed antigen-specific IgE production in mice.* J. Allergy Clin. Immunol.; 102: 57-64
- 153 Zuany-Amorim, C., Sawicka E, Manlius C, Le Moine A, Brunet LR, Kemeny DM, Bowen G, Rook G und Walker C, 2002. *Suppression of airway eosinophilia by killed Mycobacterium vaccae-induced allergen-specific regulatory T-cells.* Nat. Med.; 8: 625-629
- 154 Moore, K.W., de wall Malefyt R, Coffman RL und O'Garra A, 2001. *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor.* Annu. Rev. Immunol.; 19: 683-765
- 155 Makela, M.J., Kanehiro A, Borish L, Dakhama A, Loader J, Joetham A, Xing Z, Jordana M, Larsen GL und Gelfand EW, 2000. *IL-10 is necessary for the expression of airway hyperresponsiveness but not pulmonary inflammation after allergic sensitization.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 97: 6007-6012
- 156 Justice, J.P., Shibata Y, Sur S, Mustafa J, Fan M und Van Scott MR, 2001. *IL-10 gene knockout attenuates allergen-induced airway hyperresponsiveness in C57BL/6 mice.* Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.; 278: L363-L368
- 157 Yang, X., Wang S, Fan Y und Han X, 2000. *IL-10 deficiency prevents IL-5 overproduction and eosinophilic inflammation in a murine model of asthma-like reaction.* Eur. J. Immunol.; 30: 382-391
- 158 Horner, A.A., Van Uden JH, Zubeldia JM, Broide D und Raz E, 2001. *DNA-based immunotherapeutics for the treatment of allergic disease.* Immunol. Rev.; 179: 102-118
- 159 Broide, D., Schwarze J, Tighe H, Gifford T, Nguyen MD, Malek S, Van Uhden J, Martin-Orozco E, Gelfand EW und Raz E, 1998. *Immunostimulatory DNA sequences inhibit IL-5, eosinophilic inflammation, and airway hyperresponsiveness in mice.* J. Immunol.; 161: 7054-7062
- 160 Kline, J.N., Waldschmidt TJ, Businga TR, Lemish JE, Weinstock JV, Throne PS und Krig AM, 1998. *Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma.* J. Immunol.; 160: 2555-2559
- 161 Sur, S., Wild JS, Choudhury BK, Sur N, Alam R und Klinman DM, 1998. *Long term Prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides.* J. Immunol.; 162: 6284-6293

- 162 Wilder, J.A., Collie DD, Wilson BS, Bice DE, Lyons CR und Lipscomb MF, 1999. *Dissociation of airway hyperresponsiveness from immunoglobulin E and airway eosinophilia in a murine model of allergic asthma*. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.; 20(6): 1326-1334
- 163 Broide, D., Schwarze J, Tighe H, Gifford T, Nguyen MĐ, Malek S, Van Uhden J, Martin-Orozco E, Gelfand EW und Raz E, 1998. *Immunostimulatory DNA sequenzen inhibit IL-5, eosinophilic inflammation, and airway hyperresponsiveness in mice*. J. Immunol.; 161: 7054-7062
- 164 Kline, J.N., Waldschmidt TJ, Businga TR, Lemish JE, Weinstock JV, Throne PS und Krig AM, 1998. *Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma*. J. Immunol.; 160: 2555-2559
- 165 Sur, S., Wild JS, Choudhury BK, Sur N, Alam R und Klinman DM, 1998. *Long term Prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides*. J. Immunol.; 162: 6284-6293
- 166 Shirota, H., Sano K, Kikuchi T, Tamura G und Shirato K, 2000. *Regulation of T-helper type 2 cell and airway eosinophilia by transmucosal coadministration of antigen and oligodeoxynucleotides containing CpG motifs*. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.; 22: 176
- 167 Zimmermann, S., Egeter O, Hausmann S, Lipford GB, Rocken M, Wagner H und Heeg, 1998. *CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis*. J. Immunol.; 160: 3627
- 168 Serebrisky, D., Teper AA, Huang C-K, Lee S-Y, Zhang T-F, Schofield BH, Kattan M, Sampson HA und Li X-M, 2000. *CpG oligodeoxynucleotides can reverse Th2-associated allergic airway responses and alter the B7.1/B7.2 Expression in a murine model of asthma*. J. Immunol.; 165: 5906-5912
- 169 Peng, Z., Wang H, Mao X, HayGlass KT und Simons FER, 2001. *CpG oligodeoxynucleotide vaccination suppresses IgE induction but may fail to down-regulate ongoing IgE responses in mice*. Int. Immunol.; 13: 3-11
- 170 Steinberger, P., Bohle B, di Padova F, Wrann M, Liehl E, Scheiner O, Kraft D und Valenta R, 1995. *Allergen-specific IgE production of committed B cells from allergic patients in vitro*. J. Allergy Clin. Immunol.; 96: 209
- 171 Randolph, D.A., Carruthers CJ, Szabo SJ, Murphy KM und Chaplin DD, 1999. *Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific TH1 and TH2 cells in a mouse model of asthma*. J. Immunol.; 162: 2375

- 172 Snapper, C.M., Finkelman FD, Stefany d, Conrad DH und Paul WE, 1988. *IL-4 induces co-expression of intrinsic membrane IgG1 and IgE by murine B cells stimulated with lipopolysaccharide*. J. Immunol.; 141: 489
- 173 HayGlass, K.T. und Stefura BP, 1991. *Anti-interferon gamma treatment blocks the ability of glutaraldehyde-polymerized allergens to inhibit specific IgE responses*. J. Exp. Med; 173: 279
- 174 Van Halteren, A.G., van der Cammen MJ, Cooper D, Savelkoul HF, Kraal G, und Holt PG, 1997. *Regulation of antigen-specific IgE, IgG1 and mast cell responses in ingested allergen by mucosal tolerance induction*. J. Immunol.; 159: 3009
- 175 Kline, J. N., Kitagaki K, Businga TR und Jain VV, 2002. *Treatment of established asthma in a murine model using CpG oligodeoxynucleotides*. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.; 283: L170-L179
- 176 Shirota, H., Sano k, Kikuchi T, Tamura G und Shirato K, 2000. *Regulation of murine airway eosinophilia and Th2 cells by antigen-conjugated CpG oligodeoxynucleotides as a novel antigen-specific immunomodulator*. J. Immunol.; 164: 5575-5582
- 177 Secrist, H., Chelen CJ, Wen Y, Marshall JD und Umetsu DT, 1993. *Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals*. J. Exp. Med.; 178: 2123-2130
- 178 Jutel, M. et al., 1995. *Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures*. J. Immunol.; 154: 4187-4194
- 179 Hansen, G., Berry G, DeKruyff RH und Umetsu DT, 1998. *Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation*. J. Clin. Invest.; 103: 175-183
- 180 Lockey, R.F., Benedict LM, Turkeltaub PC und Bukantz SC, 1996. *Fatalities from immunotherapy (IT) and skin testing (ST)*. J. Allergy Clin. Immunol.; 79: 660-677
- 181 Reid, M.J., Lockey RF, Turkeltaub PC und Platts-Mills TA, 1993. *Survey of fatalities from skin testing and immunotherapy 1985-1989*. J. Allergy. Clin. immunol.; 92: 6-15
- 182 Umetsu, D.T., Hahn JS, Perez-Atayde AR und Geha RS, 1985. *Serum sickness triggered by anaphylaxis: a complication of immunotherapy*. J. Allergy Clin. Immunol.; 76: 713-718

LITERATUR (alphabetisch)

Abramson, M.J., Puy RM und Weiner JM, 1995. *Is allergen immunotherapy effective in asthma?* Am. J. Respir. Crit. Care Med.; 151: 969-974

Abramson, M.J., Puy RM und Weiner JM, 2000. *Allergen immunotherapy for asthma.* Cochrane Database Syst. Rev.; 2

Adkinson, N.F., Eggleston PA, Eney D, et al., 1997. *A controlled trial of immunotherapy for asthma in allergic children.* N. Engl. J. Med.; 336: 324-331

Akbari, O., DeKruyff RH und Umetsu DT, 2001. *Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen.* Nat. Immunol.; 2: 827-833

Akdis, C.A. und Blaser K, 2001. *Role of IL-10 in allergen-specific immunotherapy and normal response to allergens.* Microbes Infect.; 3: 891-898

Alderson, M.R., Pike BL und Nossal GJ, 1987. *Single cell studies on the role of B-cell stimulatory factor 1 in B-cell activation.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 84: 1389-1393

Allen, D.B., 1996. *Growth suppression by glucocorticoid therapy.* Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.; 25: 699-717

American Academy of Allergy an Immunology (AAAAI). *The Allergy Report: Science Based Findings on the Diagnosis & Treatment of Allergic Disorders*, 1996-2001.

Anderson, H.R., 1978. *Respiratory abnormalities in Papua New Guinea children: the effects of locality and domestic wood smoke pollution.* Internat. J. Epidemiol.; 7: 63-72

Bacharier, L.B., Jabara H und Geha RS, 1998. *Molecular Mechanisms of immunoglobulin E regulation.* Int. Arch. Allergy Immunol.; 115: 257-269

Ball, T.M., Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martinez FD and Wright AL, 2000. *Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood.* N. Engl. J. Med.; 343: 538-543

Barnes, P.J. und Adcock IM, 1998. *Transcription factors and asthma.* Eur. Respir. J.; 12: 221-234

- Barnes, P.J., 1996. *Mechanisms of action of glucocorticoids in asthma*. Am. J. Respir. Crit. Care Med.; 154: 21-26
- Beutler, B. 2000. *Endotoxin, toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity*. Curr.Opin. Microbiol.; 3: 23-28
- Björkstén, B., Naaber P, Sepp E, Mikelsaar M, 1999. *The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children*. Clin. Exp. All.; 29: 342-346
- Björkstén, B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M, 2001. *Allergy development and the intestinal microflora during first year of life*. Allerg. Clin. Immunol.; 108: 516-20
- Black, P. und Sharpe S, 1997. *Dietary fat and asthma: is there a connection?* Eur. Respir. J. ; 10: 6-12
- Boulet, L-P., Chapman KR, Cote J, et al., 1997. *Inhibitory effects of an anti-IgE antibody E25 on allergen-induced early asthmatic response*. Am. J. Respir. Crit. Care Med.; 155: 1835-1840
- Bousquet, J., Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlsted S, Simony Lafontaine J, Godard P, et al., 1990. *Eosinophilic inflammation in asthma*. N. E. J. M.; 323: 1033-1039
- Boylstein, L., Anderson, J., Thompson, R. und Alarie, Y. 1996. *Characterisation of the effects of an airborne mixture of chemicals on the respiratory tract and smoothing polynomial spline analysis of the data*. Arch. Toxicol.; 70: 567-578
- Bråbäck, L.A., Breborowicz K, Julge K, Knutsson A, Riikjarv Ma, Vasar M und Bjorksten B, 1995. *Risk factors for respiratory symptoms and atopic sensitization in the baltic area*. Arch. Dis. Child.; 72: 487-493
- Bradley, L.M., Dalton DK und Croft M, 1996. *A direct role of IFN-gamma in regulation of Th1 cell development*. J. Immunol.; 157: 1350-1358
- Braun-Fahrländer, C., Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A, Lauener RP, Schierl R, Renz H, Nowak D and von Mutius E, 2002. *Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children*. N. E. J. M.; 347: 869-877
- Broide, D. und Raz E, 1999. *DNA-based immunization for asthma*. In. Arch. Allergy Immunol.; 118: 453-456

- Broide, D., Schwarze J, Tighe H, Gifford T, Nguyen M-D, Malek S, Van Uhden J, Martin-Orozco E, Gelfand EW und Raz E, 1998. *Immunostimulatory DNA sequences inhibit IL-5, eosinophilic inflammation, and airway hyperresponsiveness in mice.* J. Immunol.; 161: 7054-7062
- Burrows, B., Martinez FD, Halonen M, Barbaa RA und Cline MG, 1989. *Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens.* N. Engl. J. Med.; 320: 271-277
- Clay, M.M., Pavia, D., Newman, S.P. und Clarke, S.W. 1983. *Factors influencing the size distribution of aerosol from jet nebulization.* Thorax; 38: 755-759
- Creticos, P.S., 1997. *Immunotherapy.* Aus Kaplan, AP: Allergy. 2nd ed. Philadelphia: Saunders: 726-739
- Creticos, P.S., reed CE, Norman PS, et al.; 1996. *Ragweed immunotherapy in adult asthma.* Int. Arch. Allergy Immunol.; 118: 453-456
- D'Amato, G., Liccardi G und D'Amato M, 2000. *Environmental risk factors (outdoor air pollution and climatic changes) and increased trend of respiratory allergy.* J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.; 10: 123-128
- Daniels, S., Bhattachary S, James A, et al., 1996. *A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma.* Nature; 383: 247-250
- Davis, H.L., 2000. *CpG motifs for optimization of DNA vaccines.* Dev. Biol.; 104: 165-169
- Davis, M.M., Boniface JJ, Reich Z, Lyons D, Hampl J, Arden B, und Chien Y, 1998. *Ligand recognition by alpha beta T cell receptors.* Annu. Rev. Immunol.; 16: 523-544
- Del Prete, G., Magg E, Parronchi P, Chretien I, Tiri A, Macchia D, Ricci M, Banchereau J, De Vries J und Romagnani S, 1988. *IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants.* J. Immunol.; 137: 4193-4198
- Doull, I., Lawrence S, Wtson m, et al., 1996. *Allelic association of gene markers on chromosome 5q and 11q with atopy and bronchial hyperresponsiveness.* Am. J. Respir. Crit. Care Med.; 153: 1280-1284
- Duffy, D.L., Martin NG, Battisutta D, Hoffer JL und Mathews JD, 1990. *Genetics of asthma and hay fever in Australien twins.* Am. Rev. Respir. Dis.; 414: 1351-1358
- Duhme, H., Weiland SK, Rudolph P, Wienke A, Kramer A und Keil U, 1998. *Asthma and allergies among children in West and East Germany: Acomparison between Münster ans Greifswald using ISAAC phase I protocol.* Eur. Respir. J.; 11: 840-847

Erb, K.J., Holloway JW, Sobeck A, Moll H und Le Gros G, 1998. *Infection of mice with Mycobacterium bovis Bacillus-Calmette-Guérin (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia.* J. Exp. Med.; 187: 561-569

Fahy, J.V., Fleming HE, Wong HH, et al., 1997. *The effect of an anti-IgE monoclonal antibody on early- and late-phase responses to allergen inhalation in asthmatic subjects.* Am. J. Respir. Crit. Care Med.; 155: 1828-1834

Fearon, D.T und Locksley RM, 1996. *The instructive role of innate immunity in acquired immune response.* Science; 272: 50-53

Firestein, G.S., Roeder WD, Laxer JA, Townsend KS, Weaver CT, Hom JT, Linton J, Torbett BE und Glasebrook AL, 1989. *A new murine CD4+ T cell subset with an unrestricted cytokine profile.* J. Immunol.; 143: 518-525

Fogarty, A., Lewis S, Weiss S und Britton J, 2000. *Dietary vitamin E, IgE concentrations and atopy.* Lancet; 356: 1573-1574

Gabrielsson, S., Soderlung A, Paulie S, van der Pouw Kraan TC, Troye-Blomberg M und Rak S, 2001. *Specific immunotherapy prevents increased levels of allergen-specific IL-4 and IL-13-producing cells during pollen season.* Allergy; 56: 293-300

Gajewski, T.F., Pinnas M, Wong T und Fitch FW, 1991. *Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen-presenting cell populations.* J. Immunol.; 146: 1750-1758

Go, N.F., Castle BE, Barrett R, Kastelein R, Dang W, Masman TR, Moore KW und Howard M, 1990. *Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X-linked immunodeficient B cells.* J. Exp. Med.; 172: 1625-1631

Gollob, J.A., Kawasaki H und Ritz J, 1997. *Interferon-gamma and interleukin-4 regulate T-cell interleukin-12 responsiveness through the differential modulation of high-affinity interleukin-12 receptor expression.* Eur. J. Immunol.; 27: 647-652

Gong, J.H., Zhang M, Modlin RL, Linsley PS, Iyer D, Lin Y und Barnes PF, 1996. *Interleukin-10 downregulates Mycobacterium tuberculosis-induced Th1 responses and CTLA-4 expression.* Infect. Immun.; 64: 913-918

Häcker, H. et al.1999. *Cell type-specific activation of mitogen-activated protein kinases by CpG-DNA controls interleukin-12 release from antigen-presenting cells.* EMBO J.; 18: 6973-6982

Hansen, G., Berry G, DeKruyff RH und Umetsu DT, 1998. *Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation.* J. Clin. Invest.; 103: 175-183

HayGlass, K.T. und Stefura BP, 1991. *Anti-interferon gamma treatment blocks the ability of glutaraldehyde-polymerized allergens to inhibit specific IgE responses.* J. Exp. Med; 173: 279

Heeg, K. und Zimmermann S, 2000. *CpG DNA as a Th1 Trigger.* Int. Arch. Allergy Immunol.; 121: 87-97

Heinrich, J., Popescu M, Wjst M, Goldstein I und Wichmann HE, 1998. *Atopy in children and parental social class.* Am. J. Public Health; 88: 1319-1324

Hemmi, H., et al. 2000. *A toll-like receptor recognizes bacterial DNA.* Nature; 408: 740-745

Herz, U., Braun A, Rückert R und Renz H 1998. *Various immunological phenotypes are associated with increased airway responsiveness.* Clin. Exp. Allergy; 28: 625-634

Herz, U., Gerold K, Grüber C, Braun A, Wahn U, Renz H und Pual K, 1998. *BCG infection suppresses allergic sensitization and development of increased airway reactivity in an animal model.* J. Allergy Clin. Immunol.; 102: 867-874

Herz, U., Lumpp U, Da Palma JC, et al. 1996. *The relevance of murine animal models to study the development of allergic bronchial asthma.* Immunol. Cell Biol.; 74: 209-217

Horner, A.A., Ronaghy A, Cheng P-M, Nguyen M-D, Cho HJ, Broide D und Raz E, 1998. *Immunostimulatory DNA is a potent mucosal adjuvant.* Cell. Immunol.; 190: 77-82

Horner, A.A., Van Uden JH, Zubeldia JM, Broide D und Raz E, 2001. *DNA-based immunotherapeutics for the treatment of allergic disease.* Immunol. Rev.; 179: 102-118

Hoshino, K. et al. 1999. *Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product.* J. Immunol.; 162: 3749-3752

Howard, T., Postma DS, Koppelman GH, et al.; 2002. *Fine mapping of an IgE-controlling gene on chromosome 2q: Analysis of CTLA4 and CD 28.* J. Allergy. Clin. Immunol.; 110: 743-751

Hsieh, C.S., Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A und Murphy KM, 1993. *Development of Th1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages.* Science; 260: 547-549

ISAAC, The International Study of Asthma and Allergies in Childhood, Steering Committee, 1998. *Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic eczema: ISAAC*. Lancet; 351: 1225-1232

Iwamoto, I., Nakajima H, Endo H und Yoshida, 1993. *Interferon- α regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4⁺ T cells*. J. Exp. Med.; 177: 573-576

Justice, J.P., Shibata Y, Sur S, Mustafa J, Fan M und Van Scott MR, 2001. *IL-10 gene knockout attenuates allergen-induced airway hyperresponsiveness in C57BL/6 mice*. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.; 278: L363-L368

Jutel, M. et al., 1995. *Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures*. J. Immunol.; 154: 4187-4194

Kalinski, P., Hilkens CM, Wierenga EA und Kapsenberg ML, 1999. *T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal*. Immunol. Today; 10: 561-567

Kips, J.C., Brusselle GJ, Joos GF, Peleman RA, Tavernier JH, Devos RR und Pauwels RA, 1996. *Interleukin-12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness in mice*. Am. J. Respir. Crit. Care Med.; 153: 535-539

Kline, J.N., Kitagaki K, Businga TR und Jain VV, 2002. *Treatment of established asthma in a murine model using CpG oligodeoxynucleotides*. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.; 283: L170-L179

Kline, J.N., 2000. *Effects of CpG DNA on Th1/Th2 balance in asthma*. Curr. Top. Microbiol. Immunol.; 247: 211-225

Kline, J.N., Waldschmidt TJ, Businga TR, Lemish JE, Weinstock JV, Throne PS und Krig AM, 1998. *Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma*. J. Immunol.; 160: 2555-2559

Krämer, U., Heinrich J, Wjst M und Wichmann HE, 1999. *Age of entry to day nursery and allergy in later childhood*. Lancet; 353: 450-454

Krieg, A.M. et al, 2000. *The role of CpG motifs in innate immunity*. Curr. Opin. Immunol.; 12: 35-43

Krieg, A.M., 2001. *From bugs to drugs: therapeutic immunomodulation with oligodeoxynucleotides containing CpG sequences from bacterial DNA*. Antisense Nucleic Acid Drug Dev.; 11: 181-188

Krieg, AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA und Klinman DM 1995. *CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation*. Nature; 374: 546-549

Kulig, M., Bergmann R, Niggemann B, Burow G und Wahn U., 1998. *Prediction of sensitization to inhalant allergens in childhood: evaluating family history, atopic dermatitis and sensitization to food allergens*. Clin. Exp. All.; 28: 1397-1403

Lack, G., Bradley KL, Hamelmann E, Renz H, Loader J, Leung DYM, Larsen G und Gelfand EW, 1996. *Nebulized IFN- α inhibits the development of secondary allergic responses in mice*. J. Immunol.; 157: 1432-1439

Lane, S.J. und Lee TH, 1996. *Mast cell effector mechanisms*. J. Allergy Clin. Immunol.; 98: 67-72

Le Gros, G., Ben sasson SZ, Seder R, Finkelman FD und Paul WE, 1990. *Generation of interleukine 4 (IL-4) producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4 producing cells*. J. Exp. Med.; 172: 921-929

Lemanske, R.F. Jr. und Allen DB, 1997. *Choosing a long-term controller medication in childhood asthma: the proverbial two-edged sword*. Am. J. Respir. Crit. Care Med.; 156: 685-687

Levy, F., Kristofic C, Heusser C und Brinkmann V, 1997. *Role of IL-13 in CD4 T cell-dependent IgE production in atopy*. Int. Arch. Allergy Immunol.; 112: 49-58

Lockey, R.F., Benedict LM, Turkeltaub PC und Bukantz SC, 1996. *Fatalities from immunotherapy (IT) and skin testing (ST)*. J. Allergy Clin. Immunol.; 79: 660-677

Maggi, E., Parronchi P, Manetti R, Simonelli C, Piccini MP, Rugiu FS, De Carli M, Ricci M und Romagnani S, 1992. *Reciprocal regulatory effect of IFN- α and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones*. J. Immunol.; 148: 2142-2147

Makela, M.J., Kanehiro A, Borish L, Dakhama A, Loader J, Joetham A, Xing Z, Jordana M, Larsen GL und Gelfand EW, 2000. *IL-10 is necessary for the expression of airway hyperresponsiveness but not pulmonary inflammation after allergic sensitization*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 97: 6007-6012

Marsh, D.G, Neely JD, Breazeale DR, et al., 1994. *Linkage analysis of IL-4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations*. Science; 264: 1152-1156

Marsh, D.G., Hsu SH, Roebber M, Erlich E, Kautzky, Freidhoff LR, Meyers DA, Pollard MK und Bias WB, 1982. *HLA-Dw2: A genetic marker for humane immune response to short ragweed pollen allergen Ra5. I. Response resulting primarily from natural antigen exposure*. J. Exp. Med.; 155: 1439-1451

Martinez, F.D., 1994. *Role of viral infections in the inceptions of asthma and allergies during childhood: could they be protective?* Thorax; 49: 1189-1191

Mayers, D., Postma DS, Panhysen CI, et al., 1994. *Evidence for a locus regulating total serum IgE levels mapping to chromosome 5.* Genetics; 23: 464-470

Maziak, W., Behrens T, Brasky TM, Duhme H, Rzehak P, Weiland SK und Keil U, 2003. *Are asthma and allergies in children and adolescents increasing? Results from ISAAC phase I and phase III surveys in Münster, Germany.* Allergy; 58(7): 572-579

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt P und Janeway CA Jr. 1997. *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity.* Nature; 388: 394-397

Michele, T.M., Kuperman D, Luyimbazi J, Santeliz JA, Bishai WR, und Wills-Karp M, 1999. *Heat-killed BCG reverses antigen induced airway hyperresponsiveness in a murine model of asthma.* Am. J. Respir. Crit. Care Med.; 159: A 510

Moffatt, M., Schou C, Faux JA, et al., 2001. *Association between quantitative traits underlying asthma and the HLA-DRB1 locus in a family-based population sample.* Eur. J. Hum. Genet.; 9: 341-346

Moore, K.W., de wall Malefyt R, Coffman RL und O'Garra A, 2001. *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor.* Annu. Rev. Immunol.; 19: 683-765

Mosmann, T., Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA und Coffman RL, 1986. *Two types of murine T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.* J. Immunol.; 136: 2348-2357

Murosaki, S. et al.; 1998. *Heat-killed lactobacillus plantarum L-137 suppresses naturally fed antigen-specific IgE production in mice.* J. Allergy Clin. Immunol.; 102: 57-64

Murphy, S., Bleecker ER, Boushey H, et al., 1997. *Practical guide for the diagnosis and management of asthma: based on the Expert Panel Report 2: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma.* Bethesda, MD.: National Heart, Lung, and Blood Institute; (NIH publication no. 97-4053)

NAEPP, N.A.E.a.P.P., 1999. National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) National Institutes of Health, USA.

Nelson, H.S., Lahr J, Rule R, Bock A, Leung D, 1997. *Treatment of anaphylactic sensitivity to peanuts by immunotherapy with injections of aqueous peanut extract.* J. Allergy Clin. Immunol.; 99: 744-751

Palmer, E.M. und Van Seventer, 1997. *Human T helper cell differentiation is regulated by the combined action of cytokines and accessory cell-dependent costimulatory signals.* J. Immunol.; 158: 2654-2662

Parviz, A-N., Häcker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM und Wagner H, 2002. *Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments.* Eur.J.Immunol.; 32: 1958-1968

Paul, W.E. und Seder RA, 1994. *Lymphocyte responses and cytokines.* Cell; 76: 241-251

Paul, W.E., 1991. *Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine.* Blood; 77: 1859-1870

Peng, Z., Wang H, Mao X, HayGlass KT und Simons FER, 2001. *CpG oligodeoxynucleotide vaccination suppresses IgE induction but may fail to down-regulate ongoing IgE responses in mice.* Int. Immunol.; 13: 3-11

Punnonen, J., Aversa G, Cocks BG und DeVries, 1994. *Role of interleukin-4 and interleukin-13 in synthesis of IgE and expression of CD23 by human B cells.* Allergy; 49: 576-586

Racioppi, L., Ronchese F, Matis LA und Germain R, 1993. *Peptide-major histocompatibility complex class II complexes with mixed agonist/antagonist properties provide evidence for ligand-related differences in T cell receptor-dependent intracellular signalling.* J. Exp. Med.; 181: 1569

Randolph, D.A., Carruthers CJ, Szabo SJ, Murphy KM und Chaplin DD, 1999. *Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific T_H1 and T_H2 cells in a mouse model of asthma.* J. Immunol.; 162: 2375

Raz, E., Tighe H, Sato Y, Corr M, Dudler JA, Roma M, Swain SL, Spiegelberg HL und Carson DA, 1996. *Preferential induction of Th₁ immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization.* Immunology; 93: 5141-5145

Reid, M.J., Lockey RF, Turkeltaub PC und Platts-Mills TA, 1993. *Survey of fatalities from skin testing and immunotherapy 1985-1989.* J. Allergy. Clin. immunol.; 92: 6-15

Riedler, J., Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, Carr D, Schierl R, Nowak D and von Mutius E, 2001. *Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey.* Lancet; 358: 1129-1133

Riedler, J., Eder W, Oberfeld G und Schreuer M, 2000. *Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization.* Clin. Exp. Allergy; 30: 194-200

- Rissoan, M., Soumelis V, Kadowaki N, et al., 1999. *Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation*. Science; 283: 1183-1186
- Romagnani, S., 1994. *Regulation of the development of type 2 T helper cells in allergy*. Curr. Opin. Immunol.; 6: 838-846
- Rook, G., Stanford JL, 1998. *Give us this day our daily germs*. Immunol. Today; 19: 113-116
- Rothenberg, M.E., 1998. *Eosinophilia*. N. Engl. J. Med.; 338: 1592-1600
- Sanderson, C.J., 1992. *Interleukin-5, eosinophils and disease*. Blood; 79: 3101-3109
- Schmitt, E.R., VanBrandwijk R, Fischer HG und Rude E, 1990. *Establishment of different T cell sublines using either interleukin 2 or interleukin 4 as growth factors*. Eur. J. Immunol.; 20: 1709-1715
- Secrist, H., Chelen CJ, Wen Y, Marshall JD und Umetsu DT, 1993. *Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals*. J. Exp. Med.; 178: 2123-2130
- Secrist, H., DeKruyff R und Umetsu D, 1995. *Interleukin 4 production by CD4+ T cells from allergic individuals is modulated by antigen concentration and antigen-presenting cell-type*. J. Exp. Med.; 182: 1081-1089
- Seder, R., Gazzinelle R, Sher A und Paul WE, 1993. *Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming*. J. Immunol.; 90: 10188-10192
- Sepp, E., Naaber P, Voor T, Mikelsaar M, Björkstén B, 2000. *Development of intestinal microflora during the first month of life in Estonian and Swedish infants*. Microbiol. Ecol. Health. Dis.; 12: 22-26
- Serebrisky, D., Teper AA, Huang GK, Lee SY, Zhang TF, Schofield BH, Kattan M, Sampson HA und Li X-M, 2000. *CpG oligodeoxynucleotides can reverse Th2-associated allergic airway responses and alter the B7.1/B7.2 Expression in a murine model of asthma*. J. Immunol.; 165: 5906-5912
- Shaheen, S.O., Aaby P, Hall AJ, Barker DJP, Heyes CB, Shiell AW und Goudaby A, 1996. *Measles and atopy in Guinea-Bissau*. Lancet; 347: 1792-1796
- Shakib, F., Schulz O und Sewell H 1998. *A mite subversive cleavage of CD23 and CD25 by Der pI enhances allergenicity*. Immunol. Today; 19: 313-316

Shirakawa, T., Enomoto T, Shimazu SI, und Hopkin JM, 1997. *Inverse association between tuberculin responses and atopic disorder*. Science; 275: 77-79

Shirota, H., Sano K, Kikuchi T, Tamura G und Shirato K, 2000. *Regulation of T-helper type 2 cell and airway eosinophilia by transmucosal coadministration of antigen and oligodeoxynucleotides containing CpG motifs*. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.; 22: 176

Shirota, H., Sano k, Kikuchi T, Tamura G und Shirato K, 2000. *Regulation of murine airway eosinophilia and Th2 cells by antigen-conjugated CpG oligodeoxynucleotides as a novel antigen-specific immunomodulator*. J. Immunol.; 164: 5575-5582

Siraganian R.P., 1998. *Biochemical events in basophil or mast cell activation and mediator release*. In: Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF Jr, Yunginger JW, Busse WW, eds. Allergy: principles & practice. 5th ed. Vol. 1 St. Louis: Mosby-Year Book: 204-227

Skadhauge, A.; Christensen K, Kyvik KO und Sigsgaard T, 1999. *Genetic and environmental influence on asthma: a population-based study of 11 688 Danish twin pairs*. Eur. Respir. J.; 13: 8-14

Smith, D., Malone DC, Lawson KA, Okamoto LJ, Battista C, Saunders WB, 1997. *A national estimate of economic costs of asthma*. Am. J. Respir. Crit. Care Med.; 165: 787-793

Snapper, C.M., Finkelman FD, Stefany d, Conrad DH und Paul WE, 1988. *IL-4 induces co-expression of intrinsic membrane IgG1 and IgE by murine B cells stimulated with lipopolysaccharide*. J. Immunol.; 141: 489

Steinberger, P., Bohle B, di Padova F, Wrann M, Liehl E Scheiner O, Kraft D und Valenta R, 1995. *Allergen-specific IgE production of committed B cells from allergic patients in vitro*. J. Allergy Clin. Immunol.; 96: 209

Strachan, D., 1989. *Hay fever, hygiene and household size*. B.M.J.; 299: 1259-1260

Strachan, D.P., 2000. *Family size, infection and atopy: the first decade of the „hygiene hypothesis“*. Thorax; 55: Suppl. 1: S2-S10

Strachan, D.P., Harkins LS, Golding J, 1997. *Sibship size and self-reported inhalant allergy among adult woman*. Clin. Exp. All.; 27: 151-155

Sur, S., Wild JS, Choudhury BK, Sur N, Alam R und Klinman DM, 1998. *Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides*. J. Immunol.; 162: 6284-6293

Szabo, S.J., Dighe AS, Gubler U und Murphy KM, 1997. *Regulation of the interleukin 12 receptor beta 2 subunit expression in developing Th1 and Th2 cells.* J. Exp. Med.; 185: 817-824

Tulic, M.K., et al., 2000. *Modification of the inflammatory response to allergen challenge after exposure to bacterial lipopolysaccharide.* Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.; 22: 604-612

Umetsu, D.T., Hahn JS, Perez-Atayde AR und Geha RS, 1985. *Serum sickness triggered by anaphylaxis: a complication of immunotherapy.* J. Allergy Clin. Immunol.; 76: 713-718

Van der Pouw-Kraan, T.C., Van der Zee JS, Boeije JC, De Groot ER, Stapel SO und Aarden LA, 1998. *The role of IL-13 in IgE synthesis by allergic asthma patients.* Clin. Exp. Immunol.; 111 (1): 129-135

Van Halteren, A.G., van der Cammen MJ, Cooper D, Savelkoul HF, Kraal G, und Holt PG, 1997. *Regulation of antigen specific IgE, IgG1 and mast cell responses in ingested allergen by mucosal tolerance induction.* J. Immunol.; 159: 3009

Van Herwerden, L., Harrap SB, Wong ZYH, et al., 1995. *Linkage of high-affinity IgE receptor gene with bronchial hyperreactivity, even in absence of atopy.* Lancet; 346: 894-900

Vannier, E., et al., 1991. *Lipopolysaccharide from Escherichia coli reduces antigen-induced bronchoconstriction in actively sensitized guinea pigs.* J. Clin. Invest.; 87: 1936-1944

Vijayaraghavan, R., Schaper, M., Thompson, R. und Alarie, Y. 1994. *Characterisation of the effects of an airborne mixture of chemicals acting at different areas of the respiratory tract in mice.* Arch. Toxicol.; 86: 490-99

Vijayaraghavan, R., Schaper, M., Thompson, R., Stock, M.F. und Alarie, Y. 1993. *Characteristic modifications of the breathing pattern of mice to evaluate the effects of airborne chemicals on the respiratory tract.* Arch. Toxicol.; 67(7): 478-490

Von Mutius E., Martinez FD, Fritsch C, Nicolai T, Roell G und Thiemann HH, 1994. *Prevalence of asthma an stopy in two areas of East and West germany.* Am. J. Respir. Crit. Care. Med.; 149: 358-364

Von Mutius, E., Fritsch C, Weiland SK, Roll G und Magnussen H, 1992. *Prevalence of asthma and allergic disorders among children in united Germany: a descriptive comparison.* B.M.J.; 305: 1395-1399

Von Mutius, E., Martinez FD, Fritsch C, Nicolai T, Reitmeir P und Thiemann HH, 1994. *Skin test reactivity and number of siblings.* B.M.J; 308: 692-695

Von Mutius, E., Weiland SK, Fritsch C, Duhme H und Keil U, 1998. *Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany*. Lancet; 351 (9106): 862-866

Wahn, U., Lau S, Bergmann R, et al., 1997. *Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during first three years of life*. J. Allergy Clin. Immunol.; 99: 763-769

Walker, C., Bode E, Boer L, Hansel TT, Blaser K und Virchow JC Jr, 1992. *Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage*. Am. Rev. Respir. Dis.; 146: 109-115

Wang, C.C. und Rook GA, 1998. *Inhibition of an established allergic response to ovalbumin in BALB/C mice by killed Mycobacterium vaccae*. Immunology; 93: 307-313

Wickmann, E. G., Egmar AC, Axelsson G und Pershagen G, 1994. *Reduced mite allergen levels in dwellings with mechanical exhaust and supply ventilation*. Clin. Exp. All.; 24: 1164-1168

Wilder, J.A., Collie DD, Wilson BS, Bice DE, Lyons CR und Lipscomb MF, 1999. *Dissociation of airway hyperresponsiveness from immunoglobulin E and airway eosinophilia in a murine model of allergic asthma*. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.; 20(6): 1326-1334

Yamamoto, S., Kuramoto E, Shimada S und Tokunaga T, 1988. *In vitro augmentation of natural killer cell activity and production of interferon- α and β with deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG*. Jpn. J. Cancer. Res.; 79: 866-873

Yamamoto, T., Yamamoto S, Kataoka T, Komuro K, Kohase M und Tokunaga T, 1994. *Synthetic oligonucleotides with certain palindromes stimulate interferon production of human peripheral blood lymphocytes in vitro*. Jpn. J. Cancer. Res.; 85: 775-779

Yanagihara, Y., Kajiwaru K, Basaki Y, Ikizawa K, Akiyama K und Saito, 1997. *Induction of human IgE synthesis in B cells by a basophilic cell line, KU812*. Clin. Exp. Immunol.; 108 (2): 295-301

Yang, X., Wang S, Fan Y und Han X, 2000. *IL-10 deficiency prevents IL-5 overproduction and eosinophilic inflammation in a murine model of asthma-like reaction*. Eur. J. Immunol.; 30: 382-391

Yeung, V.P., et al., 1998. *Heat-killed Listeria monocytogenes as an adjuvant converts established murine Th1-dominated immune responses into Th1-dominated responses*. J. Immunol.; 161: 4146-4152

Young, R., Dekker JW, Wordsworth BP, et al.; 1994. *HLA-DR and HLA-DP genotypes and immunoglobulin E responses to common major allergens*. Clin. Exp. All.; 24: 431-439

Zimmermann, S., Egeter O, Hausmann S, Lipford GB, Rocken M, Wagner H und Heeg, 1998. *CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis*. J. Immunol.; 160: 3627

Zuany-Amorim, C., Sawicka E, Manilus C, Le Moine A, Brunet LR, Kemeny DM, Bowen G, Rook K und Walker C, 2002. *Suppression of airway eosinophilia by heat killed Mycobacterium vaccae- induced allergen specific regulatory T-cells*. Nat. Med.; 8: 625-629

Zuany-Amorim, C., Sawicka E, Manlius C, Le Moine A, Brunet LR, Kemeny DM, Bowen G, Rook G und Walker C, 2002. *Suppression of airway eosinophilia by killed Mycobacterium vaccae- induced allergen-specific regulatory T-cells*. Nat. Med.; 8: 625-629

ANHANG

1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Konzept der T-Helfer Effektorsubpopulationen.....	14
Abbildung 2:	Interaktion der pathophysiologisch wichtigsten Zellen beim allergischen Asthma (Modifiziert nach Busse, W.W. und Lemanske R.F.; 2001. <i>Asthma. N. Engl. J. Med.</i> ; 5: 350-362).....	19
Abbildung 3:	Toll-like Rezeptoren und ihre möglichen Liganden am Beispiel eines Makrophagen.....	21
Abbildung 4:	Konzept der Wirkung mikrobieller Stimuli auf die Entwicklung des allergischen Phänotyps.....	22
Abbildung 5:	Versuchsprotokoll für den „prophylaktischen“ Ansatz.....	28
Abbildung 6:	Protokoll für die etablierte Atemwegsentzündung und die „klassische“ Immuntherapie.....	29
Abbildung 7:	Versuchsprotokoll für den „therapeutischen“ Ansatz.....	30
Abbildung 8:	Schema der Messapparatur zur Erfassung der Lungenfunktion.....	45
Abbildung 9:	Immunglobulintiter nach Sensibilisierung und nach Immunmodulation.....	49
Abbildung 10:	Zelldifferenzierung aus der broncho-alveolären Lavage.....	52
Abbildung 11/1:	Histologische Lungenpräparate Färbung HE.....	55
Abbildung 11/2:	Histologische Lungenpräparate Färbung PAS.....	56
Abbildung 11/3:	Anzahl eosinophile Granulozyten im High-Power-Field	54
Abbildung 12:	Messung der bronchialen Hyperreagibilität mittels Head-Out Body-Plethysmographie.....	58
Abbildung 13:	Immunglobulintiter nach Immunmodulation mit ISS versus konservativer IT.....	61
Abbildung 14:	Messung der bronchialen Hyperreagibilität mittels Head-Out Body-Plethysmographie.....	64
Abbildung 15:	Immunglobulintiter nach Immuntherapie mit ISS-Adsorbat, ISS in wässriger Lösung und konservativer IT.....	66
Abbildung 16:	Messung der bronchialen Hyperreagibilität mittels Head-Out Body-Plethysmographie.....	70
Abbildung 17:	Konzept der Wirkung von CpG-Motiven auf die Entwicklung des allergischen Phänotyps.....	80

2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Gruppenübersicht für den „prophylaktischen“ Ansatz.....	28
Tabelle 2:	Gruppenübersicht für die etablierte Atemwegsentzündung und die „klassische“ Immuntherapie.....	29
Tabelle 3:	Gruppenübersicht für den „therapeutischen“ Ansatz.....	30
Tabelle 4:	Zusammenschau der wichtigsten ableitbaren Paramater bei der Head-Out Body-Plethysmographie.....	47
Tabelle 5:	Synoptische Darstellung der Effekte einer konventionellen Immuntherapie (OVA-OVA _{IT}), im Vergleich zur Therapie mit OVA-ISS und einer Kontroll-Sequenz (OVA-ISS _{ctrl}).....	63
Tabelle 6:	Zytokinmessungen im Überstand der Zellkultur.....	68
Tabelle 7:	Messung intrazellulär akkumulierter Zytokine in mononukleären Zellen der Milz.....	69

3 Abkürzungsverzeichnis

AAAAI	American Acadmy of Allergy, Asthma and Immunology
AHR	Atemwegshyperreagibilität
Al[OH ₃]	Aluminium-Hydroxid
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
BAL	Broncho-Alveoläre Lavage
BCG	Bacille Calmette-Guérin
BSA	Bovines Serumalbumin
C57Bl/6	C57 Black 6 (schwarzer Mäusestamm)
CBA	Cytometric-Bead-Array
CDX+	positiv für Cluster of differentiation NrX
CDX-	negativ für Cluster of differentiation NrX
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
DNA	Desoxyribonuclein Acid
DZ	Dentritische Zelle
EF50	Expiratory Flow (Expir. Mittelfluß)
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
FACS	Fluorescence-Activated-Cell-Sorting
FITC	Fluorescein-isothiocyanat

GM-CSF	Granulocyte-Makrophage-Colony-Stimulating-Factor
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPF	High-Power-Field
IFN-X	Interferon-X
IgX	Immunglobulin der Klasse X
IL-X	Interleukin-X
ISS	Immunstimulierende Sequenz
IT	Immuntherapie
LPS	Lipopolysaccharid
MCh	Metacholin
MÖ	Makrophage
NIL	Unbehandelte Kontrolle
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
ODN	Oligodeoxynucleotide
OVA	Ovalbumin (Hühnereiweis)
P/I	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PAS	Perjodsäure-Schiff-Reagenz
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
POD	blaues Farbsubstrat
SEM	standard error of the mean
SIT	spezifische Immuntherapie
TCR	T-Zell Rezeptor
TGF-X	transforming growth factor-X
Th1	T-Helferzelle vom Typ 1
Th2	T-Helferzelle vom Typ 2
Th3	T-Helferzelle vom Typ 3 (regulatorische T-Zelle)
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	3,3',5,5' - Tetramethylbenzidin

5 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen und Herren: Professoren und Privatdozenten:

Annala, Arnold, Aumüller, Bach, Barth, Basler, Baum, Becker, Berthold, Czubayko, Eilers, Daut, Feuser, Gemsa, Geuss, Görg, Gotzen, Griss, Grzeschik, Gudermann, Hafkemayer, Happle, Hasilik, Heeg, Heinonen, Hellinger, Herz, Hofmann, Hörle, Järvinen, Jungclas, Kern, Kirkinen, Klenk, Klose, König, Koolmann, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lagerstedt, Lammel, Lang, Lange, Lääperi, Lohoff, Maisch, Maier, Mäki, Meier, Moll, Moosdorf, Mustonen, Mutters, Müller, Neubauer, Niemeläinen, Nordback, Numminen, Oertel, Pakkala, Peter, Pfeiffer, Pukander, Prinz, Radsak, Rahko, Rautiainen, Remschmidt, Renz, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schieting, Schmidt, Schnabel, Schneyer, Schüffel, Seitz, Seyberth, Sikkinen, Steiniger, Sundermaier, Tammela, Tomás, Vihtonen, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Werner, Westermann, Weihe, Wulff, Ylitalo.

6 Danksagung

Diese Arbeit wurde unter Anleitung von PD Dr. Udo Herz angefertigt. Herrn Herz möchte ich an dieser Stelle ausdrücklich für die engagierte, intensive und geduldige Betreuung danken, welche über die kritische wissenschaftliche Durchsicht und Diskussion des Manuskripts hinaus von einer stets freundschaftlichen Atmosphäre geprägt war.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Harald Renz, dem Leiter der Abteilung für klinische Chemie und molekulare Diagnostik für die Überlassung des Themas. Mit seinen hervorragenden wissenschaftlichen Ratschlägen und effizienter Unterstützung begleitete er mich während des gesamten Projektes.

Gedankt sei auch dem Unternehmen AllergoPharma, namentlich Herrn Prof. Dr. Helmut Fiebig, für wissenschaftliche Begleitung und finanzielle Unterstützung des Projektes.

Herrn Dr. Holger Garn und Herrn Michael Wegmann danke ich ausdrücklich für die kritische und konstruktive Durchsicht des Manuskripts.

Ein ganz besonders großer und herzlicher Dank geht an die Mitarbeiter der Forschungsabteilung, insbesondere an Brigitte Auffahrt und Verena Kräling, deren unermüdlicher Einsatz maßgeblich zum Gelingen des Projektes beigetragen hat. Aber auch Salima Mrabet-Dhabi, Berit Schumann, Dr. Serdar Sel, Anja Spies und Wilma Hastedt danke ich für ihre praktische Unterstützung, stete Hilfsbereitschaft, die zahlreichen guten Tips und die gemeinsamen Unternehmungen auch außerhalb des Labors.

Den Doktoranden Björn Gebhardt, Sebastian Koch, Alexander Ritter, Achim Spenner und Michael Wegmann möchte ich für die gute Einarbeitung, die außergewöhnliche Hilfsbereitschaft und die stets offenen Ohren für wissenschaftliche- und außerwissenschaftliche Diskussionen danken.

Schließlich danke ich ganz herzlich meinen Eltern Pirjo und Dr. Bernd Liller sowie meinen engen Freunden, die mit mir alle Phasen der Entstehung dieser Arbeit geteilt haben und mir über Jahre ihr Verständnis, ihre Nachsicht und Unterstützung haben zuteil werden lassen.