

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. H. Renz

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

# **Zur Initiation, Progression und Chronifizierung des allergischen Asthma bronchiale**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Michael Wegmann**  
aus Münster i.W.

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

Am 7.12.2005 gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. med. H. Renz

1. Coreferent: Prof. Dr. med. C. Vogelmeier

2. Coreferent: Prof. Dr. med. E. P. Rieber

## Inhaltsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| <b>1. Einleitung</b>   | 06 |
| 1.1 Asthma bronchiale als zentrale Manifestation   | 06 |
| 1.1.1 Epidemiologie  | 06 |
| 1.1.2 Genetik  | 07 |
| 1.1.3 Exogene Faktoren   | 08 |
| 1.1.4 Pathophysiologie   | 12 |
| 1.1.5 Immunpathogenese   | 13 |
| 1.2 Asthma bronchiale als Modellerkrankung für eine chronische Entzündung<br>und Remodelling   | 18 |
| 1.2.1 Airway Remodelling des Asthma bronchiale   | 19 |
| 1.2.2 Lungenfunktionelle Konsequenzen  | 21 |
| 1.3 Stand der tierexperimentellen Asthmodelle  | 23 |
| 1.3.1 Tiermodelle für die akute Entzündungssituation   | 23 |
| 1.3.2 Tiermodelle für die chronische Entzündungssituation  | 26 |
| 1.3.3 Lungenfunktionsmessung im Mausmodell   | 27 |
| 1.4 Hypothesen   | 29 |
| <br>   |    |
| <b>2. Tiere, Protokolle, Material und Methoden</b>   | 32 |
| 2.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung  | 32 |
| 2.2 Protokolle zur Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung   | 32 |
| 2.2.1 Induktion einer akuten allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge<br>und Immunmodulation während der Sensibilisierungsphase | 32 |
| 2.2.2 Induktion einer sekundären allergischen Immunantwort in der Lunge<br>und Immunmodulation während des Antigenkontakts           | 34 |
| 2.2.3 Etablierung einer chronischen allergischen Entzündung der<br>Atemwege und Applikation eines CCR-3-Antagonisten                 | 34 |
| 2.3 Gewinnung von Probenmaterial   | 36 |
| 2.3.1 Gewinnung von Serumproben  | 36 |
| 2.3.2 Broncho-alveoläre Lavage   | 36 |
| 2.3.3 Peritoneale Lavage   | 37 |
| 2.4 Zellzählung und Differenzierung von Leukozytensubpopulationen der<br>BAL und PL  | 37 |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.5 Lungenhistologie   | 38        |
| 2.6 Immunhistologie  | 39        |
| 2.7 Lungenpräparation unter standardisierten Bedingungen für die<br>Elektronenmikroskopie        | 39        |
| 2.8 Konzentrationsbestimmung von Zytokinen mittels Cytometric Bead<br>Array (CBA)                | 40        |
| 2.9 Konzentrationsbestimmung von Zytokinen mittels Enzyme-linked<br>Immuno Sorbent Assay (ELISA) | 40        |
| 2.10 Messung der Atemwegsreagibilität gegenüber $\beta$ -Methyl-Acetylcholin                     | 41        |
| 2.10.1 Aufbau der Messapparatur  | 42        |
| 2.10.2 Messablauf  | 43        |
| 2.11 Perfusion der Lunge   | 43        |
| 2.12 Herstellung einer Lungenzellsuspension  | 44        |
| 2.13 Herstellung einer Milzzellsuspension  | 44        |
| 2.14 Leukozytenseparation durch Dichtegradienten-Zentrifugation                                  | 45        |
| 2.15 Kurzzeitstimulation der MNC-Kultur  | 45        |
| 2.16 Aufreinigung $CD4^+$ T-Lymphozyten durch Magnet-Bead-Separation                             | 46        |
| 2.17 FACS-Analyse der Lymphozytensuspension  | 46        |
| 2.18 RNA-Aufreinigung aus einer Einzelzellsuspension und DNase-Verdau                            | 47        |
| 2.19 RNA-Quantifizierung und Qualitätsanalyse  | 47        |
| 2.20 Reverse Transkription   | 48        |
| 2.21 Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)  | 48        |
| 2.22 mRNA-Amplifikation  | 49        |
| 2.22.1 Erststrang-DNA-Synthese   | 49        |
| 2.22.2 Zweitstrang-DNA-Synthese  | 49        |
| 2.22.3 dsDNA-Aufreinigung  | 49        |
| 2.22.4 aRNA-Synthese: T7 <i>in vitro</i> Transkription   | 50        |
| 2.23 DNA-Markierung für die Transkriptom-Analyse   | 50        |
| 2.24 Hybridisierung der DNA auf dem Gene-Array-Chip und Auswertung                               | 50        |
| 2.25 Statistik   | 51        |
| <b>3. Ergebnisse</b>   | <b>53</b> |
| 3.1 Die TLR-3- bzw. TLR-7-Aktivierung verhindert die allergische<br>Sensibilisierungsreaktion    | 53        |

|   |            |
|---|------------|
| 3.2 Die TLR-3- bzw. TLR-7-Aktivierung supprimiert die sekundäre allergische Entzündungsreaktion in der Lunge                              | 58         |
| 3.3 Die TLR-3- bzw. TLR-7-Aktivierung haben unterschiedliche immun-modulierende Effekte auf die TH <sub>2</sub> -gesteuerte Immunreaktion | 64         |
| 3.4 Interleukin 12 (IL-12) ist an der Mediation des supprimierenden Effekts viraler TLR-Liganden auf das experimentelle Asthma beteiligt  | 66         |
| 3.5 Eine chronische Allergenexposition induziert eine chronische Atemwegsentzündung in der sensibilisierten BALB/c-Maus                   | 73         |
| 3.6 Die chronische Atemwegsentzündung ist mit strukturellen Veränderungen der Atemwege assoziiert   | 81         |
| 3.7 Die chronische Atemwegsentzündung und das Airway remodeling sind mit einer Veränderung der Lungenfunktion assoziiert                  | 85         |
| 3.8 Eosinophile Granulozyten spielen eine zentrale Rolle innerhalb des Chronifizierungsprozesses des allergischen Asthmas                 | 86         |
| <b>4. Diskussion</b>  | <b>92</b>  |
| <b>5. Literatur</b>   | <b>117</b> |
| <b>6. Abkürzungsverzeichnis</b>   | <b>140</b> |
| <b>7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>   | <b>144</b> |
| <b>8. Publikationsverzeichnis aus der Dissertation</b>  | <b>147</b> |
| <b>9. Zusammenfassung</b>   | <b>149</b> |
| <b>10. Verzeichnis der akademischen Lehrer</b>  | <b>151</b> |
| <b>11. Curriculum vitae</b>   | <b>152</b> |
| <b>12. Publikationen</b>  | <b>153</b> |
| <b>13. Erklärung</b>  | <b>154</b> |
| <b>14. Danksagung</b>   | <b>155</b> |

## 1. Einleitung

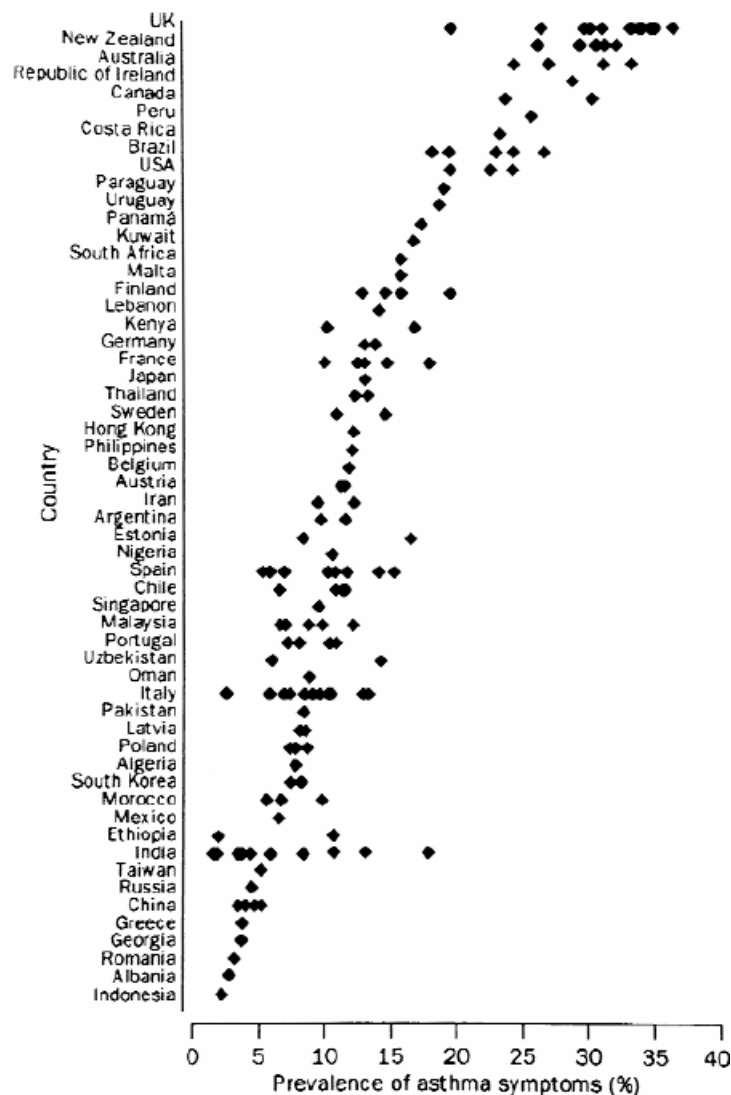
### 1.1 Asthma bronchiale als zentrale Manifestation

Das Asthma bronchiale ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege, deren Prävalenz in den letzten 20 Jahren vor allem in den Industrieländern stark angestiegen ist (Beasley, 1998), und somit erheblich an volkswirtschaftlicher Bedeutung gewonnen hat. Die Ursachen für die Ausbildung des Asthma bronchiale lassen sich in nicht allergische, die das sogenannte intrinsische Asthma induzieren können, sowie allergische Faktoren, die das allergische Asthma auslösen können, unterteilen. Mehr als 85% aller Asthmaerkrankungen lassen sich dabei auf allergische Faktoren zurückführen (Romanet-Manet, 2002), zu denen vor allem Aeroallergene wie Hausstaubmilbenkot, Katzenepithelien und Birken-, sowie Gräserpollen gehören. Klinisch äußert sich das Asthma bronchiale durch anfallsweise auftretende Atemnot und eine Atemwegsüberempfindlichkeit gegenüber unspezifischen Reizen unterschiedlicher Natur. Die dieser Symptomatik zugrundeliegenden pathogenetischen Mechanismen sind bisher nicht vollständig aufgeklärt. Aktuelle Konzepte sehen Atemnot und Atemwegsüberempfindlichkeit als Folge der chronischen Entzündungsreaktion in den Atemwegen, für die die Infiltration von eosinophilen Granulozyten und T-Helfer-Zellen des Typs 2 (TH<sub>2</sub>) charakteristisch ist (Cohn, 2004). TH<sub>2</sub>-Zytokine wie Interleukin-4 (IL-4), IL-5 und IL-13 lassen sich mit weiteren typischen Merkmalen des Asthma bronchiale, wie einer erhöhten Mukusproduktion und einem strukturellen Umbau des Atemwegsgewebes („*airway remodelling*“) in Verbindung bringen (Lee, 1997; Zhu, 1999), so dass TH<sub>2</sub>-Zellen eine zentrale Rolle bei der Regulation der asthmatischen Entzündungsreaktion zugeschrieben wird.

#### 1.1.1 Epidemiologie

Epidemiologische Studien wie ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) und ECHRS (European Community Respiratory Health Survey) stellten für die vergangenen 20-30 Jahre einen deutlichen Anstieg der Inzidenz und der Prävalenz des Asthma bronchiale in den industrialisierten Ländern fest (ISAAC, 1998, ECHRS, 1996). Innerhalb von Europa liegt die Prävalenz durchschnittlich bei 8,6% (European Lung White Book, 2003), wobei

deutliche Unterschiede zwischen den westeuropäischen und den osteuropäischen, ehemaligen Ostblockstaaten bestehen. Mit einer Prävalenz von 10% bei Kindern in Deutschland ist das allergische Asthma die häufigste chronische Erkrankung in dieser Altersgruppe (Maziak, 2003). Weltweit sind etwa 155 Millionen Menschen vom allergischen Asthma bronchiale betroffen (Asher, ISAAC, 1995).



**Abb. 1.1.1 Ein-Jahres-Prävalenz asthmatischer Symptome in 13-14-jährigen Jugendlichen** (Nach: World wide variation in prevalence in asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. Lancet 1998; 351: 1225-32).

### 1.1.2 Genetik

Dem allergischen Asthma bronchiale liegt eine komplexe Ätiologie zugrunde, die neben einer genetischen Prädisposition weitere exogene Faktoren umfasst, die

auf die Genese des allergischen Phänotyps einwirken können. Physiologisch-pharmakologische und genetische Studien haben eine Reihe von Kandidatengenomen identifiziert, die für Faktoren kodieren, die innerhalb der allergischen Entzündungsreaktion, der Atemwegsüberempfindlichkeit und der Regulation des Serumspiegels an Immunglobulin E (IgE) eine wesentliche Rolle spielen (Hershey, 1997; Robinson, 1992). Allerdings konnte bisher aufgrund der Komplexität der Interaktion dieser Faktoren innerhalb des Krankheitsgeschehens eine direkte Kausalität zwischen den einzelnen genetischen Variationen wie single nucleotide polymorphisms (SNP`s) und dem Krankheitsphänotyp nicht nachgewiesen werden.

Derzeit sind SNP`s von 64 verschiedenen Genloci beschrieben, die mit der Entstehung des allergischen Asthma bronchiale in Verbindung gebracht werden können (Hoffjan, 2003). Dabei sind einige Genregionen von besonderem Interesse, da sie in verschiedenen Studien mit der Ausbildung eines asthmatischen Phänotyps korrelieren. Zu diesen Genregionen gehören Chromosom 5, auf dem die Gene lokalisiert sind, die für die Zytokine IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 kodieren (Daniels, 1996; Marsh, 1994; Heinzmann, 2000). Diese Zytokine werden von TH<sub>2</sub>-Zellen produziert und haben somit wichtige regulatorische Funktionen innerhalb der Asthmapathogenese. Ferner sind von Bedeutung das Chromosom 11, 12 und 16, auf den Gene lokalisiert sind, die für die  $\beta$ -Kette des hochaffinen IgE-Rezeptors (F<sub>ce</sub>RI) (Hizawa, 2000), den stem cell factor (SCF), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Barnes, 1996), den signal transducer and activator of transcription-6 (STAT-6) (Gao, 2000) sowie für den IL-4-Rezeptor (IL-4R) (Sandford, 2000) kodieren. Weitere Studien konnten ferner genetische Variationen des *major histocompatibility complex class II* (MHC II) (Ober, 2000) und der  $\alpha$ -Kette des T-Zell-Rezeptors (TCR) (Moffatt, 1997), die eine wesentliche Rolle bei der Antigenpräsentation spielen, mit dem Auftreten des allergischen Asthma bronchiale in Verbindung bringen.

### **1.1.3 Exogene Faktoren**

Für die Erklärung der dramatischen Zunahme der Prävalenz des allergischen Asthma bronchiale reicht das Vorhandensein einer genetischen Prädisposition allein nicht aus. Umweltfaktoren und die über die letzten Jahrzehnte veränderten Lebensbedingungen in den industrialisierten Ländern scheinen ebenfalls einen



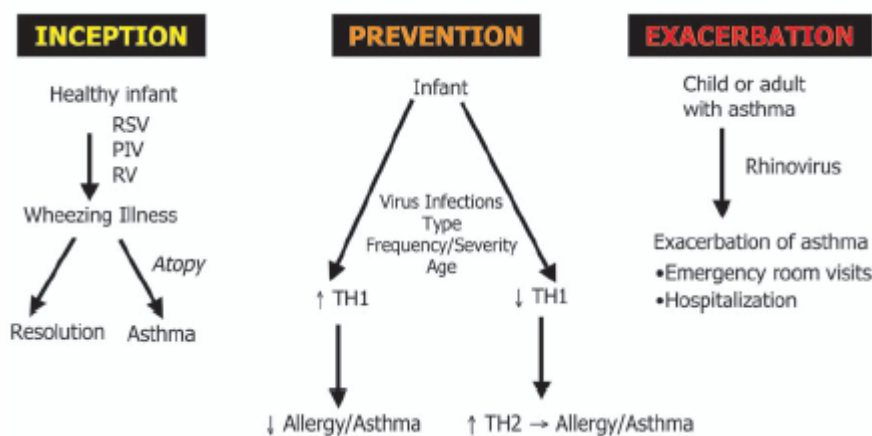
erheblichen Einfluss auf die Initiation dieser Erkrankung zu haben (D'Amato, 2000).

Epidemiologische Studien an der ost- bzw. westdeutschen Bevölkerung nach der Wiedervereinigung konnten innerhalb einer genetisch weitgehend identischen Bevölkerungsgruppe eine Reihe von exogenen Faktoren identifizieren, die mit der Entwicklung des allergischen Asthma bronchiale assoziiert sein könnten (von Mutius, 1994). Neben Faktoren des sozialen Umfeldes (von Mutius, 1992; Krämer, 1999; Wickmann, 1994), scheinen auch Ernährungsgewohnheiten (von Mutius, 1998) und die Allergenexposition (Wahn, 1997) eine bedeutende Rolle zu spielen.

Eine besondere Rolle für die Entwicklung des allergischen Asthma bronchiale spielen virale oder bakterielle Infektionen. Allerdings ist die Bedeutung von Pathogenen für die Initiation dieser Erkrankung vielfältig und bislang nicht vollständig geklärt. Im Rahmen der Hygiene-Hypothese (Strachan, 1989) wird für bakterielle Infektionen eine eher protektive Rolle angenommen. So geht der Anstieg der Prävalenz des allergischen Asthma bronchiale einher mit ständig verbesserten hygienischen Verhältnissen und damit mit einer verringerten Häufigkeit von frühkindlichen Infektionen. Epidemiologische Studien konnten eine negative Korrelation zwischen der Häufigkeit von Infektionen durch *Toxoplasma gondii* und *Helicobacter pylori* und der Häufigkeit von allergischem Asthma bronchiale belegen (Matricardi, 2000; Linneberg, 2003). Diesbezüglich von besonderer Bedeutung ist die Exposition gegenüber bakteriellen Endotoxinen, wie z.B. Lipo-Polysaccharid (LPS) und Staphylococcal-Enterotoxin B (SEB). Bakterielle Infektionen verbreiten sich unter unhygienischen Bedingungen, wie sie in Ballungsgebieten ärmerer Länder vorkommen sehr schnell und bedeuten zusätzlich zur eigentlichen Infektion auch eine erhöhte Exposition gegenüber mikrobiellen Produkten. Innerhalb einer großen Bandbreite von mikrobiellen Produkten konnte bislang nur für die Endotoxine, eine Gruppe von Lipopolysacchariden (LPS) an der Zelloberfläche gramnegativer Bakterien eine Korrelation zwischen erhöhter LPS-Exposition im Kindesalter und verringertem Auftreten von Asthma bronchiale dargestellt werden (Riedler, 2001; Braun-Fahrlander, 2002). Die Interaktion zwischen der Endotoxinkomponente Lipid A und Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, die sogenannten *Toll-like* Rezeptoren (TLR), spielt eine ganz wesentliche Rolle bei der Induktion einer TH<sub>1</sub>-

dominierten Immunantwort auf die Exposition mit Endotoxinen (Heumann, 2002). Ein solcher immun-moduierender Effekt konnte im Tiermodell sowohl für LPS als auch für weitere bakterielle TLR-Liganden, wie bakterielle DNA, die im Gegensatz zur Eukaryoten-DNA einen viel höheren Gehalt an unmethylierten GpG-Motiven hat, und Beta(1→3)-Glykan gezeigt werden (Gehring, 2001; Roy, 2003).

## Relationship of Viral Infections to Asthma Pathogenesis



**Abb. 1.1.3 Implikation viraler Atemwegsinfektionen beim allergischen Asthma** (Nach: Lemanske RF. Viral infections and asthma inception. J Allergy Clin Immunol 2004; 114: 1023-6).

Während in den letzten Jahren die Rolle bakterieller Infektionen und vor allem die immun-modulatorische Wirkung bakterieller TLR-Liganden auf das allergische Asthma eingehend charakterisiert wurde, ist über den Einfluss viraler Infektionen auf die Initiation und die Exazerbation dieser Erkrankung relativ wenig bekannt. Verschiedene epidemiologische Studien konnten zeigen, dass virale Infektionen des Respirationstrakts auf drei verschiedene Weisen mit dem allergischen Asthma bronchiale assoziiert sein können. Erstens impliziert der Beginn eines allergischen Asthma in früher Kindheit die Beteiligung einiger Viren, wie verschiedene Rhinoviren, dem *Respiratory Syncytial Virus* (RSV) oder dem Metapneumovirus, (Openshaw, 2003; Williams, 2004; Kotaniemi-Syrjanen, 2003). Dabei spielen Infektionen mit RSV, einen Paramyxovirus mit einzelsträngigem RNA-Genom, durch ihre Häufigkeit eine besonders große Rolle und stellen einen Risikofaktor für die spätere Entwicklung eines allergischen Asthmas dar (Sigurs,

2000). Neben einer Persistenz dieser Viren im kindlichen Respirationstrakt wird eine genetische Suszeptibilität, insbesondere durch Gene, die für Charakteristika eines atopischen Phänotyps kodieren, diskutiert. Interessant sind diese Beobachtungen vor allem, weil die Durchseuchungsrate mit RSV bei Kindern unter zwei Jahren nahezu 100% beträgt, während die Prävalenz für allergisches Asthma in der Bevölkerung weniger als 10% umfasst (Maziak, 2003). Zweitens wirken sich wiederholte virale Infektionen der Atemwege, wie sie in Kindertagesstätten oder in Haushalten mit mehreren Säuglingen auftreten, paradoxerweise reduzierend auf das Langzeitrisiko aus, an Allergien oder an allergischem Asthma zu erkranken (Juntti, 2003). Nicht nur Virus-Infektionen der Atemwege, sondern auch eine Hepatitis-A-Virus-(HAV-) oder Masernvirus-Infektion scheinen einen protektiven Effekt gegenüber der Entwicklung atopischer Erkrankungen zu haben (Matricardi, 1997, Shaheen, 1996). Drittens spielen virale Infekte der oberen Atemwege bei Patienten mit bereits etabliertem Asthma eine ganz wesentliche Rolle bei der Induktion einer akuten Asthma-Exazerbation, die eine deutliche Verschlechterung der Krankheitssituation und damit einen Krankenhausaufenthalt nach sich ziehen kann (John, 2003). Bisher sind die pathogenetischen Mechanismen, die diesen z.T. paradoxen epidemiologischen Beobachtungen zugrunde liegen, nicht geklärt. Möglicherweise spielt die Aktivierung der angeborenen Immunität über eine virale Interaktion mit TLR`s eine wesentliche Rolle bei der Protektion gegenüber der Entwicklung allergischer Erkrankungen, denn neben bakteriellen Produkten, sogenannten *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMP), stellen auch virale Produkte Liganden für TLR`s dar. Bei vielen RNA-Viren bilden einzelsträngige RNA-Moleküle (ssRNA) das Genom, welches sich ebenso wie die DNA von Bakterien durch einen hohen Gehalt von unmethylierten CpG-Motiven von der Säugetier-RNA unterscheidet, und kann über Interaktion mit TLR-7 dendritische Zellen (DC) aktivieren (Lund, 2004). Bei der Replikation von ssRNA-Viren entstehen als Zwischenprodukt in vielen Fällen doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA), die in Eukaryoten nicht vorkommt. DsRNA wird von verschiedenen antigen-präsentierenden Zellen (APC), wie Makrophagen und DC`s, über Bindung an TLR-3 erkannt (Edelmann, 2004) und ist damit ebenfalls ein PAMP, das die angeborene Immunantwort aktivieren kann.

**Tab. 1.1.3 Toll-like Rezeptor-Liganden und ihr Einfluss auf die Pathologie des allergischen Asthma bronchiale** (Nach: Eisenbarth SC. Understanding asthma pathogenesis: linking innate and adaptive immunity. Cur opin Pediatrics 2004; 16: 659-66)

| Mammalian TLR                  | Host defense/function   | Selected natural ligands                       | Purified or artificial ligands         | Signaling pathways               | Promotes (↑) or inhibits (↓) asthmatic inflammation | Study                       |
|--------------------------------|---|--|--|----------------------------------|---|-----------------------------|
| TLR1<br>TLR2                   | See TLR2<br>Gram + bacteria, mycobacteria, yeast, spirochetes | LTA, PGN, lipoproteins, zymosan, glycolipids   | Pam3Cys, lipopeptides                  | MyD88, TIRAP                     | ↑↓  | [29, 31]                    |
| TLR3<br>TLR4                   | Virus<br>Gram – bacteria                                      | dsRNA<br>LPS, LTA                              | Poly(I:C)<br>Lipid A                   | TRIF<br>MyD88, TIRAP, TRAM, TRIF | ?<br>↑↓   | [44]<br>[14, 18, 20, 44]    |
| TLR5<br>TLR6<br>TLR7           | Flagellated bacteria<br>See TLR2<br>Virus                     | Flagellin<br>?<br>ssRNA in mice                | FlaC<br>?<br>Poly(U), imiquimod, R-848 | MyD88<br>?<br>MyD88              | ↑<br>?<br>?   | [33]<br>[67*, 68*]          |
| TLR8<br>TLR9<br>TLR10<br>TLR11 | Virus<br>Bacteria and virus<br>?<br>Uropathogenic bacteria    | ssRNA in humans<br>CpG motifs in DNA<br>?<br>? | Imiquimod<br>ISS<br>?<br>?             | ?<br>MyD88<br>?<br>MyD88         | ?<br>↓<br>?<br>?                                    | [67*]<br>[44]<br>?<br>[69*] |

Note that toll-like receptor (TLR1) and TLR6 pair with TLR2 for functionality and are therefore not listed separately.  
dsRNA, double-stranded RNA; GFP, green fluorescence protein; ISS, immunostimulatory sequence; LPS, lipopolysaccharide; LTA, lipoteichoic acid; PGN, peptidoglycan; ssRNA, single-stranded RNA; TIRAP, TIR-domain-containing adaptor protein; TRAM, TRIF-related adaptor molecule; TRIF, TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN-beta.

### 1.1.4 Pathophysiologie

Das Asthma bronchiale ist eine chronische-entzündliche Erkrankung der Atemwege, zu deren Entstehung eine Vielzahl von Zellen, wie Mastzellen, eosinophile Granulozyten und T-Lymphozyten, beitragen. In suszeptiblen Individuen verursacht die allergische Entzündung vor allem nachts und früh morgens immer wiederkehrende Episoden von Stenoseatmung, Atemnot und Husten. Diese Symptome sind typischerweise verbunden mit einer anfallsweise auftretenden, spontan oder nach Therapie reversiblen Atemwegsobstruktion, basierend auf einer erhöhten Bereitschaft der kleinen und mittleren Atemwege auf unspezifische Reize mit einer Konstriktion der glatten Atemwegsmuskulatur zu reagieren (WHO workshop-report, 1995). Ursachen für das Auftreten des symptomatischen Asthma-Anfalls und die damit verbundene Atemwegsentzündung sind neben Allergenen (Platt-Mills, 1995), auch Viren (Busse, 1997) und die Luftverschmutzung (Wardlaw, 1993).

Die asthmatische Entzündungsreaktion ist eine klassische Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ 1 und lässt sich in eine Frühphasereaktion und eine Spätphasereaktion unterteilen. Die Frühphasereaktion wird zunächst nach der Aktivierung von Zellen, die auf ihrer Oberfläche allergen-spezifische Antikörper vom Typ IgE tragen, initiiert. Dafür charakteristisch ist eine rasche Aktivierung von Mastzellen und Makrophagen (Tonnel, 1983; Calhoun, 1992), die

pro-inflammatorische Mediatoren, wie Histamin (Jarjour, 1997) und Eicosanoide (Wenzel, 1988), und reaktive Sauerstoffprodukte freisetzen. Diese bewirken zunächst eine Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur, eine gesteigerte Mukusproduktion und eine Vasodilatation. Das bronchiale Kapillarsystem spielt innerhalb der allergischen Frühphasereaktion in der Lunge eine zentrale Rolle (Persson, 1995). Pro-Inflammatorische Mediatoren induzieren eine massive Plasma-Exsudation in die Atemwege (Van-Vyve, 1995). Die Folge des damit einhergehenden Ausstroms von Akutphase-Proteinen ist eine angeschwollene und verdickte Atemwegswand assoziiert mit einer Verringerung des Atemwegskalibers. Zusätzlich kann Plasma durch die Barriere des Atemwegsepithels dringen und sich im Atemwegslumen ansammeln. Insgesamt tragen alle diese Effekte zu einer Atemwegsobstruktion bei.

Die Spätphase-Reaktion findet 6-9 Stunden nach der eigentlichen Allergen-Provokation statt und führt zur Infiltration und Aktivierung allergen-spezifischer CD4<sup>+</sup> (cluster of differentiation 4) T-Lymphozyten, Makrophagen, eosinophiler und basophiler Granulozyten (Bousquet, 2000). Dabei stellt die Freisetzung vorgeformter Zytokine durch Mastzellen den initialen Auslöser für die frühe Infiltration dieser Zellen dar und bedingt damit die anhaltende Beteiligung allergenspezifischer TH<sub>2</sub>-Zellen. Bereits 24 Stunden nach dem ersten Allergenkontakt kann die Produktion der Zytokine IL-2, IL-5 und des *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor* (GM-CSF) durch T-Lymphozyten in Bronchial-Biopsien von Asthma-Patienten nachgewiesen werden (Bentley, 1993). Die Steigerung der unspezifischen Atemwegsüberempfindlichkeit kann typischerweise erst nach der Spätphase-, jedoch noch nicht nach der Frühphasereaktion beobachtet werden (Fabbri, 1991).

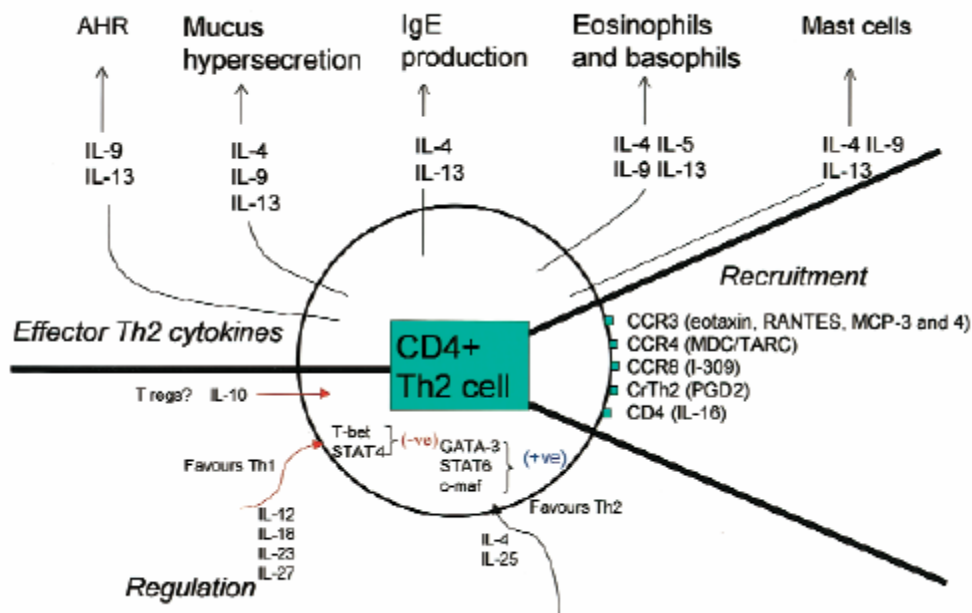
### **1.1.5 Immunpathogenese**

In nahezu allen Asthma-Patienten lassen sich eine Schädigung des Atemwegsepithels, eine vermehrte Ablagerung von kollagenen Fasern in der Atemwegswand, die Degranulation von Mastzellen und eine Infiltration von Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten nachweisen. Viele dieser Zellen befinden sich in einem aktivierten Zustand, in dem sie Chemokine oder Zytokine freisetzen und somit eine direkte Rolle innerhalb der Immunpathogenese des allergischen Asthmas spielen.

Epidemiologische und klinische Beobachtungen konnten sowohl den Schweregrad des Asthmas als auch die initiale und anhaltende Reaktion der Atemwege auf ein Allergen mit der Anwesenheit allergenspezifischer IgE Antikörper korrelieren. Um die Synthese allergenspezifischer IgE Antikörper zu initiieren, muss das inhalierte Allergen zunächst von DC's, die sich in der Atemwegswand befinden, aufgenommen werden. Diese DC's wandern daraufhin in die nahe gelegenen dränierenden Lymphknoten und präsentieren das prozessierte Allergen sowohl B- als auch T-Lymphozyten über die Interaktion von MHC-II und TCR bzw. B-Zell-Rezeptor (BCR). Die Interaktion zwischen diesen Zellen löst eine Immunantwort aus, die von der An- bzw. Abwesenheit verschiedener co-stimulatorischer Moleküle und Zytokine reguliert wird. So benötigt der Isotypenwechsel hin zu einer IgE-Produktion in B-Lymphozyten zweierlei Signale: zum einen die Anwesenheit von IL-4- oder IL-13 (Wills-Karp, 1998), zum anderen die Interaktion zwischen CD-40 auf B-Lymphozyten und dem CD-40 Liganden auf T-Lymphozyten (Bacharier, 1998). Wird allergenspezifisches IgE dann synthetisiert und freigesetzt, bindet es nach kurzer Zirkulation im Blut an den hochaffinen IgE-Rezeptor ( $Fc_\epsilon RI$ ), der auf der Oberfläche von gewebständigen Mastzellen und basophilen Granulozyten exprimiert wird. Erneuter Antigenkontakt führt über die Interaktion von Allergen und dem membranständigen IgE- $Fc_\epsilon RI$ -Komplex zu einer Kreuzvernetzung verschiedener  $Fc_\epsilon RI$ -Moleküle und somit zu einer Degranulation der Mastzelle. Die dabei freigesetzten Mediatoren lösen damit die allergische Frühphasereaktion, klinisch durch eine Atemwegsobstruktion und vermehrte Mukusproduktion charakterisiert, aus.

Zentrale Bedeutung innerhalb der Immunpathogenese des allergischen Asthmas kommt den T-Lymphozyten zu, die durch die Expression des Moleküls CD4 auf der Zelloberfläche charakterisiert sind, den T-Helferzellen (TH-Zellen). Innerhalb dieser Zellpopulation lassen sich anhand des von ihnen produzierten Zytokinmusters zwei verschiedenen polarisierte Subpopulationen unterscheiden, die jeweils auf die andere Subpopulation negativ regulierend wirken können: für T-Helfer-1-Zellen (TH<sub>1</sub>-Zellen) typische Zytokine sind IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , während IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 und GM-CSF Leitzytokine für T-Helfer-2-Zellen (TH<sub>2</sub>-Zellen) darstellen (Mosman, 1986; Paul, 1994). Sämtliche TH<sub>2</sub>-Zytokine sind an bestimmten Prozessen der allergischen Entzündung beteiligt, so

dass das allergische Asthma bronchiale heute als Resultat einer TH<sub>2</sub>-dominierten Immunantwort gesehen wird, die aus einer Imbalance des Verhältnisses zwischen TH<sub>1</sub>- und TH<sub>2</sub>-Zellen resultiert. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass in Bronchial-Biopsien von Asthma-Patienten hohe mRNA Konzentrationen des Transkriptionsfaktors GATA-3, der auf eine Expression in TH<sub>2</sub>-Zellen begrenzt ist (Nakamura, 1999) nachzuweisen sind. In der bronchoalveolären Lavage- (BAL-) Flüssigkeit von Asthma-Patienten lassen sich, verglichen mit Proben gesunder Individuen, viel höhere Konzentrationen an IL-4- und IL-5-mRNA nachweisen, die präferenziell von TH<sub>2</sub>-Zellen produziert werden.



**Abb. 1.1.5.1 Darstellung der zentralen Bedeutung von CD4<sup>+</sup> TH<sub>2</sub>-Zellen innerhalb der Pathogenese des allergischen Asthmas** (Nach: Larché M. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. J Allergy Clin Immunol 2003; 111: 450-63).

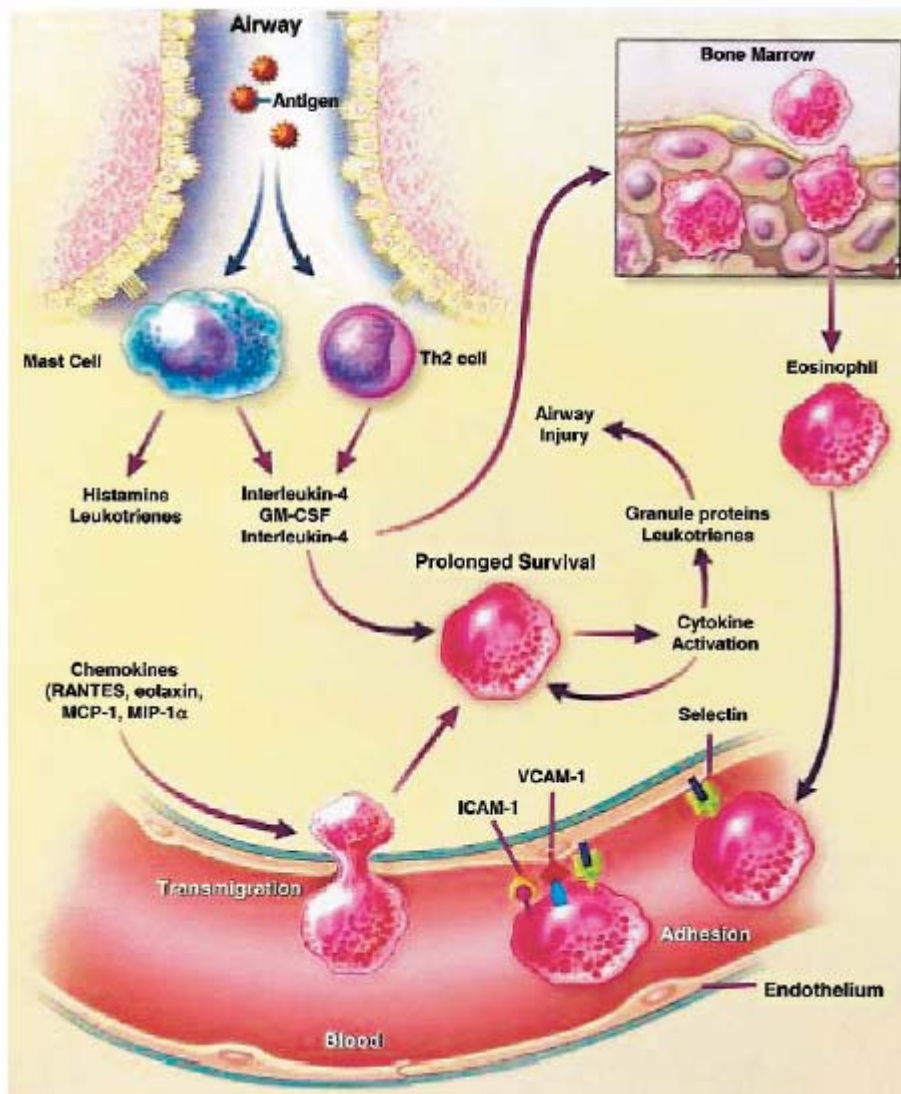
Für das Verständnis der Pathomechanismen allergischer Erkrankungen ist die Entstehung TH<sub>1</sub>- bzw. TH<sub>2</sub>-polarisierter T-Lymphozyten von großer Bedeutung. Denn ausgehend von einer gemeinsamen Vorläuferzelle (TH<sub>p</sub>) entwickeln sich die TH-Zellsubtypen in Abhängigkeit bestimmter exogener Faktoren, wobei der allergenpräsentierenden DC eine Schlüsselposition innerhalb dieser Entwicklung zukommt. Nach der Stimulation der TH<sub>p</sub>-Zelle, die eine Interaktion des Allergenpeptid-MHC-II-Komplexes der DC mit dem TCR der TH<sub>p</sub>-Zelle umfasst,

entsteht zunächst die TH<sub>0</sub>-Zelle, die in der Lage ist, sowohl TH<sub>1</sub>- wie auch TH<sub>2</sub>-Zytokine zu produzieren (Firestein, 1989). Unter dem Einfluss hoher Allergendosen und der Zytokine IL-12, IL-18 und IFN- $\gamma$ , die von aktivierten DC, Makrophagen und T-Lymphozyten freigesetzt werden können, differenzieren sich aus TH<sub>0</sub>-Zellen TH<sub>1</sub>-Zellen (Hsieh, 1993). Die Anwesenheit niedriger Allergendosen und des Zytokins IL-4, das von Mastzellen, eosinophilen Granulozyten und T-Lymphozyten produziert werden kann, dirigiert die Entwicklung in Richtung TH<sub>2</sub>-Zelle (Schmitt, 1990). Da auch TH-Effektorzellen IFN- $\gamma$  oder IL-4 produzieren können, beeinflussen sie ebenfalls die Differenzierung von TH<sub>0</sub>-Zellen. So ist IFN- $\gamma$  nicht nur ein Zytokin, das die Differenzierung hin zum TH<sub>1</sub>-Phänotyp fördert, sondern auch die TH<sub>2</sub>-Zelldifferenzierung inhibiert, während IL-4 den genau gegenteiligen Effekt hat (Maggi, 1992; Parronchi, 1992). Neben IL-4 inhibiert auch das von TH<sub>2</sub>- und TH<sub>3</sub>-Zellen produzierte IL-10 die TH<sub>1</sub>-Zellentwicklung (Gong, 1996). Die TH-Zellen interagieren also untereinander über ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Zytokine, das bei allergischen Erkrankungen zugunsten einer TH<sub>2</sub>-Polarisierung verschoben scheint.

Neben TH<sub>2</sub>-Zellen spielen eosinophile Granulozyten als Effektorzellen der allergischen Immunantwort eine wesentliche Rolle für die Pathophysiologie des Asthma bronchiale. Die Bildung von eosinophilen Granulozyten beginnt im Knochenmark unter dem Einfluss von IL-3 und der TH<sub>2</sub>-Zytokine GM-CSF und IL-5, wobei letzteres die terminale Differenzierung unreifer eosinophiler Granulozyten induziert (Sanderson, 1992). Reife eosinophile Granulozyten zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an Granula im Zytoplasma aus, die potentiell entzündungsfördernde Proteine, wie das Major Basic Protein (MBP), das Eosinophil-Derived Neurotoxin (EDN), Peroxidasen und kationische Proteine, enthalten. Besonders MBP kann direkt das Atemwegsepithel schädigen, die Atemwegesempfindlichkeit steigern und eine Degranulation von Mastzellen und basophilen Granulozyten auslösen. Neben diesen Effektorproteinen bilden eosinophile Granulozyten weiterhin Leukotriene, wie z.B. Leukotrien C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>), die eine Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur, eine verstärkte Gefäßpermeabilität und die weitere Infiltration von eosinophilen Granulozyten nach sich ziehen können (Rothenberg, 1998). Damit eosinophile Granulozyten ihre Effektorfunktionen innerhalb der allergischen Entzündung wahrnehmen



können, müssen sie zunächst aus dem Blutkreislauf heraus- und in das Atemwegsgewebe eintreten. Der erste Schritt dieses Prozesses ist das so genannte „Rolling“, das durch die Interaktion des „Very Late Antigen-4“ (VLA-4) auf der Oberfläche eosinophiler Granulozyten und des *Vascular-Cell Adhesion Molecules-1* (VCAM-1), das auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert wird, bestimmt wird.



**Abb. 1.1.5.2 Die akute Entzündungssituation beim allergischen Asthma** (Nach: Lemanske RF. Asthma. J Allergy Clin Immunol 2003; 111: S502-19).

Durch das „Rolling“ wird die Geschwindigkeit des eosinophilen Granulozyten im Blutstrom verringert (Wardlaw, 1999). Auf das „Rolling“ folgt die Adhäsion eosinophiler Granulozyten an die Endothelzellen, wodurch die eosinophilen Granulozyten in einen Zustand der Voraktivierung versetzt werden (Nagata, 1995). Nach der Adhäsion findet dann die transendotheliale Migration in das

Atemwegsgewebe statt, für die die Interaktion der  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrine VLA-4 und VCAM-1 ebenfalls notwendig ist (Yamamoto, 1998). Während VLA-4 konstitutiv auf der Oberfläche eosinophiler Granulozyten exprimiert wird, ist ihr Aktivierungszustand abhängig von der Anwesenheit verschiedener Zytokine und Chemokine, wie RANTES, des *Macrophage Inflammatory Protein-1* (MIP-1), *Macrophage Chemoattractant Protein-2-4* (MCP-2-4) sowie der Eotaxine 1-3 (Nickel, 1997; Sung, 2000; Luster, 1998). Diese Chemokine können von Atemwegsepithelzellen, Makrophagen, Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten selbst produziert werden und lassen sich in erhöhten Konzentrationen in Lungenbiopsien und BAL-Flüssigkeit von Asthma-Patienten nachweisen (Holgate, 1997; Ying, 1999). Der eosinophilenständige Rezeptor für diese Chemokine ist CCR-3, dem damit eine zentrale Stellung innerhalb des Prozesses der Infiltration eosinophiler Granulozyten in das Lungengewebe zukommt. Schließlich ist es in CCR-3-defizienten Mäusen nicht möglich, eine allergische Entzündung der Atemwege oder eine Atemwegsüberempfindlichkeit zu induzieren (Ma, 2001). Daneben lässt sich sowohl eine mRNA-Expression von CCR-3 als auch von Eotaxin in der Bronchialschleimhaut von Asthma-Patienten nachweisen, die mit dem Schweregrad und der Stärke der Atemwegseosinophilie korreliert (Ying, 1997).

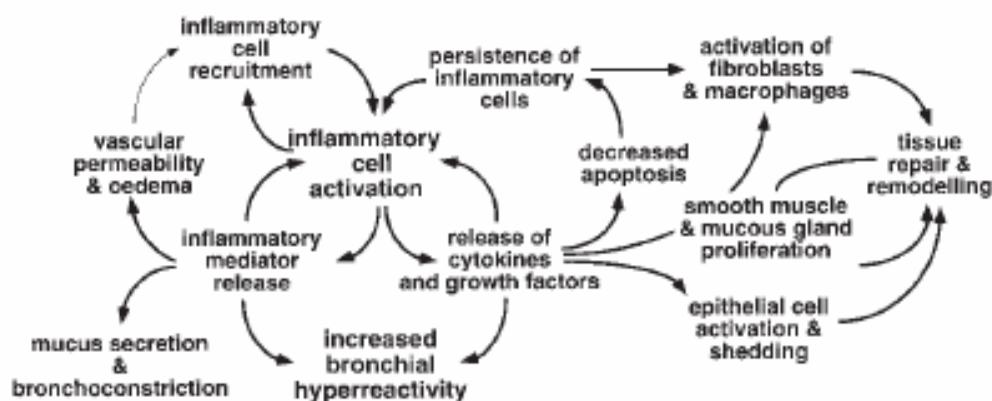
## **1.2 Asthma bronchiale als Modellerkrankung für eine chronische Entzündung und Remodelling**

Die chronisch allergische Entzündung des Asthma bronchiale scheint sehr viel komplexer zu sein als die bei der akuten allergischen Atemwegsentzündung auftretende Infiltration eosinophiler Granulozyten und TH<sub>2</sub>-Zellen (Jeffery, 1992). Sämtliche Zellen der Atemwege, als infiltrierte Zellen, wie eosinophile Granulozyten, TH<sub>2</sub>-Zellen und Makrophagen, sondern auch residente Zellen, wie Mastzellen, Epithelzellen, Fibroblasten und glatte Muskelzellen werden innerhalb dieses Prozesses aktiviert und nehmen daran teil. Nichtsdestotrotz spielen eosinophile Granulozyten auch hier eine zentrale Rolle, da sie proinflammatorische und zytotoxische Mediatoren sezernieren (Holgate, 1993; Gleich, 1993), die zu Gefäßaufweitung, gesteigerter Mukussekretion, Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur, Schädigung des Atemwegsepithels und zur Ausbildung bronchialer Überempfindlichkeit führen. Jedoch greifen auch alle

weiteren Zellen durch die Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren in die Regulation der Atemwegsentzündung und des *Airway Remodellings* ein (Jarjour, 1995).

### 1.2.1 *Airway Remodelling* des Asthma bronchiale

Strukturelle Veränderungen der Atemwege, das *Airway Remodelling*, lassen sich bei Asthmapatienten entlang des gesamten Bronchialsystems und in allen Schichten der Atemwegswand nachweisen (Jeffery, 2001). Der Vorgang des *Airway Remodellings* wird nach gängiger Vorstellung am besten als eine Art Wundheilungsprozess verstanden (Rosenstreich, 1997). Zwei verschiedene Prozesse, die letztlich zur Wiederherstellung verletzten Gewebes führen, lassen sich dabei unterscheiden: zum einen die Regeneration parenchymaler Bestandteile, die die ursprüngliche Struktur und damit auch Funktion wiederherstellt und zum anderen das Ersetzen zerstörten Gewebes durch Bindegewebe (Bousquet, 2000). Zu den Folgen dieser Wiederherstellungsprozesse in den Atemwegen zählen eine Verdickung der Atemwegswand, eine subepitheliale Fibrose, eine erhöhte Mukussekretion, ein vermehrtes Auftreten mukusproduzierender Becherzellen, eine Hyperplasie von Myofibrozyten, eine Hypertrophie und Hyperplasie von Myozyten sowie eine Hypertrophie der Atemwegsepithelzellen.



**Abb. 1.2.1 Mechanismen der akuten und chronischen allergischen Entzündung und der damit verbundenen Remodeling-Prozesse** (Nach: Bousquet J. Asthma – from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161: 1720-45)

Verglichen mit gesunden Individuen weisen die Atemwege von Asthma-Patienten eine 10-100% größere, bei Patienten mit schwerstem Asthma eine 50-300% größere Masse auf (Jeffrey, 2001). Auch wenn eine Gewebszunahme in allen Schichten der Atemwegswand zu verzeichnen sind, findet im Rahmen einer subepithelialen Fibrose eine Ablagerung kollagener Fasern der Typen I, II und III vor allem in der Lamina reticularis statt. Daneben tragen ferner die Hyperplasie und Hypertrophie der glatten Muskelzellen zur Verdickung der Atemwegswand bei (Elias, 2000).

Eine gesteigerte Mukussekretion ist ein typisches Symptom sowohl in leichten, wie auch in schweren Fällen des Asthma bronchiale. Während in gesunden Individuen das Vorkommen subepithelialer muköser Drüsen auf die Atemwege mit Knorpelanteilen begrenzt ist, lassen sich bei Asthma-Patienten muköse Drüsen bis in die peripheren Bronchiolen beobachten (Jeffrey, 2001). Die lungenfunktionelle Konsequenz der vermehrten Mukussekretion ist eine Reduktion der Oberflächenspannung innerhalb der Lunge und damit ein erhöhtes Risiko des Atemwegskollapses. Die Verstopfung ganzer Atemwege durch Mukus lässt sich häufig als Todesursache bei schwerstem Asthma feststellen (Elias, 1999).

Die pathogenetischen Mechanismen, die zum *Airway Remodelling* führen sind bisher nicht im Detail verstanden, jedoch scheinen anti-inflammatorische und profibrotische Zytokine der TGF- $\beta$ -Familie eine entscheidende Rolle zu spielen. Diese lassen sich in großen Mengen in der BAL-Flüssigkeit von Asthma Patienten nachweisen, unabhängig vom Schweregrad der Erkrankung. Eosinophile Granulozyten und Fibroblasten asthmatischer Patienten sind in der Lage, größere Mengen an TGF- $\beta$  zu produzieren, als die gesunder Individuen (Elias, 1999). Große Mengen an Matrix-Metallo-Proteinase-9 (MMP-9), die an jedem Wundheilungsprozess beteiligt ist, finden sich in Sputumproben und Bronchialbiopsien von Asthma-Patienten (Vignola, 1998). Es ist durchaus möglich, dass die strukturellen Veränderungen der Atemwegswand beim Asthma bronchiale nicht allein auf toxische Effekte von Entzündungszellen und deren Zytokinen, sondern auch auf eine anti-inflammatorische Gegenregulation des Immunsystems zurückzuführen sind. So sind die Zytokine IL-6 und IL-11 an der Abschwächung antigen-induzierter Entzündungsvorgänge im Gewebe beteiligt

und lassen sich in großen Mengen in der BAL-Flüssigkeit und in Bronchialbiopsien von Asthma-Patienten nachweisen. Transgene Tiere, die IL-6 bzw. IL-11 überexpressieren, zeigen eine massive subepitheliale Fibrose (Elias, 2000). Möglicherweise wirken auch diese Zytokine neben TGF- $\beta$  sowohl anti-inflammatorisch, zugleich aber auch fördernd auf eine subepitheliale Fibrose. Eosinophile Granulozyten, die sich als Effektorzellen der allergischen Atemwegsentzündung in großen Mengen sowohl in der Atemwegswand wie auch im broncho-alveolären Lumen befinden, scheinen ebenfalls für das Airway Remodelling eine zentrale Rolle zu spielen. In den Granula dieser Zellen befinden sich mehrere zytotoxische Moleküle, die wie das ECP nicht nur pro-inflammatorisch wirken, sondern auch direkt das umgebende Gewebe schädigen können (Gharaee-Kermani, 1998). In verschiedenen tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass eosinophile Granulozyten Fibroblasten in entzündetem Gewebe aktivieren (Wenzel, 1999). Die profibrotische Wirkung, die eosinophile Granulozyten über die Sekretion von TGF- $\beta$  entfalten konnte in in-vitro Experimenten dargestellt werden, in denen Fibroblasten durch das Zellysate aus eosinophilen Granulozyten zur Proliferation und Kollagensynthese stimuliert wurden (Levi-Schaffer, 1999).

### **1.2.2 Lungenfunktionelle Konsequenzen**

Die Manifestation des allergischen Asthmas äußert sich klinisch zumeist in einer anfallsweise auftretenden Atemnot, bedingt durch eine Bronchokonstriktion. Diese resultiert entweder aus dem Allergenkontakt und wird durch die Freisetzung verschiedener Mediatoren veranlasst, oder sie resultiert aus der Überempfindlichkeitsreaktion des neuro-muskulären Apparates der Atemwege. Auch wenn in den letzten Jahren verschiedene Zellen und Mediatoren identifiziert werden konnten, die mit der Entwicklung einer Atemwegsüberempfindlichkeit (AHR) assoziiert sind, ist der genaue Entstehungsmechanismus dieses Phänomens bisher nicht aufgeklärt.

Verschiedene Studien in der Maus konnten zeigen, dass TH<sub>2</sub>-Zellen und vor allem die von ihnen freigesetzten Zytokine nicht nur die allergische Atemwegsentzündung, sondern auch eine AHR durch entweder direkte Effekte auf das Atemwegsepithel, die glatte Atemwegsmuskulatur oder die neuronale Kontrolle des Atemwegstonus oder indirekte Effekte auf B-Lymphozyten,

Mastzellen und vor allem eosinophile Granulozyten induzieren (Hamelmann, 1999). So unterstrich die Beobachtung, dass experimentelles Asthma oder AHR in MHC-II defizienten Mäusen nicht zu induzieren war, die Bedeutung von TH<sub>2</sub>-Zellen für die asthmatische Pathogenese (Hamelmann, 2000). Weitere Untersuchungen in IL-4-, IL-13- und STAT-6-defizienten Tieren konnten auch diese zwei Zytokine mit der Entwicklung einer AHR assoziieren (Brusselle, 1995; Gavett, 1997; Kuperman, 1998). Neben den TH<sub>2</sub>-Zellen scheinen auch eosinophile Granulozyten als Effektorzellen der allergischen Immunantwort eine zentrale Bedeutung für die Entstehung der AHR zu haben. Das TH<sub>2</sub>-Zytokin IL-5 ist der wichtigste Faktor für die Differenzierung, Aktivierung und das Überleben eosinophiler Granulozyten (Lopez, 1988; Yamaguchi, 1998; Simon, 1997). Weiterhin fördert es neben der Akkumulation eosinophiler Granulozyten im entzündeten Gewebe auch die Freisetzung der eosinophilen-spezifischen Effektormoleküle MBP, ECP und der *Eosinophilic Peroxidase* (EPO) (Gleich, 1990), die jeweils nicht nur toxisch für das Atemwegsepithel wirken, sondern auch in Primaten eine Steigerung der Atemwegsreagibilität verursachen konnten (Coyle, 1993; Coyle, 1993; Jacoby, 1993).

Traditionelle Definitionen des Asthma bronchiale beinhalteten zunächst den Begriff der Reversibilität der Broncho-Obstruktion. Neuere Studien konnten jedoch eindeutig belegen, dass Asthma-Patienten gegenüber gesunden Individuen eine schneller voranschreitende Verschlechterung der Lungenfunktion erleiden und dass bei diesen Patienten eine absolute Auflösung der Bronchoobstruktion durch  $\beta$ -Sympathomimetika oder durch Corticosteroide nicht möglich ist. Die *Copenhagen City Heart Study* zeigte für eine Gruppe von 1095 Asthma-Patienten eine beschleunigte Abnahme der Ein-Sekunden-Kapazität (FEV<sub>1</sub>) von 38 ml/Jahr gegenüber 22 ml/Jahr bei gesunden Individuen (Lange, 1998). Solche Studien untermauern die Hypothese, dass die chronische Atemwegsentzündung und das daraus resultierende *Airway Remodelling* einen deutlichen Einfluss auf die Lungenfunktion haben.

Funktionell resultieren die chronische Entzündung mit einhergehendem Ödem und die Verdickung der Atemwegswand durch das *Airway Remodelling* zunächst in einer Verringerung des Atemwegslumens und damit in einer Erhöhung des Atemwegswiderstands (Bousquet, 2000). Daneben wirkt sich die vermehrte Mukussekretion verringern auf die Oberflächenspannung der Atemwege aus,

woraus ein erhöhtes Risiko für den Kollaps der Atemwege resultiert (Elias, 1999). Möglicherweise spielt das Remodelling der distalen Atemwege eine besondere Rolle für eine persistierende Verschlechterung der Lungenfunktion, da sich hier jede Verringerung des Atemwegslumens in einer relativ größeren Zunahme des Atemwegswiderstands als bei proximalen Atemwegen äußert. Die kritische Rolle der distalen Atemwege wird durch Beobachtungen innerhalb einer Studie an Kindern mit Asthma und Patienten mit chronischem Asthma (Yanai, 1992) verdeutlicht. Bei diesen Patienten betrug der Anteil der distalen Atemwege am Gesamtemwegswiderstand der Lunge 34-51%.

### **1.3 Stand der tierexperimentellen Asthma-Modelle**

#### **1.3.1 Tiermodelle für die akute Entzündungssituation**

Tiermodelle für ein experimentell induziertes allergisches Asthma haben innerhalb der letzten 10 Jahre wichtige Erkenntnisse über die Bedingungen erbracht, die letztlich in einer allergischen Sensibilisierung mündeten. Die dafür am häufigsten verwendete Spezies ist die Hausmaus (*Mus musculus*). Die Induktion eines experimentellen allergischen Asthmas durch systemische Immunisierung gegen ein artfremdes Protein, die zu einer allergen-spezifischen TH<sub>2</sub>-Immunantwort führt, und die anschließende Inhalation des Antigens bilden die Basis für die gängigen Mausmodelle. Die systemische Sensibilisierung kann dabei durch intra-peritoneale (i.p.) Immunisierung mit einem Proteinpräzipitat in Aluminiumhydroxyd (Al(OH)<sub>3</sub>) (Jungsuwadee, 2004), durch kleine Dosen gelösten Proteins ohne Al(OH)<sub>3</sub> (Wills-Karp, 1998), durch wiederholte intranasale oder intratracheale Instillation bestimmter Proteine (Shinagawa, 2003; Yu, 1999) oder durch intraperitoneale Übertragung antigen-gepulster Makrophagen oder DC's (Janssen, 2002; Lambrecht, 2000) induziert werden. In Mäusen ohne systemische Sensibilisierung gegen ein bestimmtes Protein hat die Inhalation des Proteins in aerosoler Form keine Auswirkungen (Sedgwick, 1985), so dass wahrscheinlich eine Mindestanzahl antigen-spezifischer TH<sub>2</sub>-Zellen in der Lunge vorhanden sein muss, um eine allergische Atemwegsentzündung effizient zu induzieren. So entwickeln auch transgene Mäuse, die ausschließlich CD4<sup>+</sup>-T-Zellen besitzen, deren TCR spezifisch das Epitop DO11.10 des Ovalbumins (OVA) ist, nach OVA-Inhalation eine allergische Entzündung der Atemwege (Wilder, 2001). Ebenso kann in unsensibilisierten Tieren ein experimentelles

Asthma durch Proteininhalation ausgelöst werden, wenn zuvor aktivierte, proteinspezifische TH<sub>2</sub>-Zellen durch adoptiven Zelltransfer in das jeweilige Tier übertragen wurde (Hogan, 1998).

Sind Tiere erst gegen ein Protein sensibilisiert und besitzen eine ausreichende Anzahl an protein-spezifischen aktivierten TH<sub>2</sub>-Zellen, ruft ein wiederholter Antigenkontakt in der Lunge zwangsläufig eine allergische Atemwegsentzündung hervor (Cohn, 1997). Allerdings reicht dazu ein einmaliger Antigenkontakt in der Lunge nicht aus, sondern, aus Gründen, die bisher nicht vollständig verstanden sind, sind wiederholte Antigenexpositionen nötig.

Als Modellallergene wurden verschiedenste Proteine oder Proteinkonglomerate etabliert, so  $\beta$ -Lactoglobulin (Adel-Patient, 2003), *Schistosoma*-Eier (Jain, 2003), Bovines Serum-Albumin (Kasai, 2001) und *Aspergillus fulmingatus* (Mehlhop, 1997). Das meistverwendete Modellallergen ist jedoch Ovalbumin (OVA) (Kung, 1994). Anders als bei der Humansituation spielt die Beschaffenheit des Allergens in Tiermodell eine geringe Rolle, viel gravierender ist der Einfluss des verwendeten Adjuvans, das die Immunisierung in Richtung TH<sub>2</sub>-Polarisation unterstützen und den Schweregrad der allergischen Atemwegsentzündung verstärken kann. So induziert die i.p.-Injektion von Al(OH)<sub>3</sub> alleine, eine unspezifische Produktion verschiedener TH<sub>2</sub>-Zytokine. Wird nun diesem Adjuvans ein Modellallergen hinzugefügt und dadurch präzipitiert, wird die antigenspezifische TH<sub>2</sub>-Immunantwort massiv unterstützt (Alkan, 1996).

Sämtliche oben beschriebenen Immunisierungsreaktionen resultieren zunächst in einer gesteigerten IgE und IgG<sub>1</sub>-Produktion, wobei die IgG<sub>1</sub>-Titer um ein vielfaches höher sind als die von IgE (Holt, 1981; Jungsuwadee, 2002). Auch wenn sowohl IgE wie IgG<sub>1</sub> in Mäusen eine allergische Soforttypreaktion auslösen können und in großen Mengen produziert werden, sind sie nicht unbedingt notwendig für die Ausbildung des asthmatischen Phänotyps in der Maus (Herz, 1996). Zwischen IgE-defizienten Tieren und Wildtyptieren gibt es keinen Unterschied bei der Induktion oder dem Schweregrad des experimentellen Asthmas. Somit sind diesbezüglich nicht alle Beobachtungen auf die Maus übertragbar. Trotzdem spielen auch die IgE-vermittelte Mastzelldegranulation und Mastzellmediatoren eine bedeutende Rolle innerhalb des allergischen Asthmas in der Maus (Brewer, 1999).



Um die allergische Atemwegsentzündung charakterisieren zu können, werden zumeist Zellen in der broncho-alveolären Lavage (BAL) und histologische Schnittpräparate der Lunge untersucht. Während durch die BAL aus der Lunge einer naiven Maus durchschnittlich 20000 Zellen, zumeist Makrophagen, zu gewinnen sind, lassen sich nach Immunisierung gegen z.B. OVA und nachfolgender OVA-Aerosol-Exposition bis zu  $1,5 \times 10^6$  Zellen aus dem broncho-alveolären Lumen isolieren. Das größte Ausmaß dieser zellulären Infiltration, die zu 70-80% von eosinophilen Granulozyten gebildet wird, lässt sich 24-48 Stunden nach Antigenkontakt in der Lunge feststellen, während sich nach 11-14 Tagen nahezu keine eosinophilen Granulozyten mehr auffinden lassen. Die Menge an infiltrierenden Zellen im broncho-alveolären Lumen korreliert dabei mit dem Ausmaß der Entzündung im Atemwegsgewebe. Hier lassen sich typischerweise große, diffus verteilte Zellinfiltrate im Bereich der Atemwege identifizieren, die ebenfalls größtenteils aus eosinophilen Granulozyten und weiterhin aus T-Lymphozyten und Makrophagen bestehen (Jungsuwadee, 2002).

Neben der allergischen Atemwegsentzündung ist eine gesteigerte Mukussekretion typisch für ein das experimentelle Asthma in der Maus. Diese wird zumeist in histologischen Schnittpräparaten durch eine Perjodsäure-Schiff-Färbung (PAS) nachgewiesen. Während bei naiven Mäusen nur wenige Becherzellen zu identifizieren sind und auf eine geringfügige Mukussekretion hinweisen, findet in sensibilisierten Mäusen als Antwort auf einen Antigenkontakt eine massiv gesteigerte Mukusproduktion statt, die 48 Stunden nach der Aerosol-Exposition ihren Höhepunkt hat. Das Ausmaß an Mukussekretion korreliert dabei mit der Menge des inhalierten Antigens und des TH<sub>2</sub>-Zytokins IL-13 und entspricht damit der Situation im Menschen. Etwa 30 Tage nach Antigenkontakt erreicht die Mukussekretion wieder Basalwerte (Mojtabavi, 2002). Weiterhin korreliert das Ausmaß der Infiltration durch TH<sub>2</sub>-Zellen mit der Ausprägung einer Atemwegsüberempfindlichkeit (AHR) gegenüber cholinergen Agonisten (Whitehead, 2003), während die AHR gegenüber allergenen Stimuli mit dem Ausmaß der Infiltration eosinophiler Granulozyten einhergeht (Dohi, 1999). Zumeist wird die AHR sensibilisierter Tiere durch Provokationstests in Verbindung mit einer nicht-invasiven Lungenfunktionsmessung, wie der *Head-out* oder der *Whole body* Plethysmographie, im Vergleich zu naiven Tieren bestimmt.

### 1.3.2 Tiermodelle für die chronische Entzündungssituation

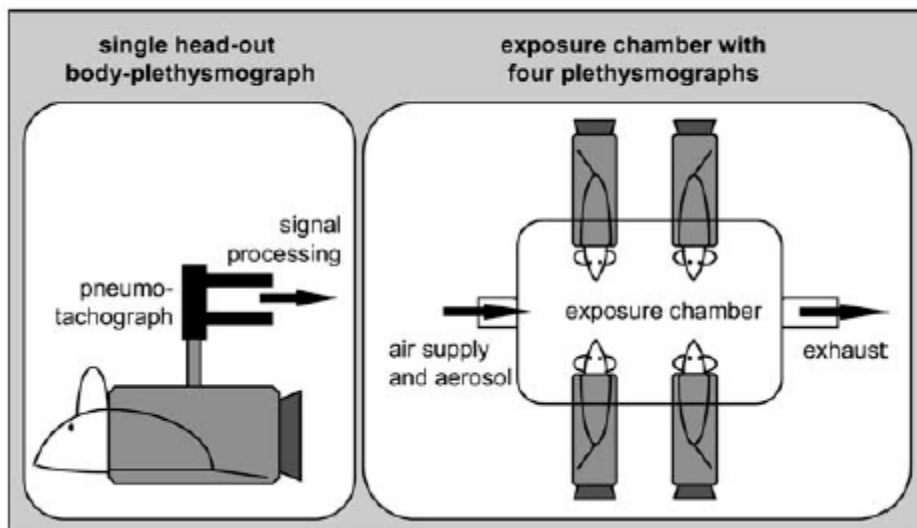
Tiermodelle, die die akute Entzündung des allergischen Asthma bronchiale reflektieren, haben vor allem zur Identifikation der Mediatoren und Zellen beigetragen, die an der Regulation der allergischen Atemwegsentzündung beteiligt sind. Allerdings kommt die Entzündungssituation in diesen Modellen eher der akuten Entzündung nahe, wie sie bei einer Asthmaexazerbation zu beobachten ist, als der chronischen Entzündung, die typisch für das humane Asthma bronchiale ist. Eine weitere Limitation solcher Modelle ist das Fehlen des *Airway remodellings*, das ein ganz wesentliches Kriterium des humanen asthmatischen Phänotyps ist. Es sind also grundsätzlich nicht alle Erkenntnisse aus diesen „Akuten Modellen“ auf den Menschen übertragbar. Aus diesem Grund ist die Entwicklung geeigneter „Chronischer Modelle“, die die klinischen Manifestationen des allergischen Asthma umfassender widerspiegeln, von großer Bedeutung.

Die Grundlage für die Entwicklung „Chronischer Modelle“ ist die wiederholte Allergenexposition, wie sie auch beim sensibilisierten Menschen vorkommt und sowohl die Kontinuität der allergischen Entzündung und als auch die damit verbundene fortwährende Schädigung der Atemwege und deren strukturellen Umbau bedingt. Mittlerweile sind eine Reihe von Modellen etabliert, die durch eine fortwährende Allergeninhalation verschiedene Charakteristika des *Airway remodellings*, wie eine subepitheliale Fibrose, Becherzellhyperplasie und eine Hyperplasie der glatten Atemwegsmuskulatur, induzieren konnten (Temelkovski, 1998; Yiamouyiannis, 1999; Hogaboam, 2000). Die eigentliche Entzündungssituation in diesen „Chronischen Modellen“ kommt der im Menschen allerdings weniger nahe als die der „Akut-Modelle“. Durch i.p.-Immunisierung gegen OVA und die darauf folgende OVA-Aerosol-Exposition kann in der BALB/c oder C57BL/6 Maus zunächst die akute allergische Atemwegsentzündung induziert werden. Wird die wöchentliche Allergenprovokation fortgesetzt, zeigt sich nach 3 Wochen bereits eine Veränderung der allergischen Atemwegsentzündung. Während die AHR und eine erhöhte OVA-spezifische IgE-Produktion im Vergleich zum „Akuten Modell“ unbeeinträchtigt bleiben, nimmt vor allem die Anzahl von eosinophilen Granulozyten sowohl im Atemwegsgewebe als

auch in der BAL ab. Dagegen steigt die Anzahl infiltrierender Makrophagen, Plasmazellen und Lymphozyten an (Jungsuwadee, 2002). Bei Allergenexposition über längere Zeiträume als 3 Wochen ist weiterhin eine Verringerung der allergischen Atemwegsentzündung sowie eine Normalisierung der Atemwegsreabilität zu verzeichnen. Die Mechanismen, die zu dieser Immunsuppression führen, sind derzeit noch nicht bekannt (Yiamouyiannis, 1999; Sakai, 2001; Swirski, 2002).

Diese Beobachtungen zeigen, dass es durchaus möglich ist, die chronische Form des allergischen Asthma und dabei vor allem Vorgänge, die zum *Airway remodelling* führen, im Mausmodell zu untersuchen. Allerdings ist die Untersuchung der Chronifizierung des allergischen Entzündungsgeschehens wegen der beobachteten allergen-induzierten Immunsuppression derzeit noch nicht möglich. Es könnte allerdings durchaus möglich sein, dass diese Limitation eines Mausmodells durch die Variation des Immunisierungs- bzw. Expositionsprotokolls zu überwinden ist (Epstein, 2004).

### Head-out body-plethysmograph



**Abb. 1.3.2 Schematischer Aufbau des Head-out Body-Plethysmographen** (Nach: Wegmann M, Renz H. Animal Models of Experimental Asthma. In *Animal Models of T Cell Mediated Skin Diseases*, Ernst Schering Res Found Workshop. Axel Springer Verlag 2004(50):69-87).

### 1.3.3 Lungenfunktionsmessung im Mausmodell

Die Möglichkeit, die Lungenfunktion an spontan atmenden, nicht anästhesierten Mäusen untersuchen zu können, ist für die Untersuchung tierexperimenteller Asthma-Modelle von besonderer Bedeutung. Bisher sind zu diesem Zweck zwei verschiedene Systeme etabliert worden, die sogenannte „Ganzkörper oder *whole body*-Plethysmographie“ (Hamelmann, 1997) und die „*head-out body*-Plethysmographie“ (Glaab, 2001). Beide Systeme sind nicht invasiv und erlauben die Messung der Lungenfunktion, insbesondere die Entwicklung der Atemwegshyperreaktivität, unter Spontanbedingungen. Dabei vermeiden diese Methoden bestimmte Nachteile, wie sie in invasiven Systemen bedingt sind, wie z.B. die Notwendigkeit einer mechanischen Beatmung sowie einer Anästhesie mit möglichen Auswirkungen auf die Atemwegshyperreaktivität oder die Sensibilität gegenüber cholinergen Transmittern. Zudem sind bei invasiven Messmethoden weder wiederholte Messungen noch lang andauernde oder wiederholte Anwendungen von Aerosolen und Pharmazeutika am selben Tier möglich.

Mit der *whole body* Plethysmographie kann der Grad einer Bronchoobstruktion gemessen werden, der mit bestimmten Veränderungen der Lungenfunktion einhergeht. Die Tiere befinden sich dabei in einer Plexiglasbox und können sich frei bewegen. Zunächst wird der Druck innerhalb der Kammer ( $P_b$ ) gemessen. Aus dem Abfall von  $P_b$  bei Bronchoobstruktion und dem Verhältnis der  $P_b$ -Maxima bei Inspiration und Expiration des Tieres lässt sich ein dimensionsloser Parameter, die sogenannte *enhanced pause* ( $P_{enh}$ ) berechnen.  $P_{enh}$  steigt bei Bronchoobstruktion an und korreliert in anästhesierten Mäusen mit dem Atemwegswiderstand. Offensichtlich ist  $P_{enh}$  dabei unabhängig vom Atmungsmuster und von der Atemfrequenz (Hamelmann, 1997).

Im Vergleich dazu schließt die *head-out body*-Plethymographie die Notwendigkeit der Kompensation adiabatischer Gegebenheiten, wie sie Temperatur- und Feuchtigkeitsänderungen bei der In- und Expiration bedingen, aus (Glaab, 2001). Üblicherweise sind bei dieser Methode vier Plethysmographen an eine Expositions-kammer angeschlossen, die durch einen beständigen Luftfluss ventiliert wird; somit besteht nicht die Notwendigkeit, nach Aerosol-zuleitung die Luft innerhalb der Kammer zu wechseln. Die *head-out body*-Plethymography erlaubt die kontinuierliche Messung des Atemflussmusters als Parameter zur Bestimmung einer Bronchoobstruktion. Bei einer Bronchoobstruktion treten charakteristische Veränderungen des Atemflussmusters auf. Dabei gilt eine

Verminderung des halbmaximalen expiratorischen Atemflusses ( $EF_{50}$ ) als Hauptparameter.  $EF_{50}$  ist der Atemfluss, der bei halbmaximalem expiratorischen Atemzugvolumen gemessen wird. In Mäusen konnte unter Benutzung der invasiven Methode nach Amdur und Mead (Amdur, 1958) gezeigt werden, dass eine Verminderung des  $EF_{50}$  bei Inhalation von  $\beta$ -Methacholin mit einem Anstieg des Atemwegswiderstands korreliert (Alarie, 1966; Vijayaraghavan, 1993). Als weitere Atemfunktionsparameter werden bei der *head-out body*-Plethymography die Atemfrequenz ( $f$ ), das Atemzugvolumen ( $VT$ ), die Inspirationszeit ( $TI$ ) und die Expirationszeit ( $TE$ ) bestimmt. Jedoch ist es nicht möglich, zwischen Veränderungen der Atemfunktion in den peripheren und zentralen Atemwegen zu differenzieren.

Strukturelle Veränderungen der Atemwege, wie sie als Folge der chronisch-allergischen Entzündung in Asthma-Patienten zu beobachten sind, beeinflussen unmittelbar die Lungenmechanik. Die Messung der Atemflussparameter und Druckparameter am anästhesierten, intubierten und ventilerten Tier ermöglicht die Charakterisierung der Lungenmechanik, so dass die Lungendehnbarkeit (*Compliance*) und der Strömungswiderstand (*Resistance*) erfasst werden (Hantos, 1992; Gomes, 2000). Anhand dieser Daten ist es möglich, strukturelle Veränderungen sowohl in zentralen als auch in peripheren Atemwegen zu differenzieren und zu analysieren.

#### **1.4 Hypothesen und Fragen**

Das allergische Asthma bronchiale ist eine chronische Erkrankung, deren komplexer Phänotyp durch eine chronisch-allergische Atemwegsentszündung, eine erhöhte Mukusproduktion, die strukturelle Veränderung der Atemwege sowie die Entwicklung einer bronchialen Hyperreagibilität charakterisiert wird. Genauso komplex wie die Erkrankung selbst sind auch die Bandbreite und Interaktionen verschiedenster Faktoren, die zur Initiation, Progression und Chronifizierung des Asthmas beitragen. Neben genetischen Mutationen, die in epidemiologischen Studien mit einer erhöhten Suszeptibilität für die Entwicklung einer allergischen Erkrankung korrelieren, wurden weitere Faktoren identifiziert, die eine allergische Sensibilisierung des Individuums auslösen können. Unter diesen Faktoren finden

sich vor allem Infektionen der oberen Atemwege, ausgelöst durch verschiedene Viren, wie das Respiratory Syncytial Virus oder Rhinoviren.

Im Rahmen der Hygiene-Hypothese ist hingegen eine Vielzahl von Faktoren identifiziert worden, die mit einem niedrigeren Risiko für die Entwicklung einer atopischen Erkrankung assoziiert sind. Darunter befinden sich vor allem Infektionen, wie sie durch einen niedrigeren Hygienestandard bedingt auftreten können. Neben verschiedenen Bakterien wurden auch verschiedene Viren als solche „protektiven“ Faktoren erkannt. Interessanterweise korreliert das frühzeitliche Auftreten einer viralen Infektion der oberen Atemwege, wie sie durch z.B. durch Rhinoviren verursacht werden kann, auch mit einem niedrigeren Risiko für die Entwicklung eines allergischen Asthmas. Die Rolle insbesondere viraler Infektionen als protektive oder als initiierende Faktoren für die Entwicklung des Asthma bronchiale ist bisher nicht verstanden. Eine Reihe von zusätzlichen Faktoren, wie z.B. der Zeitpunkt der viralen Infektion, die Art oder die Eintrittsrouten des Virus, scheinen in diesem Zusammenhang von Bedeutung zu sein. Nahezu nichts ist bisher über die Effekte verschiedener viraler Komponenten bekannt, die nicht nur als Antigen vom adaptiven Immunsystem, sondern im Fall viraler Genomkomponenten auch vom angeborenen Immunsystem erkannt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden deshalb folgende Hypothesen untersucht:

- 1) Die TLR-3- bzw. TLR-7-Aktivierung verhindert die allergische Sensibilisierungsreaktion.
- 2) Die TLR-3- bzw. TLR-7-Aktivierung supprimiert die sekundäre allergische Entzündungsreaktion in der Lunge

Dabei ergibt sich ferner folgende Frage:

Haben die TLR-3- bzw. TLR-7-Aktivierung unterschiedliche Effekte auf die sekundäre allergische Immunantwort?

- 3) Interleukin 12 (IL-12) ist an der Mediation der immun-modulierenden Effekte viraler TLR-Liganden auf das experimentelle Asthma beteiligt.

Die akute allergische Entzündungsreaktion ist bereits in vielen Tiermodellen untersucht worden und konnte bereits tiefen Einblick in die Mechanismen geben, die bei einer Asthma-Exazerbation ablaufen. Jedoch spiegeln diese Modelle nicht die normalerweise beim Patienten beobachtete Situation wieder. Denn diese ist zumeist durch eine chronische Entzündungsreaktion sowie strukturelle Veränderungen der Atemwege charakterisiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst ein Mausmodell etabliert, das dem humanen Phänotyp möglichst nahe kommt. Dabei wurden folgende Hypothesen untersucht:

- 4) Eine chronische Allergenexposition induziert eine chronische Atemwegsentzündung.
- 5) Die chronische Atemwegsentzündung ist mit strukturellen Veränderungen der Atemwege assoziiert.
- 6) Die chronische Atemwegsentzündung und das Airway remodeling sind mit einer Veränderung der Lungenfunktion assoziiert.

Dieses Modell wurde nun eingesetzt, um Faktoren zu identifizieren, die an der Chronifizierung des allergischen Asthmas beteiligt sind.

- 7) Eosinophile Granulozyten spielen eine zentrale Rolle innerhalb des Chronifizierungsprozesses der allergischen Asthmas.

## **2. Tiere, Protokolle, Material und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung**

Für alle in-vivo Studien wurden weibliche BALB/c-Mäuse (Harlan Winkelmann, Borch, D) im Alter von 6-8 Wochen verwendet. Weibliche IL-12p35 defiziente BALB/c-Mäuse wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. G. Alber (Institut für Immunologie der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig) zur Verfügung gestellt (Müller, 2001). Sämtliche Tiere wurden unter keimarmen Bedingungen in einzeln belüfteten Käfigen bei konstanter Raumtemperatur (RT) von 20°C und konstanter Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Tiere erhielten ovalalbuminfreies Wasser und Futter ad libitum. Alle hier beschriebenen in-vivo Studien wurden im Rahmen der Tierversuchsgenehmigung: V54-19c20-15(1) "Mechanismen zur Entstehung allergischer Erkrankungen" durchgeführt.

### **2.2 Protokolle zur Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung**

Als Basis aller in-vivo Studien dient ein Tiermodell für das experimentelle Asthma in der BALB/c-Maus. In dieser Arbeit wurden für verschiedene Fragestellungen drei Varianten verwendet. Es handelt sich dabei zum einen um das Standard-Modell, in dem eine allergische Entzündungsreaktion in der Lunge in Verbindung mit der Entwicklung einer Atemwegsüberempfindlichkeit induziert wird. Weiterhin wurde ein Modell verwendet, in dem nach der primären Immunantwort in der Lunge auch eine sekundäre Immunantwort ausgelöst wird. Zuletzt wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Modell etabliert, das die chronische Entzündungssituation in Verbindung mit strukturellen Veränderungen der Atemwege, wie sie im Menschen zu beobachten ist, reflektiert.

#### **2.2.1 Induktion einer akuten allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge und Immunmodulation während der Sensibilisierungsreaktion**

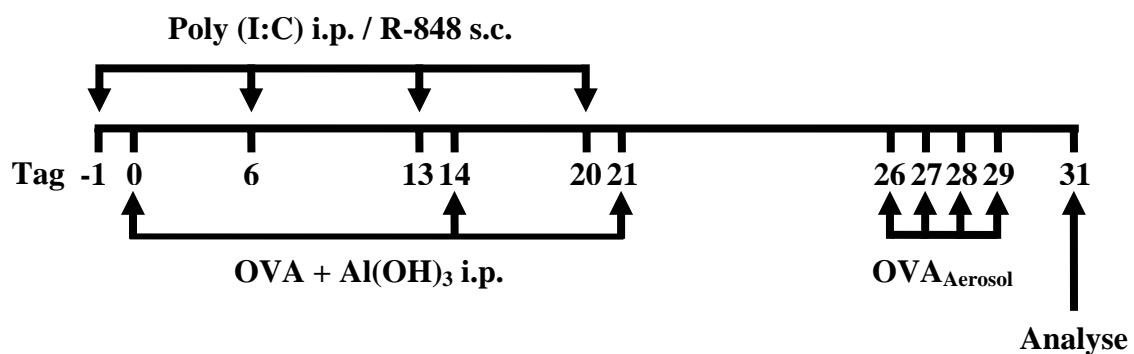
Die Sensibilisierung gegen ein Protein ist die Grundvoraussetzung für die Etablierung einer lokalen Entzündungsreaktion in der Lunge. Diese Sensibilisierungsreaktion wird im Maus-Modell durch drei intra-peritoneale (i.p.) Injektionen von 10 µg des artfremden Proteins Ovalbumin (OVA Grade VI, Sigma, Steinheim, D) gelöst in 100 µl PBS an den Tagen 1, 14 und 21 des Versuchsprotokolls (Abbildung) in Verbindung mit dem 100 µl Adjuvans



Aluminiumhydroxyd ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ) (Inject Alum, Pierce, USA) ausgelöst. Die systemische Applikation des Ovalbumins führt somit zur Bildung von OVA-spezifischen  $\text{TH}_2$ -Zellen, wie sie auch beim menschlichen Asthma bronchiale vorkommen. Der Sensibilisierungserfolg lässt sich später durch den Nachweis einer Produktion von OVA-spezifischen Antikörpern der Subklassen  $\text{IgE}$  und  $\text{IgG}_1$ , die unter dem Einfluss von  $\text{TH}_2$ -Zytokinen gebildet werden, feststellen.

An den Tagen 26-29 wird den Tieren in einer luftdichten Expositionskammer für 30 Minuten ein OVA-Aerosol (1% OVA Grade V gelöst in PBS) zugeleitet wodurch ein Antigenkontakt in der Lunge ausgelöst wird, der die lokale Entzündungsreaktion initiiert. Das Aerosol wird dabei von einem Generator (PARI® Master, Pari, Starnberg, D) gebildet. Die Analyse der Tiere findet 48 Stunden später statt.

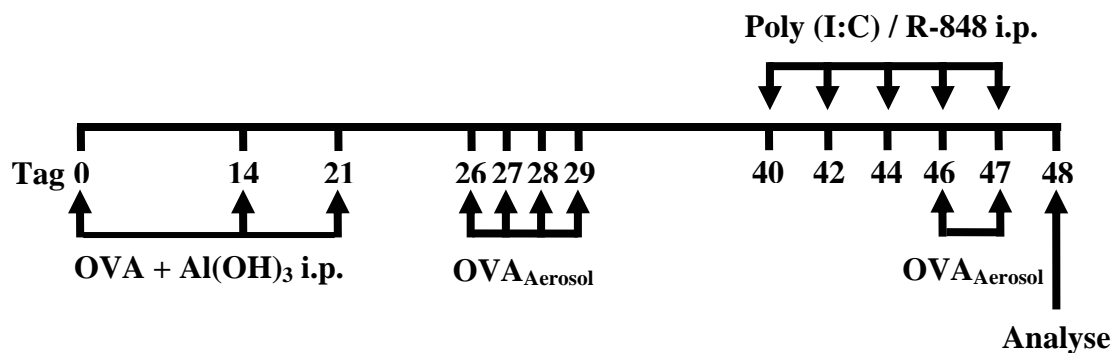
Um ferner den Einfluss einer TLR-3- bzw. TLR-7-Aktivierung auf die Sensibilisierungsreaktion zu untersuchen, wird den Tieren 24 Stunden (Tage 0, 13 und 20) vor der jeweiligen OVA/ $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Injektion sowie am Tag 6 Polyinosin-Polycytidylsäure (poly (I:C) als synthetischer TLR-3-Ligand bzw. Resiquimod (R-848) als synthetischer TLR-7-Ligand systemisch appliziert. Poly (I:C) wird dabei i.p. und R-848 intra-venös (i.v.) injiziert (Abb. 2.2.1).



**Abb. 2.2.1** Protokoll zur allergischen Sensibilisierung, Induktion einer allergischen Atemwegsentszündung und Immunmodulation durch TLR-3- bzw. TLR-7-Aktivierung während der Sensibilisierungsphase

### 2.2.2 Induktion einer sekundären allergischen Immunantwort in der Lunge und Immunmodulation während des Antigenkontakts

Das zuvor beschriebene Protokoll dient der Induktion einer akuten allergischen Entzündungsreaktion auf einen lokalen Antigenkontakt in der Lunge. Um den Einfluss einer TLR-3- bzw. TLR-7-Aktivierung auf eine bereits etablierte allergische Entzündungsreaktion in der Lunge zu untersuchen wird das obige Protokoll um die Induktion einer sekundären Immunantwort erweitert. Diese wird durch zwei weitere Inhalationen eines OVA-Aerosols an den Tagen 46 und 47 ausgelöst. Die systemische Applikation von poly (I:C) bzw. R-848 wird an den Tagen 40, 42, 44, 46 und 47 durchgeführt (Abbildung 2.2.2).



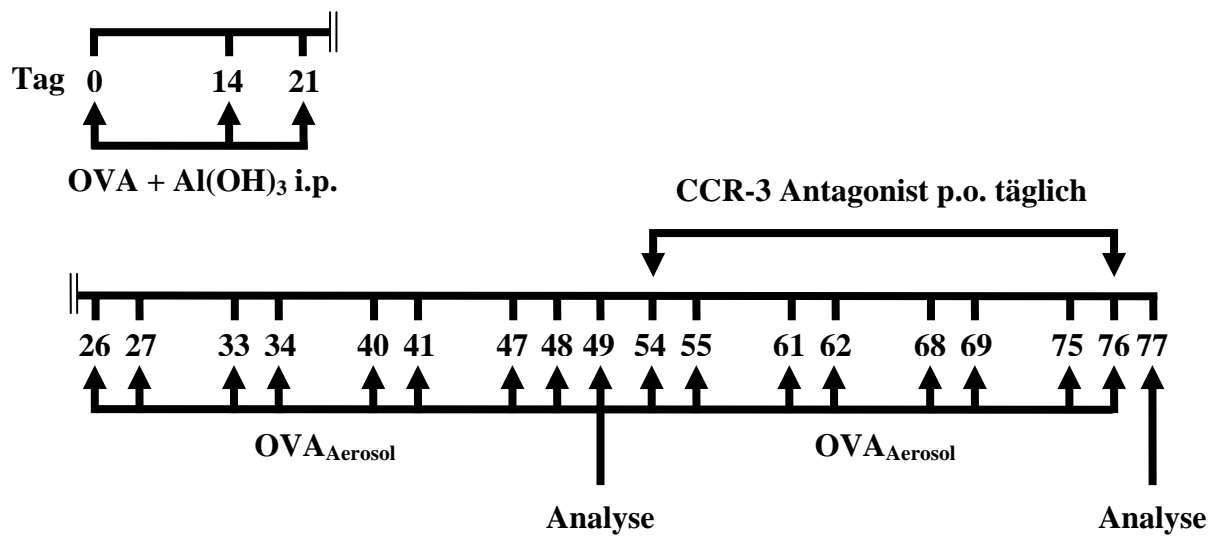
**Abb. 2.2.2** Protokoll zur allergischen Sensibilisierung, Induktion einer allergischen Atemwegsentszündung und Immunmodulation der sekundären Immunantwort durch TLR-3- bzw. TLR-7-Aktivierung

### 2.2.3 Etablierung einer chronischen allergischen Entzündung der Atemwege und Applikation des CCR-3-Antagonisten

Da die zuvor beschriebenen Tiermodelle für ein experimentelles allergisches Asthma nur Kurzzeitprotokolle sind, die eine akute allergische Entzündungsreaktion in der Lunge induzieren, spiegeln beide nur einige Teilaspekte der humanen Erkrankung wider. Da das humane Asthma bronchiale eine chronisch-entzündliche Atemwegserkrankung ist, die einem wiederholten Antigenkontakt ausgesetzt ist, unterscheidet sich die Entzündungsreaktion deutlich von der akuten, wie sie bei einer Asthma-Exazerbation vorzufinden ist. Daneben sind strukturelle Veränderungen der Atemwege, bedingt durch die Chronizität der Entzündung, charakteristisch. Um diesem Phänotyp im Tiermodell

möglichst nahe zu kommen, wurde das Modell für die Induktion einer akuten Atemwegsentzündung dahingehend verändert, dass die Antigenexposition nun über einen Zeitraum von zwölf Wochen mit jeweils zwei an aufeinander folgenden Tagen stattfindenden OVA-Aerosol-Expositionen verlängert wurde.

Um die Rolle von eosinophilen Granulozyten innerhalb der chronischen Entzündungsreaktion und vor allem für den stattfindenden strukturellen Atemwegsumbau zu untersuchen, wurde durch die Applikation eines CCR-3-Antagonisten (zur Verfügung gestellt von der Firma Boehringer Ingelheim, Department of Lung Research) die Infiltration von eosinophilen Granulozyten in das entzündete Gewebe verhindert. Die Applikation des CCR-3-Antagonisten begann nach vierwöchiger OVA-Aerosol-Exposition und dauerte bis zum Ende der zwölften Expositionswoche. Der CCR-3-Antagonist (gelöst in 200 µl PBS mit 1% Natrosol®, Hercules, Heverlee, B) wurde an fünf Tagen der Woche vormittags mit einer Magensonde (Durchmesser 2 mm, Harvard Apparatus, HSE, March-Hugstetten, D) per os appliziert. Die Dosis betrug 30 mg/kg Körpergewicht. An Tagen, an denen auch eine OVA-Aerosol-Exposition stattfand, wurde der CCR-3-Antagonist 30 Minuten vor sowie 6 Stunden nach der Exposition appliziert. Die Analysen der Tiere fanden vor der Applikation (Tag 49) bzw. nach der Applikation des CCR-3-Antagonisten statt (Abb. 2.2.3).



**Abb. 2.2.3** Protokoll zur allergischen Sensibilisierung, Induktion einer chronisch allergischen Atemwegsentzündung und der Applikation des CCR-3-Antagonisten

## 2.3 Gewinnung von Probenmaterial

### 2.3.1 Gewinnung von Serumproben

Vor der eigentlichen Blutentnahme werden die zu untersuchenden Tiere etwa 10 Minuten in einen Wärmeinkubator bei 60°C eingebracht, um eine Dilatation der peripheren Gefäße herbeizuführen. Anschließend wird durch einen Schnitt die Schwanzvene eingeringt und das entweichende Blut aufgefangen. Das maximal zu entnehmende Blutvolumen beträgt 500 µl. Danach werden die Blutproben bei RT für 3 Stunden inkubiert, bis dass das Blut vollständig geronnen ist. Jetzt werden die jeweiligen Proben für 20 Minuten bei 2000g und RT zentrifugiert und anschließend der Serumüberstand abgenommen. Diese werden bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

### 2.3.2 Broncho-alveoläre Lavage

Die broncho-alveoläre Lavage (BAL) dient der Gewinnung von Zellen, die in das broncho-alveoläre Lumen infiltriert sind. Ferner werden sämtliche Proteine, die sich in diesem Kompartiment befinden, herausgespült. Zunächst wird am durch Zervikaldislokation getöteten Tier die Trachea freigelegt. In diese wird eine kleine Öffnung geschnitten, eine Trachealkanüle (Trachealkanüle 1.1mm, Hugo Sachs

Electronics, March-Hugstetten, D) eingeführt und mittels einer Ligatur fixiert. Über diese Kanüle wird 5 x 1 ml eiskaltes PBS (No H15-002, PAA, D) mit einem Protease-Inhibitor (complete<sup>TM</sup> Mini, Roche, Mannheim, D) in die Lunge appliziert und direkt wieder entnommen. Die Suspension wird im Anschluss für 5 Minuten bei 500 g und 4°C zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wird danach abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

### **2.3.3 Peritoneale Lavage**

Zur Analyse der Reaktion von Peritonealmakrophagen auf TLR-3- bzw. TLR-7-Liganden wurde Mäuse 10 µg/ 100 µl PBS i.p. injiziert. Sechs Stunden später wurde eine peritoneale Lavage (PL) durchgeführt, um Zellen und Proteine aus der Peritonealhöhle zu entnehmen. Dazu wurden 5 ml eiskaltes PBS mit Proteaseinhibitor in die Bauchhöhle injiziert und für 5 Minuten in dieser belassen. Danach wurde die Suspension wieder entnommen und für 5 Minuten bei 500 g und 4°C zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wird danach abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

## **2.4 Zellzählung und Differenzierung von Leukozytensubpopulationen der BAL und PL**

Die Bestimmung der Zellzahl in der BAL bzw. der PL wurde mittels CASY® TT Zellzählssystem (Schärfe Sytem, Reutlingen, D) durchgeführt. Zuvor wurde die jeweilige Probe 1:2000 mit CASY® ton-Lösung (Schärfe Sytem, Reutlingen, D) verdünnt.

Zur Differenzierung der Leukozytensubpopulationen in der BAL oder PL werden 50 µl Probe zunächst mit 150 µl PBS verdünnt und anschließend eine Zytozentrifugation für 5 Minuten bei 320 g durchgeführt (Zytozentrifuge Cytospin 3, Shandon, Frankfurt, D), wobei die in der Probe befindlichen Zellen auf einen Objektträger (76 mmx 26 mm, Mattrand, Marienfeld, D) zentrifugiert werden. Die Präparate werden anschließend 30 Minuten an der Luft getrocknet und anschließend mit einer Diff-Quick®-Lösung (Dade-Behring, Marburg, D) gefärbt. Die Zelldifferenzierung erfolgt lichtmikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung anhand morphologischer Kriterien.

## 2.5 Lungenhistologie

Eine histologische Untersuchung wurde nur bei Tieren vorgenommen, die keiner vorherigen broncho-alveolären Lavage unterzogen worden waren. Zur morphologischen Analyse einer Lunge, wurden diese über die Trachea mit 4% Formaldehyd in situ fixiert. Anschließend wurde die Lunge entfernt und in 4% Formaldehyd gelagert. Aus den in Paraffin eingelegten Proben wurden Dünnschnitte von 3 µm Dicke hergestellt (Accu-Cut® SRM™ 200 Rotary microtome, Sakura,J).

Entparaffinierte Schnitte wurden mit Hämatoxilin (Hämatoxilin II nach Gill, Merck, Darmstadt,D) und Eosin (Eosin G, Merck, Darmstadt,D) gefärbt, um anhand dieser Schnitte einen Gesamtüberblick über die histologischen Aufbau und eventuelle pathologische Veränderungen gewinnen zu können.

Um speziell eine vermehrte Mukusproduktion in den Atemwegen nachweisen zu können, wurden zum anderen Schnitte einer Perjodsäure-Schiff-Färbung (PAS-Färbekit, Merck, Darmstadt,D) unterzogen. Dabei werden 1,2-Glykole in unsubstituierten Polysacchariden, neutralen Mukopolysacchariden, Muko- und Glykoproteinen durch die Behandlung mit Perjodsäure zu Aldehydgruppen oxidiert. Diese Aldehydgruppen geben mit Schiffs-Reagenz eine leuchtend-rote Farbreaktion, wodurch sich die oben aufgeführten Mukusbestandteile spezifisch anfärben lassen. Die Gegenfärbung dieser Schnitte erfolgte mit Hämatoxilin (Hämatoxilin III nach Gill, Merck, Darmstadt, D).

Eine Sirius-Red/Fast-Green-Färbung wurde verwendet, um fibrilläres Kollagen in der Lunge spezifisch anfärben zu können. Dazu wurden entparaffinierte Schnitte 30 Minuten bei RT in einer gesättigten Pikrinsäure-Lösung (Fluka Chemie, Buchs, CH) mit 0,1% Sirius-Red (C.I. 35780, Polysciences, Warrington, USA) und 0,1% Fast Green (FCF, Sigma-Aldrich, Stainheim, D) inkubiert und im Anschluss unter fließendem Wasser abgespült. Mit dem Farbstoff Sirius-Red kann spezifisch fibrilläres Kollagen nachgewiesen werden, da sich dieser in die Tripel-Helix-Struktur des Kollagenmoleküls einlagert. Die Fast-Green-Färbung dient als Gegenfärbung.

Sämtliche Schnitte werden nach Trocknung an der Luft mit einem Eindeckmedium (Histomount mounting solution, Zymed Laboratories, San Francisco, USA) auf Phenolbasis eingedeckelt.

## **2.6 Immunhistologie**

Der strukturelle Atemwegsumbau des humanen Asthma bronchiale weist neben einer vermehrten Ablagerung von kollagenen Fasern auch eine Verdickung der glatten Muskelschicht auf. Um eine Veränderung der glatten Muskelschicht durch eine chronische Antigenexposition zu untersuchen, werden alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) enthaltende Zellen wie glatte Muskelzellen bzw. Myofibrozyten durch indirekte Immunhistologie angefärbt. Daneben wird eine Färbung gegen das fibrozyten-spezifische Peptid (FSP) durchgeführt, um glatte Muskelzellen von Myofibrozyten zu differenzieren. Dafür werden entparaffinierte 3  $\mu$ m dicke Lungenschnitte verwendet. Diese wurden zunächst mit einer Antikörperlösung gegen  $\alpha$ -SMA (Ratte monoclonal anti- $\alpha$ -SMA-IgG, clone 1 A4, Immunotech, Marseile, F) bzw. FSP (Ratten monoclonal anti-FSP-IgG, clone ER-TR7, Biogenesis, Poole, UK) bedeckt und für 20 Minuten bei 18°C inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS wird ein biotinylierter Maus-anti-Ratte-IgG-Antikörper (Vektor Lab, Grünberg, D) aufgetragen und für 30 Minuten bei 20°C inkubiert. Für die Farbreaktion wird ein Vecta-Stain® Kit (Vector Lab, Grünberg, D) gemäß Protokoll des Herstellers verwendet. Diese Methode wurde im Labor von Herrn Prof. Dr. H. Fehrenbach (Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie, Klinikum der Philipps-Universität, Marburg) durchgeführt.

## **2.7 Lungenpräparation unter standardisierten Bedingungen für die Elektronenmikroskopie**

Diese Art der Präparation der Lunge wird für die Herstellung von Präparaten für die Elektronenmikroskopie verwendet, da die vergleichende Analyse der Ultrastruktur nur an standardisiert entfalteten Lungenpräparaten durchgeführt werden kann. Die eigentliche elektronenmikroskopische Analyse der Lungenpräparate wurde im Labor von Herrn Prof. Dr. H. Fehrenbach ausgeführt. Zunächst wird die Trachea des getöteten Tiers freigelegt, eine Trachealkanüle eingeführt und diese mit einer Ligatur fixiert. Dann wird die Lunge samt Trachea und Trachealkanüle aus dem Thorax entnommen und so über einen Plastikschauch an einem Fixativgefäß befestigt, so dass ein Druck von 20 cm Wassersäule auf der Lunge lastet. Unter diesem konstanten Druck wird die Lunge für 20 Minuten entfaltet. Zur Fixierung wird ein 0,1 molarer Cacodylatpuffer mit

1,5% Formaldehyd und 1,5% Glutaraldehyd verwendet. Seine Osmolarität liegt bei 600 mOsmol/kg, der pH-Wert bei 7,35.

## **2.8 Konzentrationsbestimmung von Zytokinen mittels Cytometric Bead Array (CBA)**

Die Konzentration verschiedener Zytokine und Chemokine in Zellkulturüberständen, BAL- oder PL-Proben wird mittels CBA-Technik bestimmt. Dabei werden zwei kommerziell erhältliche Kits verwendet, das BD™ Th1/Th2 Cytokine Kit (IL-2, IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$ , Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und das BD™ Inflammation Kit (IL-6, IL-10, Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), IL-12p70). Als Zytokinstandards werden neun Verdünnungen im Bereich von 20 – 5000 pg/ml benutzt.

Die Grundlage für die Messung dieser verschiedenen Zytokine bilden fünf verschiedene Arten von Latexpartikeln, die bei Anregung mit einem Laser (488 nm) eine unterschiedliche Fluoreszenzintensität zeigen. Jeder der fünf Partikelarten ist zudem mit einem Primärantikörper beschichtet, der ein bestimmtes Zytokin spezifisch bindet. Nach der Zugabe der Proben bzw. der verschiedenen Zytokinstandards wird ein zweiter PE-konjugierter Antikörper hinzugefügt. Die Probelösung wird dann mittels FACScan (Becton Dickinson, USA) und Becton Dickinson CBA Software ausgewertet. Die Anregung durch den Laser ruft bei jedem Partikel, der eines der fünf Zytokine spezifisch an seiner Oberfläche gebunden trägt, zwei Fluoreszenzsignale hervor: zum einen lassen sich aufgrund der Antikörperspezifität und der Eigenfluoreszenz der Partikel die Zytokine diskriminieren, zum anderen kann anhand der PE-Fluoreszenzintensität der gebundenen Sekundärantikörper auf die Konzentration der verschiedenen Zytokine geschlossen werden. Die Analyse wird gemäß Protokoll des Herstellers durchgeführt.

## **2.9 Konzentrationsbestimmung von Immunglobulinen mittels Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)**

Die Serumkonzentration der OVA-spezifischen Immunglobuline (OVA<sub>spec</sub> Ig) der Subklassen IgE, IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>2a</sub> wurden mittels Sandwich-ELISA gemessen. Hierzu wird zunächst eine Flachboden-Mikrotiterplatte (MaxiSorp™ Surface, 96 Kavitäten, Nunc, Roskilde, DK) mit einer OVA-Lösung (OVA Grade VI, 20 mg/ml



PBS, 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>) beschichtet und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Lösung wird verworfen und die Platte dreimal mit Waschpuffer (PBS mit 0,1% TWEEN (Merck, Darmstadt, D)) gewaschen. Die übrigen Bindungsstellen werden mit einem Block-Puffer (PBS mit 3% Bovines Serum Albumin (BSA), Sigma, Stainheim, D) in einer 3-stündigen Inkubation bei RT abgesättigt. Im nächsten Schritt werden die Serumproben entsprechend der zu messenden Ig-Subklassen verdünnt (für OVA<sub>spec</sub> IgE 1:20, für OVA<sub>spec</sub> IgG<sub>1</sub> 1:1000 und für OVA<sub>spec</sub> IgG<sub>2a</sub> 1:500 000) und von dieser Verdünnung sowie von den Ig-Standards (Standard-Mausserum, Anti-OVA IgG<sub>1</sub> bzw. Anti-OVA IgG<sub>2a</sub>, Pharmingen, Hamburg, D) 50 µl aufgetragen. Die Ig-Standards werden in folgenden Konzentrationen aufgetragen: Anti-OVA IgE 8-1000 LU, Anti-OVA IgG<sub>1</sub> 88 pg/ml - 88 ng/ml, Anti-OVA IgG<sub>2a</sub> 88 pg/ml - 88 ng/ml. Im Anschluss wird erneut bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen werden 50 µl biotinylierte Anti-Maus IgE-, Anti-Maus IgG<sub>1</sub>- bzw. Anti-Maus IgG<sub>2a</sub>-Antikörper (2,5 µg/ml, Anti-Maus IgE, Anti-Maus IgG<sub>1</sub> bzw. Anti-Maus IgG<sub>2a</sub>, biotinyliert, Pharmingen, Hamburg, D) hinzugegeben und für 2 Stunden bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Auf erneutes dreimaliges Waschen folgt die Hinzugabe von 50 µl Streptavidin-Peroxidase-Lösung (1:1000 in PBS, Sigma, Stainheim, D). Die Platte wird danach für 30 Minuten bei RT auf einem Schüttler inkubiert, bevor 100 µl POD-Substratlösung (BM blue POD Substrate, Roche, Mannheim, D) aufgetragen werden. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT und unter Lichtabschluss wird die eintretende Farbreaktion mit dem Hinzufügen von 50 µl 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, D) abgestoppt. Letzteres bewirkt einen Farbumschlag von blau nach gelb, dessen Absorption bei 450 nm in einem Absorptionsphotometer (Tecan Sunrise, Salzburg, A) gemessen wird. Die Auswertung der Analyse erfolgt unter Zuhilfenahme der Photometersoftware Magellan 2 (Tecan, Salzburg, A).

## **2.10 Messung der Atemwegsreagibilität gegenüber β-Methyl-Acetylcholin (MCh)**

Die Head-out Body-Plethysmographie ermöglicht die Messung verschiedener Lungenfunktionsparameter, wie dem halbmaximalen expiratorischen bzw. inspiratorischen Atemfluss, dem Atemzugvolumen, der Expirations- bzw. Inspirationszeit, sowie der Atemfrequenz am spontan atmenden, nicht-anästhesierten Tier. Als Basis für die Berechnung dieser Parameter dient der

expiratorische bzw. inspiratorische Atemfluss, der aus einer atmungsbedingten Druckveränderung innerhalb eines Head-out Body-Plethysmographen abgeleitet wird. Während der Messung wird MCh als Acetylcholin-Derivat benutzt, um eine Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur zu induzieren, was eine Erhöhung des Atemwegswiderstands und somit eine Verringerung des halbmaximalen expiratorischen Atemflusses ( $EF_{50}$ ) bewirkt. Letztlich wird die MCh-Konzentration ermittelt, die eine 50%ige Reduktion des Ausgangswerts des halbmaximalen expiratorischen Atemflusses bewirkt ( $MCh_{50}$ ).

### **2.10.1 Aufbau der Messapparatur**

Die Messapparatur besteht aus einer 2,5 Liter großen Glasexpositions-kammer (Forschungswerkstätten, Medizinische Hochschule Hannover, D), in die vier Head-out Body-Plethysmographen eingefügt sind und somit bis zu vier Tieren gleichzeitig gemessen werden können. Die Expositions-kammer kann über einen Eingang belüftet, sowie mit Aerosolen versorgt werden. Die Abluft wird durch einen Ausgang unter einem kontinuierlichen Luftstrom von 14 Litern/Minute mit einer Membran-Vakuum-Pumpe abgesaugt.

Die einzelnen Head-out Body-Plethysmographen sind derart gestaltet, dass sich die Maus mit dem Rumpf im Plethysmographen befindet, während ihr Kopf durch eine individuell angefertigte, luftdicht abschließende Halskrause in das Lumen der Expositions-kammer hineinragt. Die Halskrause ist aus Latex-Kofferdam (Roeko, Langenau, D) gefertigt, besitzt eine kreisrunde Öffnung für den Durchtritt des Mäusekopfes und ist mit Gewebepband an der vorderen Öffnung des Plethysmographen befestigt. Durch die Bewegung des Brustkorbs des atmenden Tiers wird die Luft in der Kammer komprimiert oder gedehnt. So entsteht am Ableitungsrohr des Plethysmographen ein Luftstrom. Dieser wird von einem Pneumotachographen (PTM 378/1.2, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, D) gemessen. Der Druck in der Kammer entspricht den Fluktuationen am Pneumotachographen und ist somit der Atemstromstärke proportional. Durch ein Potentiometer (CFBA, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, D) wird das Atemflusssignal jedes Tiers einzeln verstärkt. Dieses verstärkte Signal wird an einen Personal Computer mit Analog-Digital-Wandlerkarte weitergeleitet. Die weitere Analyse und Speicherung der Daten geschieht an diesem Computer unter Zuhilfenahme einer NOTOCORD hem 3.5 Software (Notocord, Paris, F).

### **2.10.2 Messablauf**

Zu Beginn einer jeden Messung wird zunächst 15 Minuten lang die sogenannte Baseline  $X \pm SD$  für den  $EF_{50}$  ermittelt. In diesen 15 Minuten atmet die Maus ungefähr 4000 Mal ein und aus. Alle während dieser Messperiode aufgenommenen Werte werden gemittelt und für jeden dieser Mittelwerte wird der Wert 100 festgelegt. Somit werden entsprechende Veränderungen gegenüber diesen Kontrolldaten als prozentuale Abweichungen von der Baseline erfasst. Anschließend wird alle 5 Minuten für jeweils 70 Sekunden eine MCh-Lösung ( $\beta$ -Methyl-Acetylcholin, Sigma, Stainheim, D) in aerosoler Form in die Expositionskammer geleitet, während die Lungenfunktionsparameter weiterhin kontinuierlich aufgenommen werden. Dabei werden folgende Konzentrationen von MCh in PBS in aufsteigender Reihe verwendet: 0 mg/ml, 12,5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml und 125 mg/ml.

### **2.11 Perfusion der Lunge**

Zur Gewinnung von  $CD4^+$  T-Lymphozyten aus dem Lungengewebe muss zuvor die Lunge lavagiert und perfundiert werden, um eine Kontamination der Probe durch Lymphozyten aus dem broncho-alveolären Lumen bzw. dem Gefäßsystem zu verhindern. Den zu untersuchenden Tieren (Körpergewicht durchschnittlich: 20g) wird etwa 60 Minuten vor Präparationsbeginn von 50  $\mu$ l Heparinlösung (Liquemin ® N5000, Roche, Germany) intraperitoneal injiziert, so dass eine spätere Blutgerinnung bei der Perfusion des Lungenkreislaufs unterbleibt. Zu Beginn der Präparation des Tieres wird dieses durch i.p. Injektion von 180  $\mu$ l eines Ketanest/Rompun-Gemisches (125 mg/ml, Ketamin, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe; 8 mg/ml Rompun 2%, Bayer, Leverkusen, Germany) anästhesiert. Sind keinerlei Reflexe des Tieres mehr vorhanden beginnt die Präparation mit Eröffnung der Bauchhöhle. Das Tier wird dann durch Durchtrennen der Bauchaorta getötet, um möglichst viel Blut aus dem Kreislauf durch Ausbluten zu entfernen. Anschließend wird der Thorax eröffnet, die Trachea freigelegt und mit einem Trachealkatheter kanüliert. Zunächst wird dann die Lunge über den Trachealkatheter mit 5 ml eiskaltem PBS lavagiert, um die in das broncho-alveoläre Lumen infiltrierten Leukozyten zu entfernen. Jetzt wird mit einem kleinen Schnitt das rechte Atrium eröffnet und eine Kanüle in dieses

eingeführt. Über diese Kanüle wird nun eiskaltes PBS unter beständigem Druck von 20 cm Wassersäule in den Lungenkreislauf geleitet. Nach Eröffnung des linken Atriums kann das Blut aus dem Lungenkreislauf entweichen. Durch zyklisches Einblasen von Luft aus einer 5 ml Spritze über den Trachealkatheter in die Lunge wird dabei das Blut aus dem Gefäßsystem gedrückt. Die Perfusion muss solange durchgeführt werden bis die Lunge einheitlich weiß und damit das Blut entfernt ist (Abbildung 2.11).

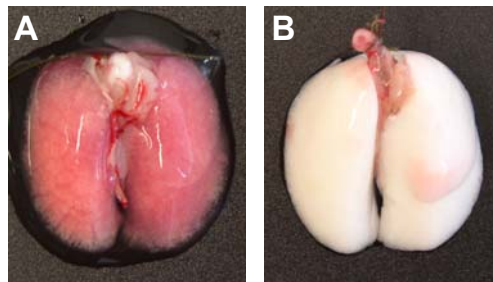


Abbildung 2.11: A Murine Lunge entfaltet; B murine Lunge, entfaltet und perfundiert.

### **2.12 Herstellung einer Lungenzellsuspension**

Nach der Perfusion wird die Lunge aus dem Thorax entnommen und in eiskaltem PBS mit einer Spitzschere in 5x5 mm große Stücke zerteilt. Diese werden in einen Zell-Shredder (79400S Medicons, 50  $\mu$ m, DAKO Cytomation, Hamburg, DK) gegeben und mittels DAKO Medimachine (DAKO Cytomation, Hamburg, DK) zwei Minuten lang zerrieben. Bei dieser Prozedur wird die Lunge durch ein Stahlnetz mit 50  $\mu$ m Porendurchmesser gerieben. Durch 5-maliges Spülen des Shredders mit eiskaltem PBS wird eine Lungenzellsuspension hergestellt, die zunächst auf Eis gelagert wird und weder Leukozyten aus dem bronchoalveolären Lumen noch aus dem Blut enthält.

### **2.13 Herstellung einer Milzzellsuspension**

Die Entnahme der Milz aus dem getöteten Tier wird unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Milz wird zunächst in sterilem RPMI-Medium (RPMI 1640, Cedarlane, Hornby, CAN) aufgenommen. Danach werden die Zellen durch ein feinmaschiges Nylonnetz (Porengröße: 50  $\mu$ m) gedrückt und somit aus dem Gewebeverband gelöst. Die so entstehende Einzellsuspension wird danach in 4 ml RPMI-Medium aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

### **2.14 Leukozytenseparation durch Dichtegradienten-Zentrifugation**

Eine Zellsuspension, die aus festem Gewebe hergestellt wurde, enthält neben den infiltrierten Leukozyten auch verschiedene Strukturzellen. Um die Leukozyten aus der Lungen- bzw. Milzzellsuspension zu separieren, wird eine Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Dazu wird ein Volumen Separationsmedium (Lympholyte®-M, Cedarlane Laboratories, Hornby, Ontario, Kanada), vorsichtig mit einem entsprechenden Volumen (Verhältnis 1:1) Zellsuspension überschichtet. Anschließend wird die Probe für 20 min bei 4°C und 1200 g ungebremst zentrifugiert. Bei der Zentrifugation scheiden sich mononukleäre Zellen (Lymphozyten, Makrophagen, z.T. Granulozyten) an der Phasengrenze ab. Dieser Interphasenring wird vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen. Die Zellen werden durch dreimaliges Waschen mit eiskaltem PBS (Zentrifugation bei 350g für 10 min bei 4°C) vom Separationsmedium befreit. Die Leukozytenkonzentration wird danach mittels Casy® Zellzählsystem (CASY® Cell Counter Model TT, Schärfe System, Reutlingen, Germany) bestimmt. Diese Suspension aus mononukleären Zellen (MNC) kann anschließend auf Eis gelagert werden.

### **2.15 Kurzzeitstimulation der MNC-Kultur**

Mononukleäre Zellen werden so in RPMI 1640 Medium (PAA, Linz, D) aufgenommen, dass die Zellkonzentration  $2 \times 10^6$  Zellen/ml beträgt. Die Zellsuspension wird auf einer Zellkulturplatte (24 Kavitäten, Flachboden, Greiner, Frickenhausen, D) mit je 1 ml pro Kavität ausplattiert. Danach wird zur Restimulation OVA (OVA Grade V, Endkonzentration 50 µg/ml) in die Zellkultur gegeben. Um den Einfluss einer TLR-3- bzw. TLR-7-Aktivierung auf die Antigen-Restimulation zu untersuchen, wurde zusätzlich poly (I:C) (Endkonzentration 100 µg/ml) bzw. R-848 (Endkonzentration 100 µg/ml) in die Kultur gegeben. Die so präparierten Zellen werden dann in einem Brutschrank (Heraeus, Berlin, D) für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Danach wird der Überstand abgenommen und zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert. Die Zellen werden resuspendiert, für 5 Minuten bei 800g zentrifugiert und das Zellpellet zur RNA-Aufreinigung in RLT-Puffer (RNeasy® Kit, Quiagen, Hilden, D) aufgenommen.

## **2.16 Aufreinigung CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten durch Magnet-Bead-Separation**

Zur Aufreinigung von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus einer Leukozytensuspension werden antikörperbeschichtete Magnetbeads verwendet. Zunächst wird die Zellsuspension für 10 min bei 350g und 4° C zentrifugiert, das Pellet in 1ml PBS mit 1% inaktiviertem FCS (Fetal Calf Serum) resuspendiert und in ein Eppendorf-Cup überführt. Jetzt werden auf je 1 x 10<sup>7</sup> Leukozyten 540 µl anti-CD4-Magnetbeads (Dynabeads® mouse CD4 (L3/T4), Dynal ASA, Oslo, Norge) gegeben. Anschließend wird die Probe 20 min auf einem Schüttler bei 4°C inkubiert. Danach wird die Probe in einen Separationsmagneten (Dynal® MCL-P, Dynal ASA, Oslo, Norwegen) gestellt und 2 min inkubiert. Nach erfolgter Separation der Magnetbead-Zell-Verbände wird der Überstand abgenommen und verworfen, die Magnetbead-Zell-Verbände in 1 ml Puffer resuspendiert. Dieser Waschschrift wird dreimal wiederholt. Nach so erfolgter Aufreinigung wird die Zellzahl mittels CASY® Zellzählssystem bestimmt und die Lymphozytensuspension auf Eis gelagert.

## **2.17 FACS-Analyse der Lymphozytensuspension**

Die Effizienz der CD4-Lymphozytenreinigung mittels Magnet-Bead-Separation wurde durch eine Analyse mit einem Fluorescence-activated Cell Sorter (FACS) ermittelt. Dazu wurde eine Probe (1 x 10<sup>6</sup> Zellen) der jeweiligen Aufreinigung in 1 ml Cell Wash (Becton Dickinson, USA) aufgenommen. Um unspezifische Bindungen der eingesetzten Antikörper zu verhindern, wurde der Probe Mausserum (Mouse serum (normal), DAKO, DK) bis zu einer Endkonzentration von 1% zugesetzt. Durch Hinzugabe von eines F<sub>c</sub>-Block-Antikörpers (anti-mouse CD 32/16- F<sub>γ</sub> II/III Rezeptor (Ly 17.1/17.2), MM7400 Caltag Laboratories, Burlingane, Franklin Lakes, USA) wurde die unspezifische Bindung der eingesetzten Antikörper an die auf Makrophagen vorhandenen F<sub>c</sub>-Rezeptoren unterbunden. Die so präparierten Proben wurden 20 Minuten lang inkubiert und danach nochmals gewaschen. Daraufhin wurden die Proben nach unten angegebenem Schema hinzugefügt, um verunreinigende Lymphozyten, wie NK-Zellen (Pan-NK) oder B-Lymphozyten (Cd 19) nachzuweisen. Die Konzentration der Antikörper betrug dabei 1 µl je 10<sup>6</sup> Zellen. Die folgende 45 minütige Inkubation fand bei Raumtemperatur im unter Lichtausschluss statt. Danach wurde nochmals gewaschen und das Zellpellet in 200 µl Cell wash mit 4%

Formaldehyd resuspendiert. Die Analyse erfolgte am FACScan (Becton Dickinson, Franklin Lake, USA) und am Apple McIntosh PC mit Cell Quest 3.22i Software.

Folgende Antikörper von Becton Dickinson (Franklin Lake, USA) wurden verwendet:

FITC anti-mouse CD 8a (Ly-2) (53-6.7)  
FITC anti-mouse CD 19 (1D3)  
FITC anti-mouse Pan-NK (DX 5)  
PE anti-mouse CD 4 (L3T4) (H129.19)  
PE anti-mouse CD 3e (CD 3 $\epsilon$ -chain) (145-2C11)  
Per CP anti-mouse CD 3e (CD 3 $\epsilon$ -chain) (145-2C11)  
Per CP anti-mouse CD 45 (LCA, Ly-5) (30-F11)

Folgende Isotypkontrollen für die obigen Antikörper wurden verwendet:

Per CP armenian hamster IgG<sub>1</sub>,  $\kappa$   
PE rat anti-mouse IgG<sub>2b</sub>,  $\kappa$ , isotype control  
FITC rat anti-mouse IgG<sub>2a</sub>,  $\kappa$ , isotype control  
FITC rat anti-mouse IgM,  $\kappa$ , (II / 41)  
Per CP rat anti-mouse IgG<sub>2a</sub>,  $\kappa$ , isotype control

### **2.18 RNA-Aufreinigung aus einer Einzellzellsuspension und DNase-Verdau**

Die Aufreinigung von RNA aus einer Einzellzellsuspension wurde mittels eines RNeasy® Mini Kits (Qiagen, Hilden, D) gemäß Protokoll des Herstellers durchgeführt. Um die RNA-Probe von verunreinigender DNA zu reinigen wurde während der RNA-Aufreinigung ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurden 10  $\mu$ l DNase (Invitrogene, Karlsruhe, D) während der RNA-Aufreinigung auf die RNA-Säulen-Membran gegeben und für 15 Minuten bei RT inkubiert.

### **2.19 RNA-Quantifizierung und Qualitätsanalyse**

Der RNA-Gehalt einer 1:100 verdünnten Probe wird durch eine Absorptionsmessung mittels Gene Quant II (RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) bestimmt. Für die Qualitätsanalyse der RNA-Probe wird eine Gelelektrophorese mit einem 1%igen Agarosegel (Roche, Mannheim,

D) durchgeführt. Dazu werden zu je 10 µl RNA-Probe 10 µl RNA-Sample-Buffer (Sigma, Stainheim, D) und 3,3 µl 6-fach Gel-Loading-Solution (Sigma, Stainheim, D) hinzugefügt und dieser Ansatz für 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Danach werden die Proben auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese für 2 Stunden bei 150 mA durchgeführt.

## **2.20 Reverse Transkription**

Bei der Reversen Transkription wird die aufgereinigte RNA als Matrize für die Synthese eines cDNA-Strangs verwendet, die als Produkt aus der Reaktion hervorgeht. Dazu werden zu 1 µg RNA (Probe) und 0,25 µl Hexanukleotide als Primer (Random Hexamers, Promega, Mannheim, D) in ein RNase-freies Reaktionsgefäß gegeben und der Reaktionsansatz bis zu einem Endvolumen von 12 µl mit RNase freiem Wasser aufgefüllt. Dieser Reaktionsansatz wird dann für 5 Minuten bei 70°C und danach für weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. Diesem werden danach 5 µl M-MLV RT 5-fach Reaktionspuffer (Promega, Mannheim, D), 1, 25 µl 10 mM dNTP's (PCR Nucleotide Mix, Promega, Mannheim, D), 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (H-) (200 U) (Promega, Mannheim, D), 1 µl DTT (Promega, Mannheim, D), 1 µl RNasin (Promega, Mannheim, D) und 3,75 µl RNase freies Wasser hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wird zunächst für 10 Minuten bei RT, danach für 50 Minuten bei 42°C und abschließend für 15 Minuten bei 70°C inkubiert. Danach wird 1 µl RNase H (3 U) (Invitrogene, Karlsruhe, D) hinzugefügt. Der RNA-Verdau wird für 20 Minuten bei 37°C durchgeführt.

## **2.21 Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Die Quantifizierung der relativen Expression der Transkriptionsfaktoren Gata-3, Tbet und Fox P3 wurden mittels Light Cycler System (Roche, Mannheim, D) durchgeführt. Dazu werden 0,5 µg DNA Probe als Matrize für die PCR verwendet. Diesem werden 10 µl 2-fach QuantiTect™ SYBR® Green PCR Master Mix sowie 1 µl 0,5 µM Forward bzw. Reward Primer (Metabion, Planegg-Martinsried, D) für die entsprechenden Gensequenz der Transkriptionsfaktoren hinzugefügt. Insgesamt werden zur Analyse 45 Zyklen durchgeführt. Dabei beträgt die Denaturierungstemperatur 94°C, die Annealingtemperatur 55°C und die Extensionstemperatur 72°C.



## **2.22 mRNA-Amplifikation**

Da die RNA-Ausbeute aus den aus dem Lungengewebe stammenden CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten zu gering für eine direkte Transkriptom-Analyse mittels Gene-Array-Technologie ist, muss diese zunächst amplifiziert werden. Die Amplifikation besteht dabei aus einer reversen Transkription deren Produkt eine dscDNA ist, die wiederum in einer *in-vitro* Transkription dazu dient, aRNA zu synthetisieren.

### **2.22.1 Erststrang-DNA-Synthese**

Als erster Schritt der RNA-Amplifikation wird zunächst eine First-Strand-Synthese durchgeführt. Dazu werden zu der RNA-Probe 4 µl First Strand Buffer (Invitrogene, Karlsruhe, D), 2 µl 0,1 M DTT (Invitrogene, Karlsruhe, D), 1 µl 100 pmol/µl T7-(T)<sub>24</sub> primer (Metabion, Planegg-Martinsried, D) sowie 1 µl 10 mM dNTP`s (Invitrogene, Karlsruhe, D) in ein RNase-freies 1,5 ml-Mikrozentrifugenröhrchen gegeben. Dieser Ansatz wird zunächst für 5 Minuten bei 65°C, danach für 2 Minuten bei 42°C inkubiert. Danach werden 2 µl SSII-Reverse Transkriptase (Invitrogene, Karlsruhe, D) hinzugefügt und für 1 Stunde bei 42°C inkubiert.

### **2.22.2 Zweitstrang-DNA-Synthese**

Der zweite Schritt der RNA-Amplifikation ist die Second-Strand-Synthese. Dazu werden zu der Probe aus der vorangegangenen First Strand Synthese 30 µl 5-fach Second-Strand-Buffer (Invitrogene, Karlsruhe, D), 4 µl *E. coli* DNA-Polymerase (40 U) (Invitrogene, Karlsruhe, D), 3 µl 10 mM dNTP Mix (Invitrogene, Karlsruhe, D), 1 µl *E. coli* DNA-Ligase (Invitrogene, Karlsruhe, D), 0,7 µl RNase H (2 U) (Invitrogene, Karlsruhe, D), und 91,3 µl DEPC H<sub>2</sub>O (Invitrogene, Karlsruhe, D) hinzu gegeben. Dieser Ansatz im Anschluss für 2 Stunden bei 16°C inkubiert.

### **2.22.3 dscDNA-Aufreinigung**

Die nach der Second Strand Synthese als Produkt vorliegende dscDNA wird mit einem QIAquick® Kit (Qiagen, Hilden, D) gemäß Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Die eluierte dscDNA (Probenvolumen: 30 µl) wird im Anschluss mit einem Vakuum-Verdampfer (Speed Vac Concentrator, Bachhofer, Reutlingen, D)

ca. 40 Minuten eingedampft, bis nahezu kein Wasser mehr in der Probe ist. Das Pellet wird danach in 8 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

#### **2.22.4 aRNA-Synthese: T7 *in vitro* Transkription**

Die *in-vitro* Transkription wird nicht auf Eis durchgeführt, da es ansonsten wegen des Spermidingehalts des Reaktionspuffers zu einer Präzipitation der DNA kommen könnte. Für die Reaktion wird ein Ambion Mega Script™ Kit gemäß Protokoll des Herstellers verwendet.

#### **2.23 DNA-Markierung für die Transkriptom-Analyse**

Für die Transkriptom-Analyse einer bestimmten Probe wird eine zusätzliche Probe benötigt, um eine die relative Veränderung der Genexpression angeben zu können. In diesem Fall werden RNA-Proben von CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten aus der Lunge von Tieren mit einer akuten vs. chronischen allergischen Entzündung in der Lunge analysiert.

Für die Markierung der DNA wurde eine weitere Reverse Transkription unter Verwendung des CyDye™ Post-Labeling Kits (Amersham Biosciences, Freiburg, D) durchgeführt. Dabei werden amin-modifizierte Nukleotide als Bausteine der zu produzierenden DNA verwendet. Bei diesen Amin-Modifikationen handelt es sich um Amino-Allyl-Reste, an die in der Labeling-Reaktion die Farbstoffe Cy3 (für die Probe „akutes“ Asthma) bzw. Cy5 (für die Probe „chronisches“ Asthma) gekoppelt werden.

#### **2.24 Hybridisierung der DNA auf dem Gene-Array-Chip und Auswertung**

Für die Hybridisierung der fluoreszenz-markierten DNA-Proben wurden 11,5K-Maus-Gene-Array-Chips (bezogen aus der Gene-Array-Unit des Instituts für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg), auf dem 11 500 Genabschnitte analysiert werden können. Da es sich bei den auf dem Chip befindlichen Genabschnitten um PCR-Produkte handelt, die untereinander Doppelstrangbindungen eingehen, muss der Chip zunächst 10 Minuten in kochendem Wasser inkubiert werden, um einzelsträngige DNA-Proben zu erhalten. Danach wird der Chip kurz in -20°C kaltes 70%iges Ethanol (Sigma, Steinheim, D) getaucht. Jetzt wird der Chip zunächst einer Prähybridisierung unterzogen. Dazu wird dieser mit 100 µl DIG Easy Hybridisierungslösung (Roche,

Mannheim, D) benetzt und in einer Hybridisierungskammer (Scienion, Berlin, D) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Damit die Hybridisierungslösung nicht während der Inkubation austrocknet, werden 4 x 25 µl DIG Easy Hybridisierungslösung in die Vertiefungen der Hybridisierungskammer gegeben. Danach wird der Chip 3 Minuten unter fließendem Wasser gewaschen. Jetzt folgt die eigentliche Hybridisierungsreaktion. Zunächst werden je 5 µl Hefe t-RNA-Lösung (Yeast t-RNA, 25 mg/ml, Invitrogen, Karlsruhe, D) und Lachs Sperma DNA (Salmon sperm DNA, 10 mg/ml, Invitrogen, Karlsruhe, D) zu 100 µl DIG Easy Hybridisierungslösung gegeben. Dann werden je 5 µl der Cy3- bzw. Cy5-markierten DNA-Proben in 80 µl Hybridisierungspuffer aufgenommen und für 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Im Anschluss wird auf den Gene-Array-Chip ein Deckglas (LifterSlip, 25x60 mm, Implent, München, D) aufgebracht und je Chip 45 µl Hybridisierungslösung mit Probe aufgetragen. Die Hybridisierungskammer wird wie zuvor beschrieben mit DIG Easy Hybridisierungslösung beschickt und über Nacht bei 37°C in einen Wärmeinkubator (Biometra, Göttingen, D) eingebracht. Danach wird der Gene-Array-Chip gewaschen. Dazu wird zunächst eine Waschlösung aus SSC-Puffer (SSC-Buffer, Ambion, Huntingdon, UK) mit 0,1% Triton® X 100 (Sigma, Steinheim, D) auf 55°C erwärmt und daraufhin wird der Gene-Array-Chip darin dreimal für 15 Minuten inkubiert. Es folgen zwei 15-minütige Inkubationen in dieser Waschlösung bei 30°C, sowie eine Inkubation für 30 Sekunden in reinem SSC-Puffer bei 30°C und eine Inkubation für 10 Sekunden in SSC-Puffer 1:10 verdünnt mit PBS. Im Anschluss daran wird der Gene-Array-Chip unter Stickstoff trocken geblasen und kann analysiert werden. Die Messung der Fluoreszenzintensitäten der Cy3- bzw. Cy5-markierten DNA-Proben wird mittels GMS 418 Array Scanner (Genetic MicroSystems, Woburn, USA) gemessen und mittels Genepix Pro 6.0 Software (Genetic MicroSystems, Woburn, USA) auf einem Personalcomputer ausgewertet.

## **2.25 Statistik**

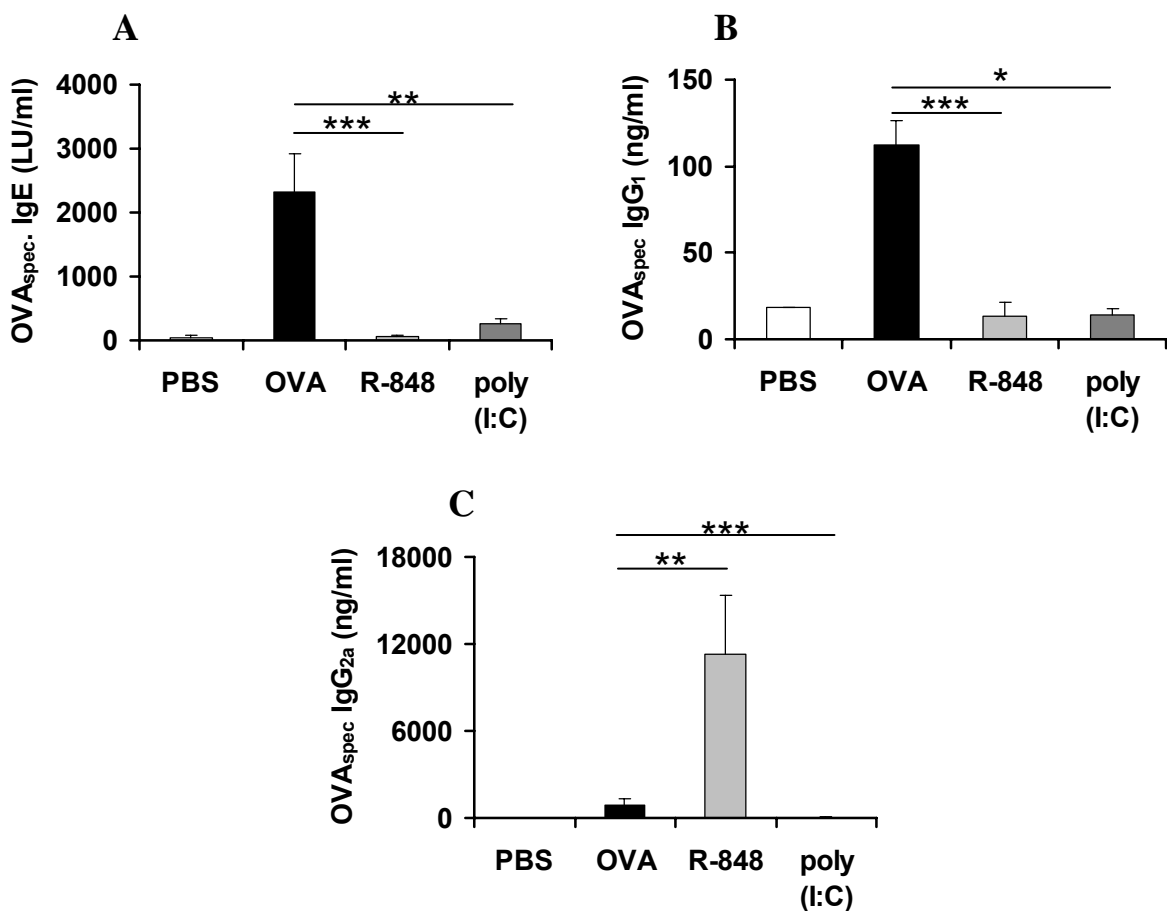
Die graphische, sowie statistische Auswertung wurden unter Verwendung von Microsoft Excel sowie von GraphPad Prism® durchgeführt. Sämtliche Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) angegeben. Zur Überprüfung von Unterschieden zwischen den Vergleichsgruppen auf statistische

Signifikanz wurde der ANOVA-Test verwendet. Ein p-Wert  $\leq 0,05$  wird dabei als Signifikanzniveau festgelegt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Die TLR-3- bzw. TLR-7-Aktivierung verhindert die allergische Sensibilisierungsreaktion

Der Einfluss einer TLR-3-Aktivierung durch den Liganden Poly (I:C) bzw. einer TLR-7-Aktivierung durch den Liganden R-848 auf die allergische Sensibilisierungsreaktion wurde in einem Mausmodell für ein experimentelles Asthma untersucht.



**Abb. 3.1.1 Beeinflussung der OVA-spezifischen Immunglobulintiter im Serum durch Applikation viraler TLR-Liganden während der Sensibilisierungsreaktion**

BALB/c Mäuse (je Gruppe n=8) wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abb. 2.2.1). An den Tagen -1, 6, 13 und 20 des Sensibilisierungsprotokolls wurde poly (I:C) bzw. R-848 systemisch appliziert. Die Abnahme der Blutproben zur Serumgewinnung fand 24 Stunden nach der letzten OVA-Exposition statt. Die Seruntiter der OVA<sub>spec</sub> IgE (A), IgG<sub>1</sub> (B) und IgG<sub>2a</sub> (C) wurden mittels ELISA-Technik bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (\*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001).

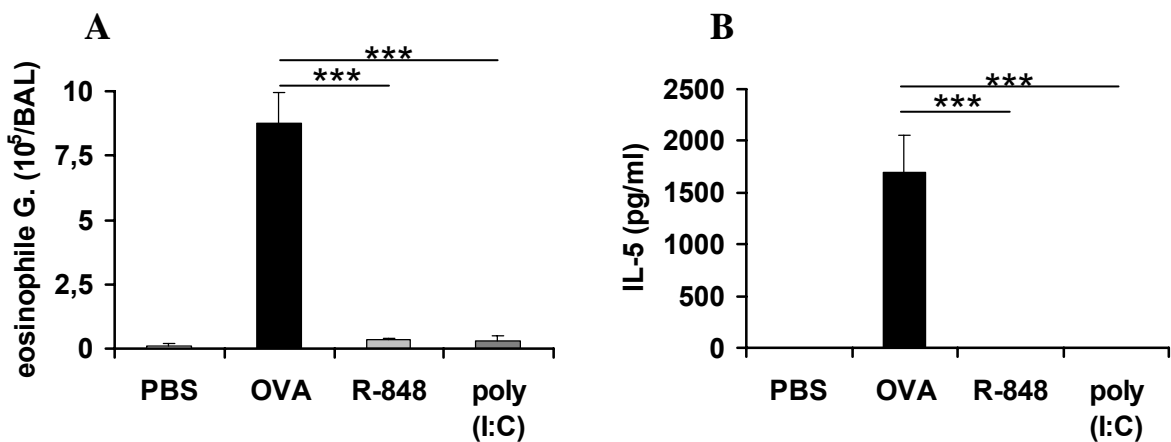
Dazu wurden die jeweiligen TLR-Liganden 24 Stunden vor der jeweiligen Injektion des Ovalbumins und des Adjunvans` systemisch appliziert. Zunächst wurden die Seruntiter OVA-spezifischer ( $OVA_{spec}$ ) Antikörper der Subklassen IgE, IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>2a</sub> bestimmt (Abb. 3.1.1). In der PBS-Gruppe, die als Negativkontrollgruppe diente, ließen sich relativ niedrige Seruntiter  $OVA_{spec}$  IgE ( $47 \pm 26$  LU/ml), IgG<sub>1</sub> ( $18,2 \pm 0,2$  ng/ml) und IgG<sub>2a</sub> ( $0 \pm 0$  ng/ml) nachweisen, während die OVA-Gruppe als Positivkontrollgruppe deutlich erhöhte Seruntiter an  $OVA_{spec}$  IgE ( $2315 \pm 601$  LU/ml) und IgG<sub>1</sub> ( $112,1 \pm 14,5$  ng/ml) zeigte. Der Seruntiter an  $OVA_{spec}$  IgG<sub>2a</sub> der OVA-Gruppe zeigte einen mäßigen Anstieg ( $892 \pm 444$  ng/ml). Im Vergleich zur OVA-Gruppe wiesen weder Tiere (poly (I:C)), die poly(I:C), noch Tiere (R-848), die R-848 während der Sensibilisierungsphase erhalten hatten, einen signifikant erhöhte Seruntiter an  $OVA_{spec}$  IgE (poly (I:C):  $257 \pm 85$  LU/ml; R-848:  $58 \pm 15$  LU/ml) bzw. an  $OVA_{spec}$  IgG<sub>1</sub> (poly(I:C):  $14,3 \pm 3,2$  ng/ml; R-848:  $16,9 \pm 4,1$  ng/ml). Des Weiteren zeigte die R-848-Gruppe massiv erhöhte Seruntiter an  $OVA_{spec}$  IgG<sub>2a</sub> ( $11298 \pm 4095$  ng/ml), der in der poly (I:C)-Gruppe nicht zu beobachten war ( $31 \pm 21$  ng/ml).

Die Ergebnisse der Seruntiterbestimmung der verschiedenen  $OVA_{spec}$  Immunglobuline zeigen, dass die systemische Applikation der TLR-Liganden Poly (I:C) bzw. R-848 24 Stunden vor der jeweiligen OVA/Al(OH)<sub>3</sub>-Injektion keine erhöhte Produktion  $OVA_{spec}$  IgE und IgG<sub>1</sub>, die für die TH<sub>2</sub>-gesteuerte allergische Immunantwort typisch ist, nach sich zieht. Ferner zeigte die Applikation des TLR-7-Liganden R-848 eine massiv gesteigerte Produktion des  $OVA_{spec}$  IgG<sub>2a</sub>, das typisch für eine TH<sub>1</sub>-gesteuerte Immunantwort ist.

Der Phänotyp des experimentellen Asthmas in der Maus wurde durch die Analyse der Zytokine IL-5 und IFN- $\gamma$ , sowie verschiedener Leukozytensubpopulationen in der BAL, der Lungenhistologie und der Atemwegsreagibilität gegenüber MCh charakterisiert. Während in der BAL der PBS-Gruppe neben Makrophagen ( $3,54 \pm 0,85 \times 10^5$  Zellen/BAL) nur vereinzelt Lymphozyten oder eosinophile Granulozyten zu identifizieren waren, zeigte die OVA-Gruppe einen massiven Influx eosinophiler Granulozyten ( $8,75 \pm 1,5 \times 10^5$  Zellen/BAL) und in geringerem Maßen von Lymphozyten ( $0,81 \pm 0,25 \times 10^5$  Zellen/BAL) in das bronchoalveoläre Lumen. Die Anzahl an Makrophagen war im Vergleich zur PBS-Gruppe nicht signifikant verändert ( $2,47 \pm 0,42 \times 10^5$  Zellen/BAL). Im Gegensatz dazu zeigte die BAL sowohl nach Applikation von poly (I:C) als auch von R-848 weder

einen signifikanten Influx eosinophiler Granulozyten (poly (I:C):  $0,31 \pm 0,21 \times 10^5$  Zellen/BAL); R-848:  $0,34 \pm 0,06 \times 10^5$  Zellen/BAL), Lymphozyten (poly (I:C):  $0,03 \pm 0,01 \times 10^5$  Zellen/BAL) ; R-848:  $0,14 \pm 0,04 \times 10^5$  Zellen/BAL) oder Makrophagen (poly (I:C):  $2,76 \pm 0,47 \times 10^5$  Zellen/BAL) ; R-848:  $2,55 \pm 0,52 \times 10^5$  Zellen/BAL). Neutrophile Granulozyten konnten nur vereinzelt in allen vier Gruppen beobachtet werden (Abb. 3.1.2 B).

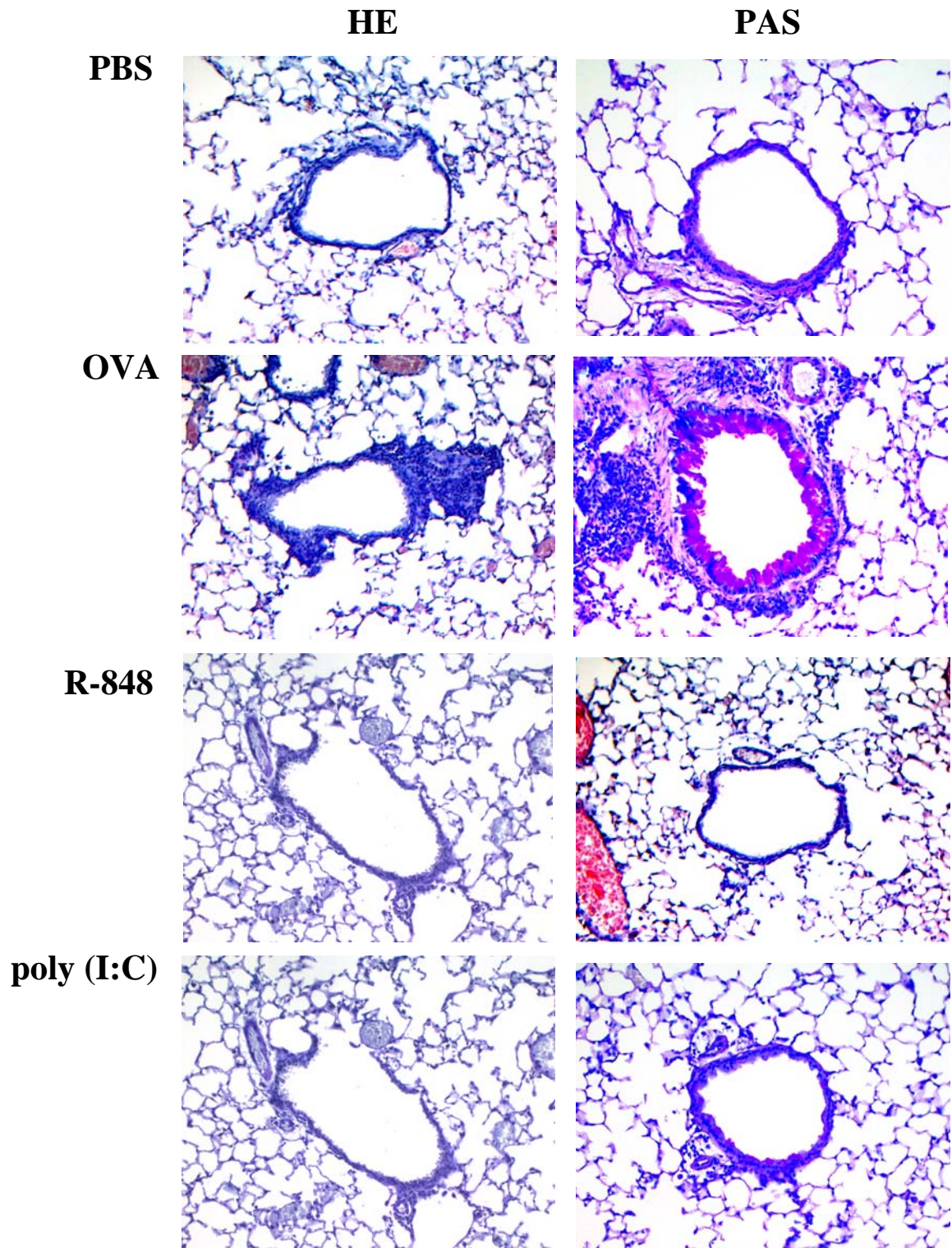
Für die weitere Charakterisierung der Atemwegsentzündung wurden die Konzentrationen der Zytokine IL-5 und IFN- $\gamma$  in der BAL bestimmt. Während IFN- $\gamma$  in der BAL keiner Gruppe detektiert werden konnte, ließ sich in der BAL der OVA-Gruppe eine durchschnittliche IL-5-Konzentration von  $1700 \pm 355$  pg/ml nachweisen. Dieses TH<sub>2</sub>-Leitzytokin ließ sich weder in der PBS-Gruppe noch in der poly (I:C)- oder R-848-Gruppe detektieren (Abb. 3.1.2 B).



**Abb. 3.1.2 Beeinflussung der allergischen Entzündung durch virale TLR-Liganden: A) Anzahl eosinophiler Granulozyten in broncho-alveolärer Lavage-Flüssigkeit (BALF) ; B) Interleukin-5-Konzentration in BALF**

BALB/c Mäuse (je Gruppe n=8) wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abb. 2.2.1). An den Tagen -1, 6, 13 und 20 des Sensibilisierungsprotokolls wurde poly (I:C) bzw. R-848 systemisch appliziert. Die Broncho-alveoläre Lavage fand 24 Stunden nach der letzten OVA-Exposition statt. Die Quantifizierung der eosinophilen Granulozyten wurde lichtmikroskopisch anhand zytologischer Kriterien durchgeführt. Die Konzentration von IL-5 wurde mittels CBA-Technik bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

In der HE-Färbung zeigte sich in lungenhistologischen Präparaten der OVA-Gruppe ein massives leukozytäres Infiltrat in der Atemwegs- wie auch in die Gefäßwand, das vor allem durch eosinophile Granulozyten und im geringeren



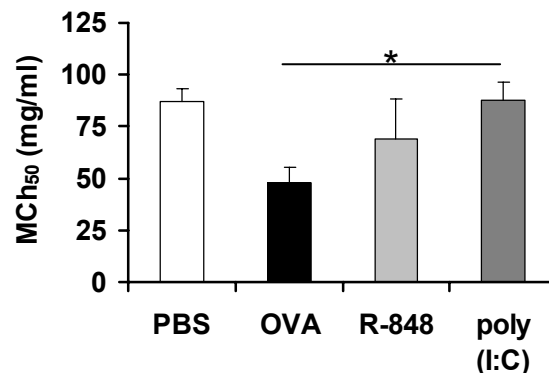
**Abb. 3.1.3 Beeinflussung der allergischen Entzündung durch virale TLR-Liganden: Allergische Atemwegspathologie**

BALB/c Mäuse (je Gruppe n=8) wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abb. 2.2.1). An den Tagen -1, 6, 13 und 20 des Sensibilisierungsprotokolls wurde Poly (I:C) bzw. R-848 systemisch appliziert. Die Lungen wurden durch Instillation von Formalinlösung entfaltet und *in-situ* fixiert. 3 µm dicke Paraffinschnitte wurden HE- bzw. PAS-gefärbt.



Maß durch Lymphozyten charakterisiert ist und somit dem broncho-alveolären Infiltrat entspricht. Durch eine PAS-Färbung der lungenhistologischen Präparate ließ sich diese allergische Entzündung ferner mit einer Becherzellhyperplasie assoziieren. In der PBS-Gruppe, wie auch in der poly (I:C)- und R-848-Gruppe ließen sich weder eine Atemwegsentzündung oder eine Becherzellhyperplasie nachweisen (Abb. 3.1.3).

In der Head-out Body-Plethysmographie wurde zunächst die Atemwegsreabilität (AR) gegenüber MCh der PBS-Gruppe ermittelt, die als Normalwert für die anderen Gruppen dienen wird ( $87,3 \pm 6,2$  mg/ml). Im Vergleich dazu zeigte die OVA-Gruppe eine signifikant erhöhte AR ( $47,95 \pm 7,5$  mg/ml) und zeigt damit die Entwicklung einer Atemwegshyperreagibilität an. Während die AR der poly (I:C)-Gruppe sich nicht von der der PBS-Gruppe unterschied, zeigte die R-848-Gruppe gegenüber der OVA-Gruppe eine deutlich, aber nicht signifikante, verringerte AR ( $69,2 \pm 18,8$  mg/ml) (Abb. 3.1.4).



**Abb. 3.1.4 Einfluss viraler TLR-Liganden auf die Atemwegsreabilität**

BALB/c Mäuse (je Gruppe n=8) wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abb. 2.2.1). An den Tagen -1, 6, 13 und 20 des Sensibilisierungsprotokolls wurde poly (I:C) bzw. R-848 systemisch appliziert. Die Atemwegsreabilität wurde 24 Stunden nach der letzten OVA-Exposition mittels Head-out Body-Plethysmographie bestimmt und wird als die Konzentration an  $\beta$ -Methyl-Acetylcholin (MCh<sub>50</sub>) ausgedrückt, die eine 50%ige Reduktion des Ausgangswerts des halbmaximalen expiratorischen Atemflusses bewirkt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (\* p < 0,05).

Abschließend zeigte sich, dass nach systemischer Applikation sowohl des TLR-3-Liganden poly (I:C), als auch des TLR-7-Liganden R-848 während der Sensibilisierungsphase, eine TH<sub>2</sub>-typische Antikörperantwort unterbleibt, die für

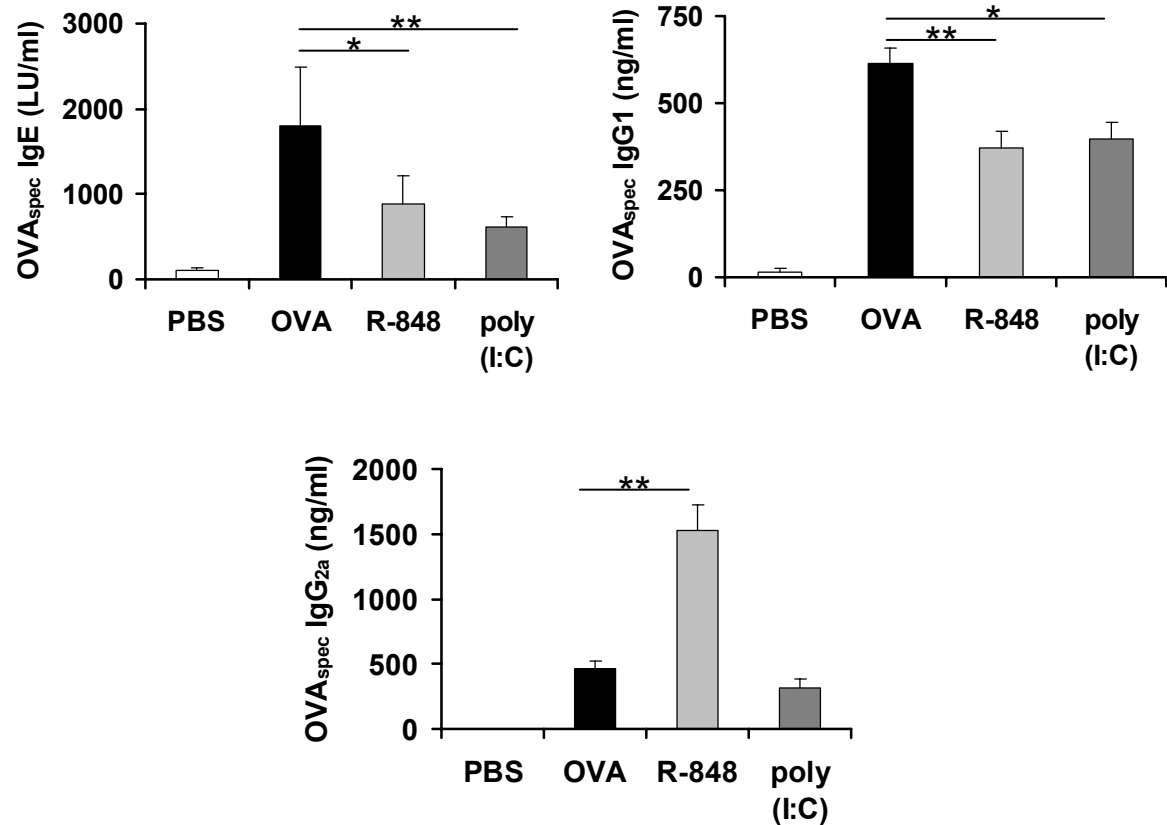
eine allergische Sensibilisierungsreaktion charakteristisch ist. Ferner konnte in diesen Tieren weder eine Entzündung der Atemwege durch eosinophile Granulozyten und Lymphozyten noch eine gesteigerte Mukusproduktion oder Atemwegshyperreagibilität, wie sie für das allergische Asthma typisch ist, nachgewiesen werden.

### **3.2 Die TLR-3- bzw. TLR-7-Aktivierung supprimiert die sekundäre allergische Entzündungsreaktion in der Lunge**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die systemische Applikation von TLR-3- bzw. TLR-7-Liganden während der Sensibilisierungsphase sowohl eine TH<sub>2</sub>-typische OVA<sub>spec</sub> Antikörperproduktion als auch die Ausprägung einer allergischen Atemwegsentzündung verhindern konnte, wurde in der Folge untersucht, welchen Einfluss die systemische Applikation dieser TLR-Liganden auf die sekundäre Immunantwort in einem bereits sensibilisierten Tier hat. Dazu wurde 16 Tage nach Etablierung der allergischen Immunantwort in der Lunge durch eine weitere OVA-Aerosol-Exposition eine sekundäre Immunantwort induziert. Die Applikation der TLR-Liganden fand direkt vor und während der Allergenexposition statt.

Um den Einfluss der systemischen TLR-3- bzw. TLR-7-Aktivierung auf die humorale Immunantwort in bereits OVA-sensibilisierten Tieren zu untersuchen, wurden die Serumtiter der OVA<sub>spec</sub> Antikörper bestimmt. Während in der PBS-Gruppe keine OVA<sub>spec</sub> Antikörper der Subklassen IgE, IgG<sub>1</sub> oder IgG<sub>2a</sub> nachgewiesen werden konnten, war die humorale Immunantwort in der OVA-Gruppe durch hohe Serumtiter an OVA<sub>spec</sub> IgE ( $1750 \pm 286$  LU/ml) und OVA<sub>spec</sub> IgG<sub>1</sub> ( $614,9 \pm 41,7$  ng/ml) charakterisiert. Daneben fand sich auch ein signifikant erhöhter Serumtiter an OVA<sub>spec</sub> IgG<sub>2a</sub> ( $462 \pm 56$  ng/ml). Im Gegensatz dazu zeigten sowohl die Poly (I:C)- wie auch die R-848-Gruppe eine signifikante Verringerung der OVA<sub>spec</sub> IgE- (poly (I:C):  $682 \pm 12$  LU/ml; R-848:  $896 \pm 85$  LU/ml) und der OVA<sub>spec</sub> IgG<sub>1</sub>-Produktion (poly (I:C):  $395,5 \pm 48,2$  LU/ml; R-848:  $372,7 \pm 46,9$  LU/ml). Wie bereits bei der Applikation der TLR-3 bzw. TLR-7-Liganden während der Sensibilisierungsphase zeigte sich in diesem Fall nach systemischer Applikation von R-848 ein gegenüber der OVA-, wie auch der Poly

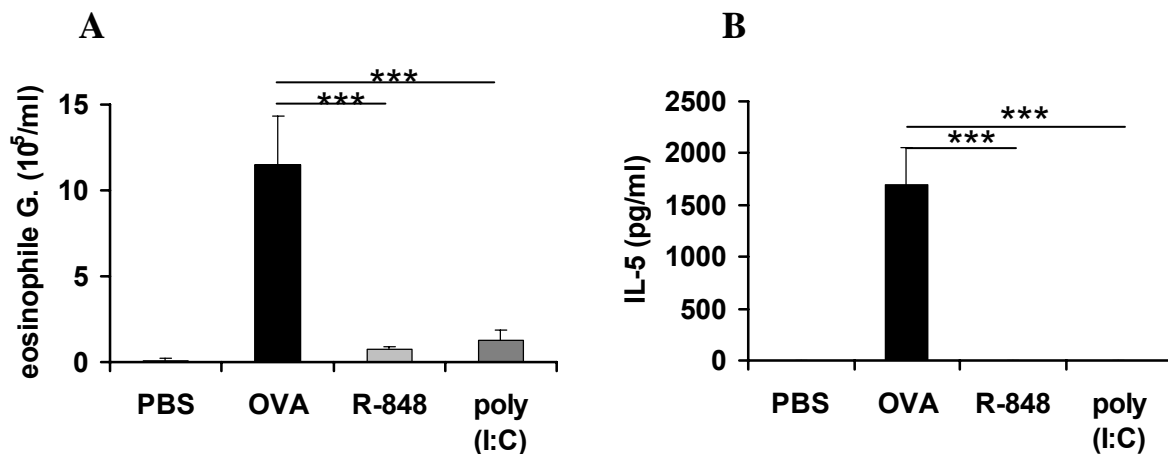
(I:C)-Gruppe ( $312 \pm 75$  ng/ml) erhöhter Serومتiter an OVA<sub>spec</sub> IgG<sub>2a</sub> ( $1528 \pm 193$  ng/ml) (Abb. 3.2.1).



**Abb. 3.2.1 Beeinflussung der OVA-spezifischen Immunglobulintiter im Serum durch Applikation viraler TLR-Liganden während der Sensibilisierungsreaktion**

BALB/c Mäuse (je Gruppe n=8) wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abb. 2.2.1). An den Tagen 40, 42, 44, 46 und 47 des Sensibilisierungsprotokolls wurde poly (I:C) bzw. R-848 systemisch appliziert. Die Abnahme der Blutproben zur Serumgewinnung fand 24 Stunden nach der letzten OVA-Exposition statt. Die Serومتiter der OVA<sub>spec</sub> IgE, IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>2a</sub> wurden mittels ELISA-Technik bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (\*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001).

Die zweite OVA-Aerosol-Exposition rief in Tieren der OVA-Gruppe eine für die allergische Atemwegsentzündung typische massive Infiltration eosinophiler Granulozyten in das broncho-alveoläre Lumen hervor ( $11,5 \pm 2,8 \times 10^5$  Zellen/BAL). Daneben ließen sich noch zahlreiche Lymphozyten in der BAL identifizieren ( $0,73 \pm 0,46 \times 10^5$  Zellen/ml).



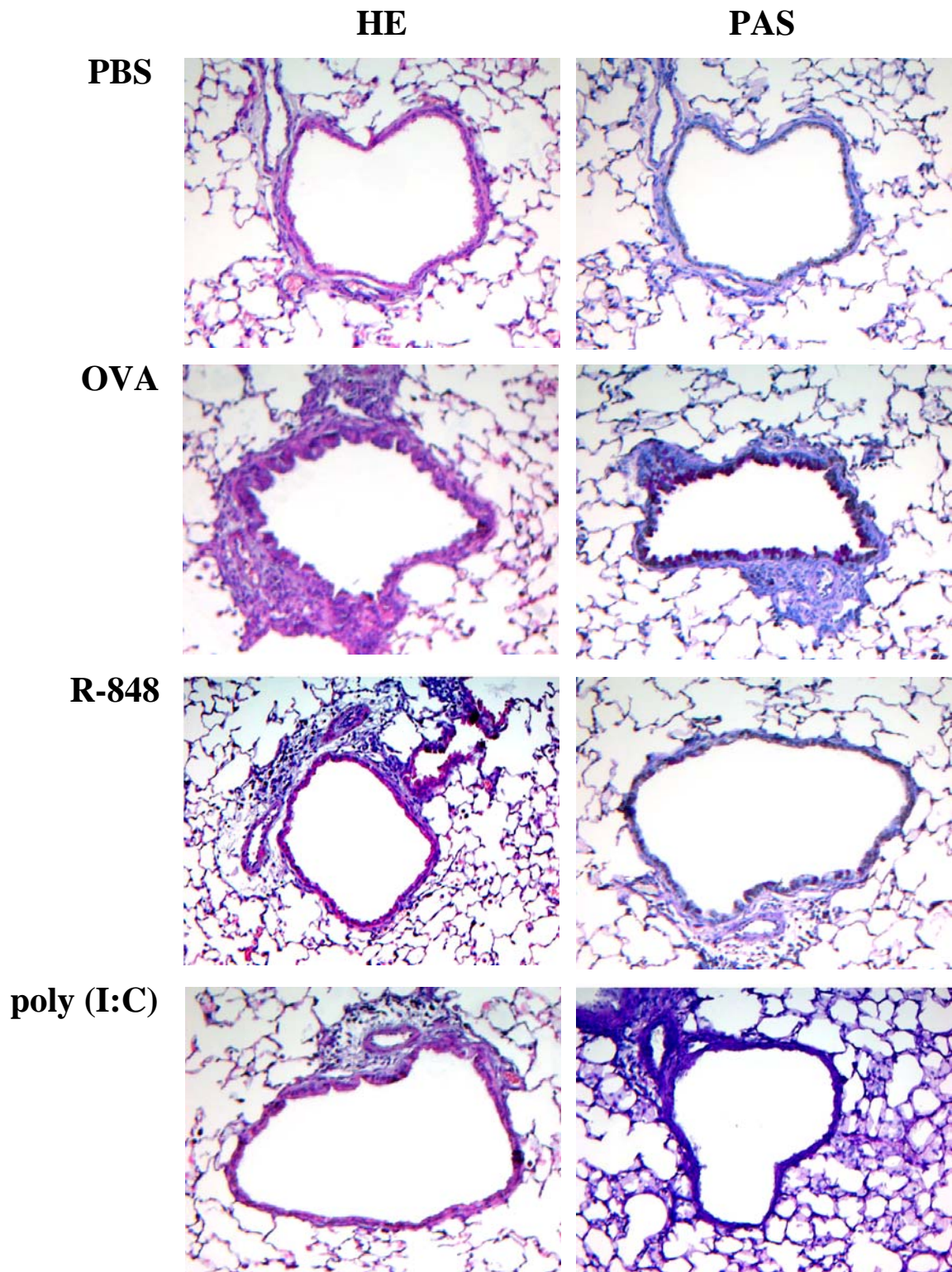
**Abb. 3.2.2 Beeinflussung der allergischen Entzündung durch virale TLR-Liganden: A) Anzahl eosinophiler Granulozyten in broncho-alveolärer Lavage-Flüssigkeit (BALF); B) Interleukin-5-Konzentration in BALF**

BALB/c Mäuse (je Gruppe n=8) wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abb. 2.2.1). An den Tagen 40, 42, 44, 46 und 47 des Sensibilisierungsprotokolls wurde poly (I:C) bzw. R-848 systemisch appliziert. Die Broncho-alveoläre Lavage fand 24 Stunden nach der letzten OVA-Exposition statt. Die Quantifizierung der eosinophilen Granulozyten wurde lichtmikroskopisch anhand zytologischer Kriterien durchgeführt. Die Konzentration von IL-5 wurde mittels CBA-Technik bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

Während diese beiden Leukozytensubpopulationen in Tieren der PBS-Gruppe nur vereinzelt zu identifizieren waren, zeigten sich in OVA- und PBS-Gruppe eine in etwa vergleichbare Anzahl an Makrophagen in der BAL (OVA:  $0,48 \pm 0,26 \times 10^5$  Zellen/ml; PBS:  $0,66 \pm 0,13 \times 10^5$  Zellen/ml). Im Vergleich zur OVA-Gruppe fiel sowohl in der Poly (I:C)- wie auch in der R-848-Gruppe eine signifikant verringerte Anzahl eosinophiler Granulozyten (poly (I:C):  $1,3 \pm 0,6 \times 10^5$  Zellen/ml; R-848:  $0,78 \pm 0,15 \times 10^5$  Zellen/ml) und in etwas geringerem Maße der Lymphozyten (poly (I:C):  $0,39 \pm 0,14 \times 10^5$  Zellen/ml; R-848:  $0,25 \pm 0,03 \times 10^5$  Zellen/ml) in der BAL auf. Die Anzahl an Makrophagen war verglichen mit der PBS-Gruppe in keiner der beiden Gruppen signifikant erhöht (poly (I:C):  $0,57 \pm 0,12 \times 10^5$  Zellen/ml; R-848:  $0,68 \pm 0,18 \times 10^5$  Zellen/ml). Neutrophile Granulozyten wurde in allen Gruppen nur vereinzelt in der BAL gefunden (Abb. 3.2.2 A).

Um das beobachtete leukozytäre Infiltrat weiter zu charakterisieren wurde die Konzentration der Zytokine IFN- $\gamma$  als TH<sub>1</sub>-Leitzytokin und IL-5 als TH<sub>2</sub>-Leitzytokin in der BALF gemessen. Während sich IFN- $\gamma$  in keiner der Proben nachweisen ließ, konnten in der OVA-Gruppe hohe IL-5-Konzentrationen identifiziert werden ( $1002 \pm 70$  pg/ml). Im Vergleich dazu zeigten sowohl die Poly (I:C) wie auch die R-848-Gruppe deutlich niedrigere IL-5-Spiegel in der BAL (poly (I:C):  $261 \pm 46$  pg/ml; R-848:  $305 \pm 49$  pg/ml), während IL-5 in der BALF der PBS-Gruppe nicht nachzuweisen war (Abb. 3.2.2 B).

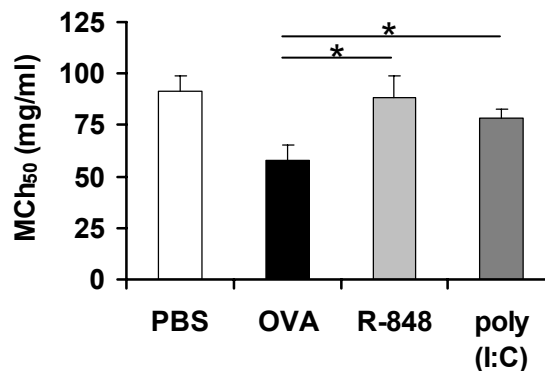
Ähnliche Effekte der systemischen Applikation von Poly (I:C) bzw. R-848 ließen sich auch in der Lungehistologie beobachten. Während in der HE-Färbung bei Präparaten der OVA-Gruppe deutliche perivaskuläre und peribronchiale Infiltrate, vornehmlich bestehend aus eosinophilen Granulozyten und zum geringeren Anteil aus Lymphozyten bestehend, zu sehen sind, ist das Ausmaß der allergischen Atemwegsentzündung in der Poly (I:C)- und mehr noch in der R-848-Gruppe deutlich reduziert. Auch die in der OVA-Gruppe in den proximalen und intermediären allerdings nicht in den distalen Atemwegen auftretende Becherzellhyperplasie, lässt sich in PAS-gefärbten Präparaten der Poly (I:C)- und der R-848-Gruppe nicht nachweisen. Becherzellen treten hier nur vereinzelt in proximalen Abschnitten der Atemwege nicht aber weiter distal auf. Damit zeigen beide Gruppen ein ähnliches Bild wie die PBS-Gruppe (Abb. 3.2.4)



**Abb. 3.2.3 Beeinflussung der allergischen Entzündung durch virale TLR-Liganden: Allergische Atemwegspathologie**

BALB/c Mäuse (je Gruppe n=8) wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abb. 2.2.1). An den Tagen 40, 42, 44, 46 und 47 des Sensibilisierungsprotokolls wurde poly (I:C) bzw. R-848 systemisch appliziert. Die Lungen wurden durch Instillation von Formalinlösung entfaltet und *in-situ* fixiert. 3 µm dicke Paraffinschnitte wurden HE- bzw. PAS-gefärbt.

Um weiterhin zu untersuchen, ob die verringerte Atemwegsentzündung, die in der poly (I:C)- wie auch in der R-848-Gruppe beobachtet wurde, mit einer Verringerung der AHR einher geht, wurde die AR gegenüber MCh in der Head-out Body-Plethysmographie bestimmt. Als Referenzwert diente die AR der PBS-Gruppe von  $91,2 \pm 7,9$  mg/ml. Im Vergleich dazu zeigte die OVA-Gruppe ein deutlich gesteigerte AR gegenüber MCH ( $57,7 \pm 7,7$  mg/ml). Sowohl in der poly (I:C)- als auch in der R-848-Gruppe konnte im Gegensatz dazu eine deutlich verringerte AR gemessen werden (poly (I:C):  $78,3 \pm 4,2$  mg/ml; R-848:  $88,5 \pm 10,4$  mg/ml) (Abb. 3.2.4).



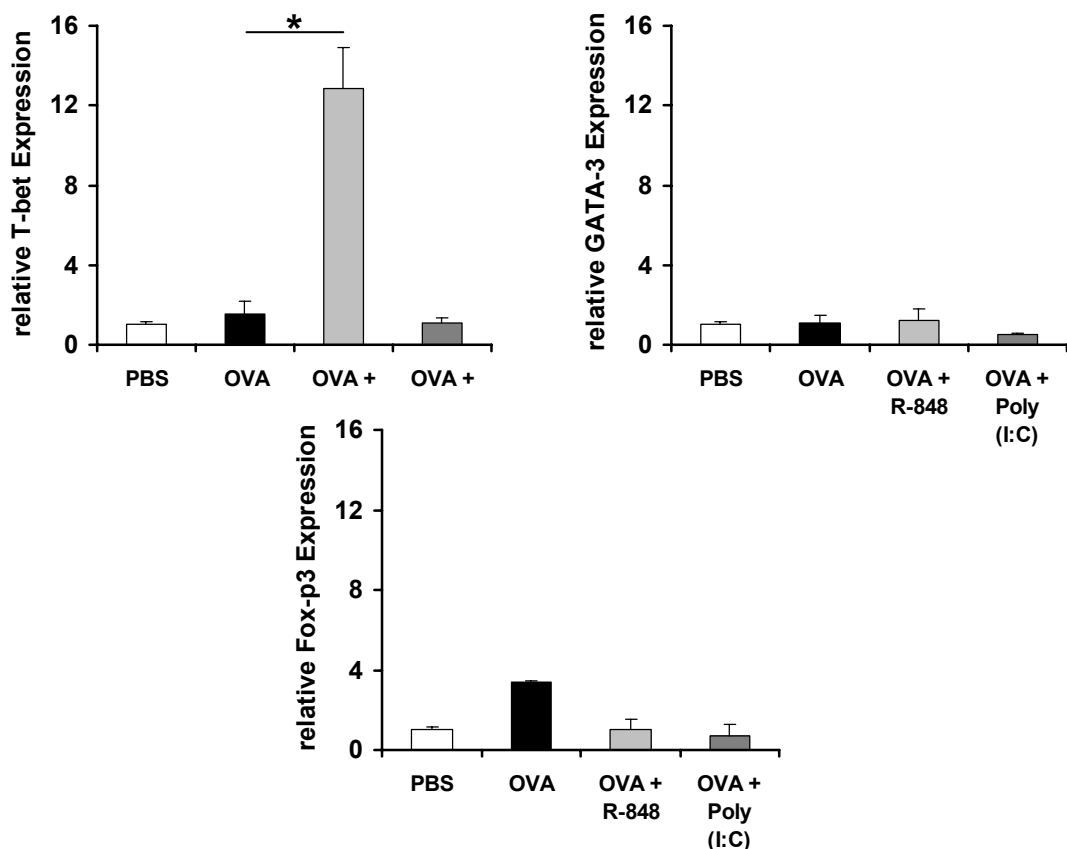
**Abb. 3.2.4 Einfluss viraler TLR-Liganden auf die Atemwegsreabilität**

BALB/c Mäuse (je Gruppe n=8) wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abb. 2.2.1). An den Tagen 40, 42, 44, 46 und 47 des Sensibilisierungsprotokolls wurde poly (I:C) bzw. R-848 systemisch appliziert. Die Atemwegsreabilität wurde 24 Stunden nach der letzten OVA-Exposition mittels Head-out Body-Plethysmographie bestimmt und wird als die Konzentration an  $\beta$ -Methyl-Acetylcholin (MCh<sub>50</sub>) ausgedrückt, die eine 50%ige Reduktion des Ausgangswerts des halbmaximalen expiratorischen Atemflusses bewirkt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (\* p < 0,05).

Somit lässt sich sowohl für die systemische Applikation von poly (I:C) als auch von R-848 vor der zweiten Allergenprovokation eine Verringerung der allergischen Atemwegsentzündung als sekundäre Immunantwort auf den erneuten Allergenkontakt feststellen. Die Reduktion der allergischen Atemwegsentzündung geht dabei einher mit einer deutlich schwächer ausgeprägten Becherzellhyperplasie und einer Verbesserung der Atemwegsreagibilität.

### 3.3 Die TLR-3- bzw. TLR-7-Aktivierung haben unterschiedliche immunmodulierende Effekte auf die TH<sub>2</sub>-gesteuerte Immunreaktion

TLR-3- wie auch TLR-7-Aktivierung hatten sowohl ähnliche präventive Effekte auf die allergische Sensibilisierung, wie auch ähnliche reduzierende Effekte auf die sekundäre allergische Immunantwort in der Lunge, allerdings zeigten sich Unterschiedliche Einflüsse auf die humorale Immunantwort auf das Modellallergen OVA.



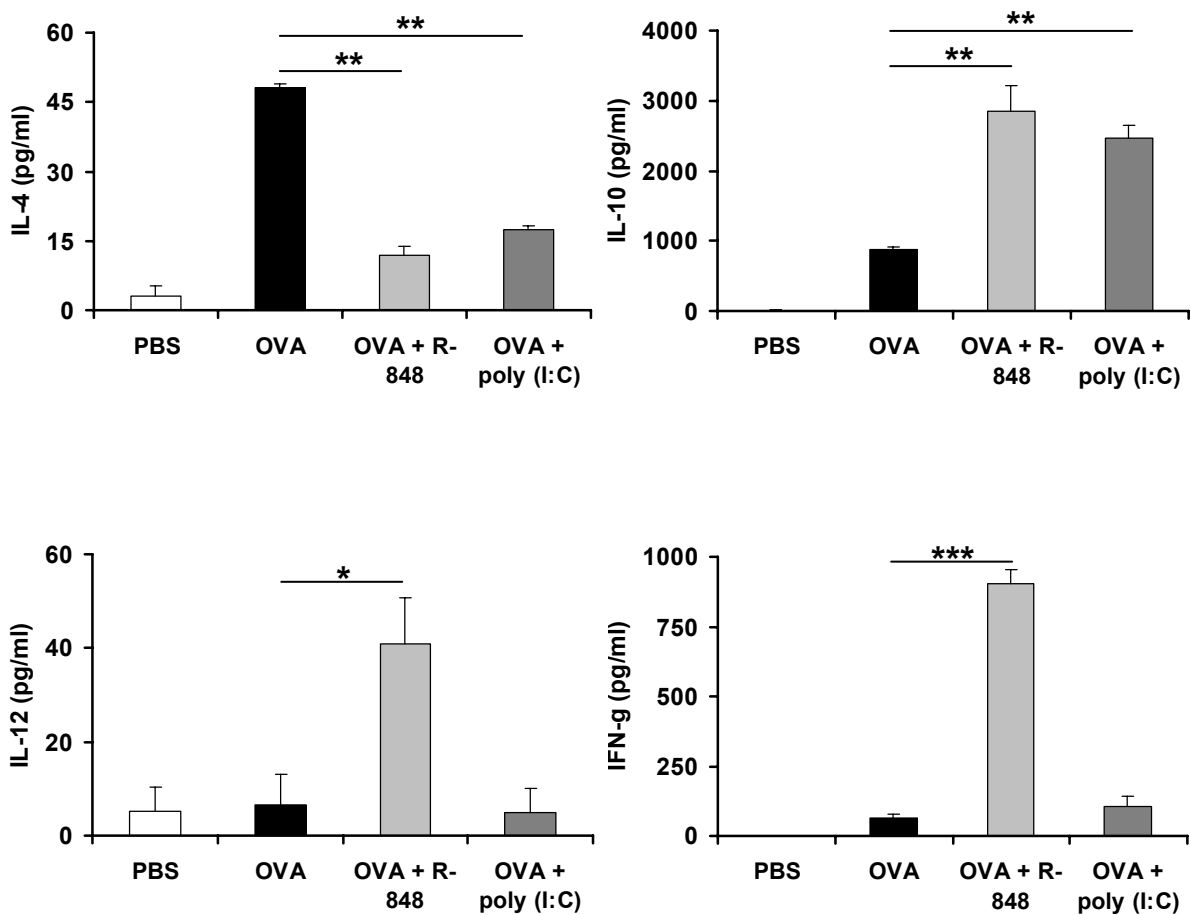
**Abb.3.3.1 Quantitative Expressionsanalyse der Transkriptionsfaktoren T-bet, GATA-3 und Fox P3 in Reaktion auf virale TLR-Liganden**

Mononukleäre Zellen von OVA-sensibilisierten BALB/c Mäusen wurden *in-vitro* mit OVA oder mit OVA und poly (I:C) bzw. R-848 restimuliert. 72 Stunden nach Restimulation wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und die relative Expression der Transkriptionsfaktoren T-bet, GATA-3 oder Fox P3 mittels real-time PCR quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (\*  $p < 0,05$ ).

So war nach TLR-3- wie auch nach TLR-7-Aktivierung während der Sensibilisierungsphase keine signifikant gesteigerte Produktion OVA<sub>spec</sub> IgE oder IgG<sub>1</sub> zu verzeichnen. Weiterhin war die Produktion OVA<sub>spec</sub> IgE oder IgG<sub>1</sub>



signifikant verringert, wenn Poly (I:C) oder R-848 während der zweiten Allergenexposition appliziert wurden. Im Gegensatz zur TLR-3-Aktivierung durch Poly (I:C) induzierte die Applikation von R-848 in beiden Versuchsansätzen eine gesteigerte Produktion OVA<sub>spec</sub> IgG<sub>2a</sub>, die typisch für eine TH<sub>1</sub>-gesteuerte humorale Immunantwort ist.



**Abb.3.3.2 Zytokinkonzentrationen in Zellkulturüberständen in Reaktion auf virale TLR-Liganden**

Mononukleäre Zellen von OVA-sensibilisierten BALB/c Mäusen wurden *in-vitro* mit OVA oder mit OVA und poly (I:C) bzw. R-848 restimuliert. 72 Stunden nach Restimulation wurden die Zellkulturüberstände abgenommen. Die Konzentration der Zytokine IL-4, IL-10, IL-12 und IFN- $\gamma$  wurden mittels ELISA-Technik bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

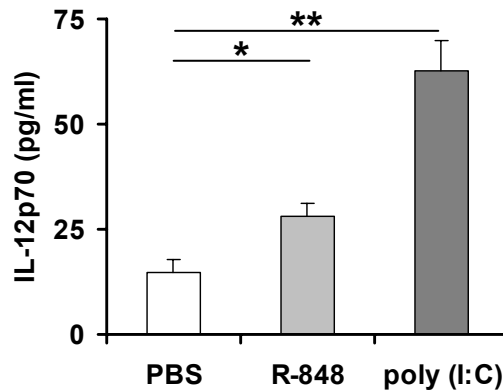
Um diesen Unterschied näher zu charakterisieren, wurden mononukleäre Zellen von OVA-sensibilisierten Tieren *in-vitro* in Anwesenheit von R-848 oder poly (I:C)

mit OVA restimuliert. Die Analyse der für TH-Zellen charakteristischen Transkriptionsfaktoren T-bet, GATA-3 und Fox P3 zeigte, dass nur in Anwesenheit von R-848 die Expression des TH<sub>1</sub>-typischen Transkriptionsfaktors T-bet signifikant erhöht war, während die Restimulation mit OVA und poly (I:C) keine signifikanten Effekte auf die Expression der oben genannten Transkriptionsfaktoren bewirkte (Abb. 3.3.1)

Die anschließende Analyse der Zytokinkonzentration im Zellkulturüberstand derselben MNC-Kulturen unterstrichen diese Beobachtungen. Während die Anwesenheit von poly (I:C) oder R-848 die Produktion des TH<sub>2</sub>-Leitzytokins IL-4 signifikant verringerte, war in beiden Fällen eine massiv erhöhte Konzentration des anti-inflammatorisch wirkenden Zytokins IL-10 zu verzeichnen. Nur in Anwesenheit von R-848 ließen sich IL-12 und eine massiv erhöhte Konzentration des TH<sub>1</sub>-Zytokins IFN- $\gamma$  nachweisen (Abb. 3.3.2).

### **3.4 Interleukin 12 (IL-12) ist an der Mediation der immun-modulierenden Effekte viraler TLR-Liganden auf das experimentelle Asthma beteiligt**

Um weitere Informationen über den der immun-modulierenden Wirkung der TLR-3- bzw. TLR-7-Aktivierung zugrunde liegenden molekularen Mechanismus zu erhalten, wurde Tieren zunächst poly (I:C) bzw. R-848 i.p. injiziert. Zwölf Stunden nach der Applikation wurde eine Peritoneallavage durchgeführt. Da die TLR-7, -8 und -9 aufgrund struktureller Übereinstimmungen zu einer TLR-Subfamilie zusammengefasst werden und die Aktivierung von TLR-8 oder TLR-9 die Produktion von IL-12 in Makrophagen und DC`s induziert, wurde zunächst die IL-12-Konzentration in der Peritoneallavage bestimmt. Sowohl nach poly (I:C) wie auch nach R-848-Applikation lassen sich signifikant erhöhte Mengen an IL-12p70 nachweisen (Abb. 3.4.1).

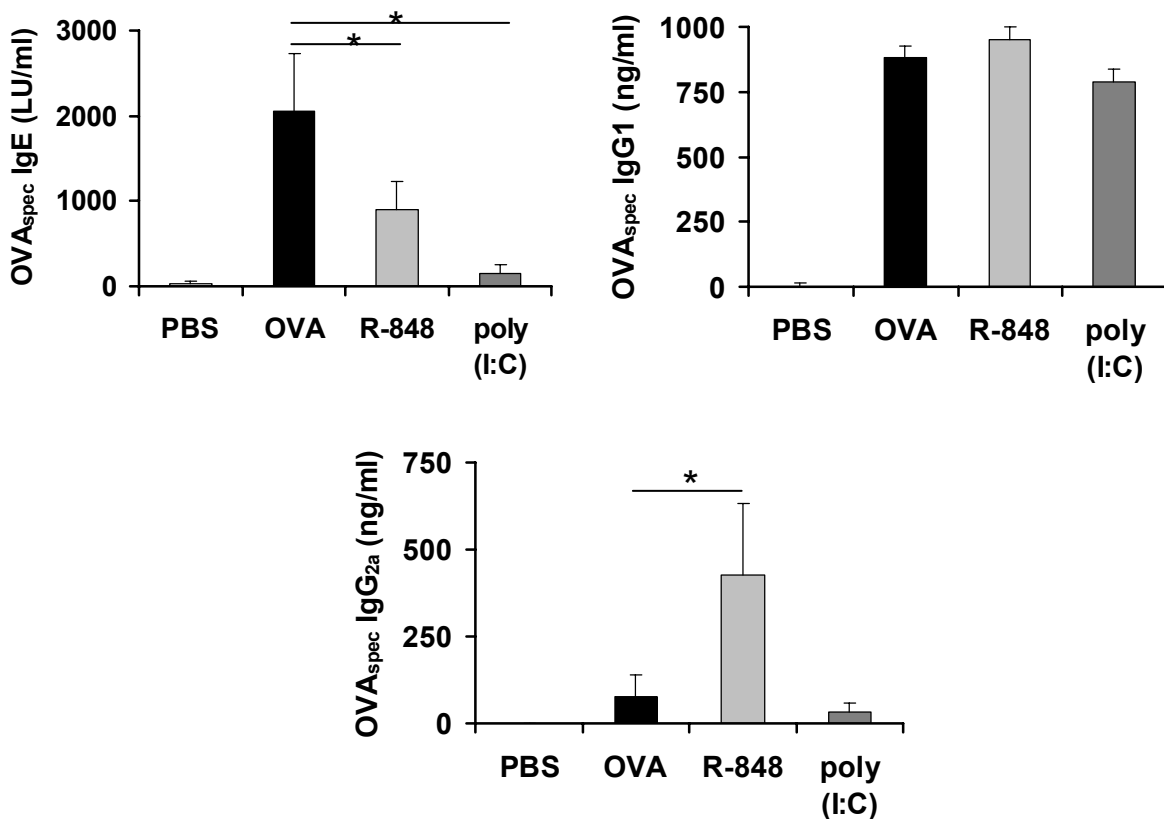


**Abb. 3.4.1 Beeinflussung der Interleukin-12-Konzentration in Peritoneallavage-Flüssigkeit durch virale TLR-Liganden**

BALB/c Mäusen (je Gruppe n=2) wurde poly (I:C) bzw. R-848 i.p. appliziert. Die Peritoneallavage fand 12 Stunden nach der Applikation statt. Die Konzentration von IL-12p70 wurde mittels ELISA-Technik bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (\*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

Daneben wurden z.T. sehr hohe Konzentrationen von IL-10 (poly (I:C):  $1860 \pm 486$  pg/ml; R-848:  $75 \pm 24$  pg/ml; PBS:  $8 \pm 1$  pg/ml) bzw. IFN- $\gamma$  (poly (I:C):  $5399 \pm 565$  pg/ml; R-848:  $3147 \pm 588$  pg/ml; PBS:  $350 \pm 338$  pg/ml) festgestellt.

Um weiterhin die Beteiligung von IL-12 an der Modulation der sekundären allergischen Immunantwort zu charakterisieren, wurde das zuvor in der Wildtyp-Maus durchgeführte Protokoll (siehe Abb. 2.2.2) in IL-12p35 defizienten BALB/c-Mäusen angewendet. Diese Tiere wurden ausgewählt, da sie eines der beiden Bestandteile des IL-12-Heterodimers, nämlich IL-12p35, nicht funktionell produzieren können. IL-12p35 ist dabei essentiell für die Bildung von IL-12, während der zweite Bestandteil IL-12p40 nicht nur an der Bildung von IL-12, sondern auch zusammen mit EBI-3 zu Interleukin-23 dimerisieren kann.

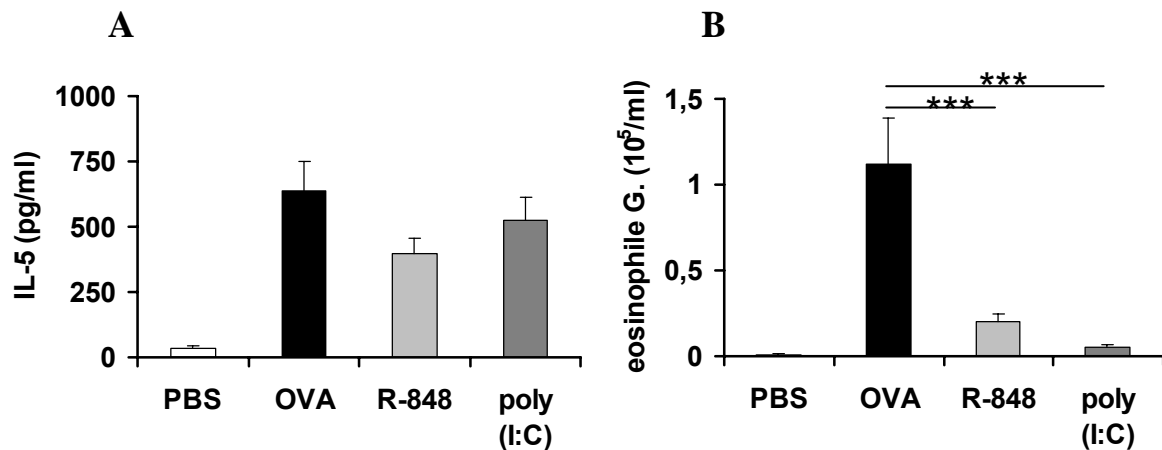


**Abb. 3.4.2 Beeinflussung der OVA-spezifischen Immunglobulintiter im Serum durch Applikation viraler TLR-Liganden in IL-12<sup>-/-</sup> BALB/c Mäusen**

IL-12p35 defiziente BALB/c Mäuse (je Gruppe n=4) wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abb. 2.2.1). An den Tagen 40, 42, 44, 46 und 47 des Sensibilisierungsprotokolls wurde poly (I:C) bzw. R-848 systemisch appliziert. Die Abnahme der Blutproben zur Serumgewinnung fand 24 Stunden nach der letzten OVA-Exposition statt. Die Serumtiter der OVA<sub>spec</sub> IgE, IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>2a</sub> wurden mittels ELISA-Technik bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. (\*\* p < 0,01).

Bei der Betrachtung der humoralen Immunantwort zeigte sich zunächst, dass es auch möglich war, in IL-12p35 defizienten Tieren eine TH<sub>2</sub>-typische Sensibilisierungsreaktion gegen das Modellallergen OVA zu induzieren. In der OVA-Gruppe ließen sich OVA<sub>spec</sub> IgE in mit dem Wildtyp vergleichbaren Titern beobachten (2053 ± 679 LU/ml), während die Titer des OVA<sub>spec</sub> IgG<sub>1</sub> sogar noch etwas höher als im Wildtyp waren (883,4 ± 211,9 ng/ml). Wie auch im Wildtyp zu beobachten, resultiert die systemische Applikation von poly (I:C) wie auch von R-848 in einer signifikant reduzierten Produktion von OVA<sub>spec</sub> IgE (poly (I:C): 146 ± 115 LU/ml; R-848: 893 ± 333 LU/ml). Weiterhin zeigte sich nach der TLR-7-Aktivierung durch R-848 eine signifikant gesteigerte Produktion von OVA<sub>spec</sub>

IgG<sub>2a</sub>. Also auch in der IL-12p35 defizienten Maus ließ sich eine unterschiedliche Immun-Modulation durch poly (I:C) auf der einen Seite und R-848 auf der anderen Seite beobachten. Allerdings fällt im Vergleich zum Wildtyp auf, dass weder die poly (I:C)- noch die R-848-Gruppe verminderte Serumtitel an OVA<sub>spec</sub> IgG<sub>1</sub> aufwiesen (poly (I:C): 789 ± 123 ng/ml; R-848: 951 ± 159 ng/ml).



**Abb. 3.4.3 Beeinflussung der allergischen Entzündung durch virale TLR-Liganden in IL-12<sup>-/-</sup> BALB/c Tieren A) Anzahl eosinophiler Granulozyten in der BALF; B) Interleukin-5-Konzentration in der BALF**

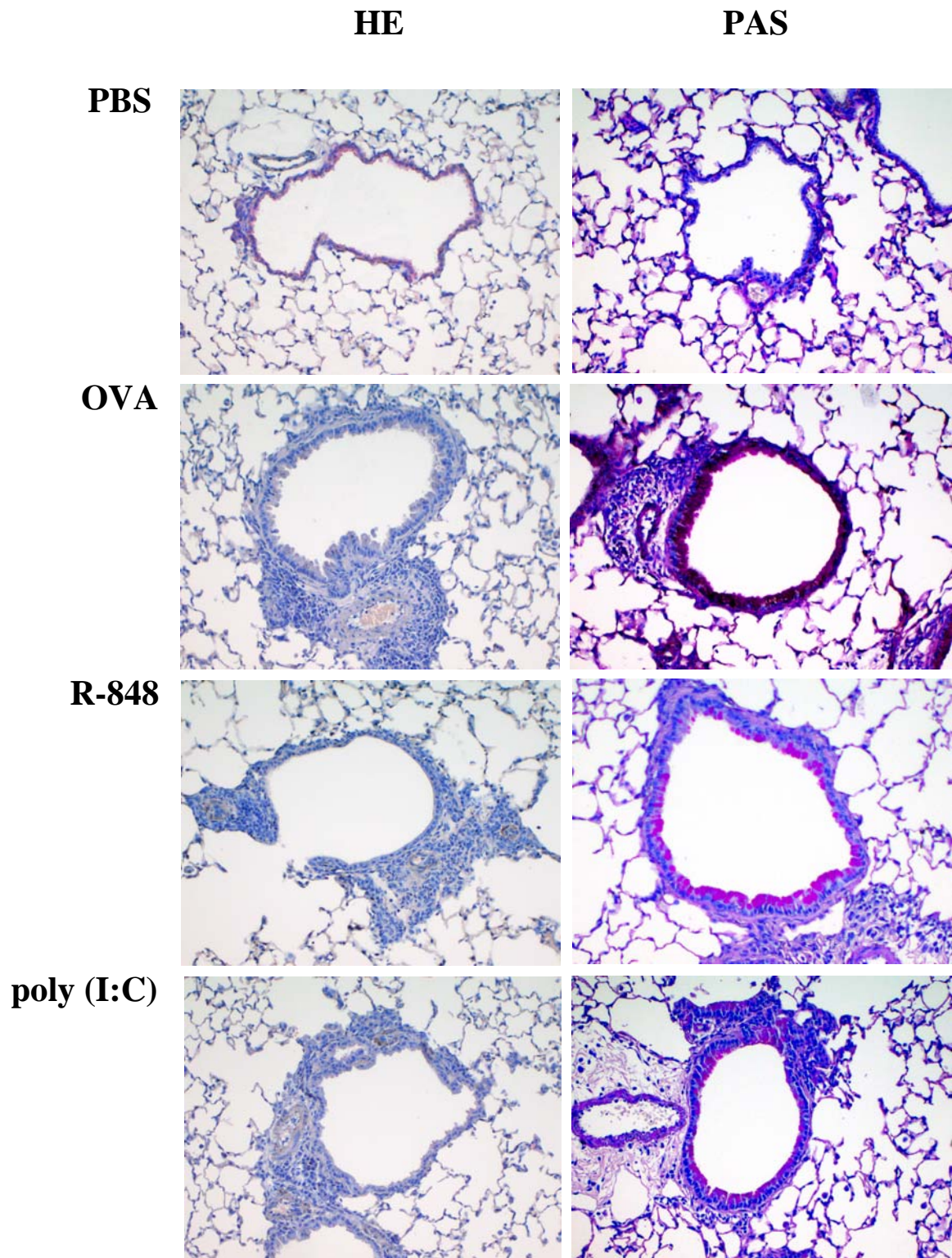
IL-12p35 defiziente BALB/c Mäuse (je Gruppe n=8) wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abb. 2.2.1). An den Tagen 40, 42, 44, 46 und 47 des Sensibilisierungsprotokolls wurde poly (I:C) bzw. R-848 systemisch appliziert. Die Broncho-alveoläre Lavage fand 24 Stunden nach der letzten OVA-Exposition statt. Die Quantifizierung der eosinophilen Granulozyten wurde lichtmikroskopisch anhand zytologischer Kriterien durchgeführt. Die Konzentration von IL-5 wurde mittels CBA-Technik bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. (\*\*\*) p < 0,001).

Neben der humoralen Immunantwort war es auch möglich, eine allergische Atemwegsentzündung, charakterisiert durch die Infiltration eosinophiler Granulozyten und Lymphozyten in das broncho-alveoläre Lumen zu induzieren. Allerdings ist die Anzahl an eosinophilen Granulozyten in der BAL im Vergleich zum Wildtyp deutlich geringer (OVA: 1,12 ± 0,27 Zellen/BAL). In der PBS-Gruppe zeigt sich im Vergleich zum Wildtyp kein Unterschied, auch hier lassen sich in der BAL fast ausschließlich Makrophagen identifizieren. Weiterhin hat sowohl die Applikation von poly (I:C) wie auch von R-848 ähnlich wie im Wildtyp eine signifikante Reduktion der eosinophilen Granulozyten in der BAL zur Folge (poly (I:C): 0,05 ± 0,02 Zellen/BAL; R-848: 0,2 ± 0,05 Zellen/ml) (Abb. 3.4.2 A). Diese

Reduktion ist gerade deshalb interessant, weil die Konzentration des TH<sub>2</sub>-Leitzytokins und wichtigsten Überlebensfaktors für eosinophile Granulozyten in der BAL in keiner der beiden Gruppen im Vergleich zur OVA-Gruppe (OVA: 636 ± 116 pg/ml) reduziert ist (poly (I:C): 527 ± 86 pg/ml; R-848: 397 ± 56 pg/ml) (Abb. 3.4.2 B).

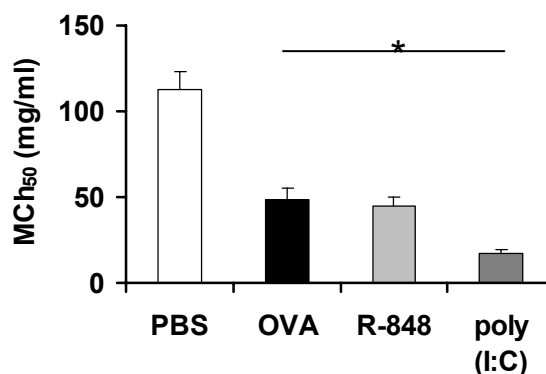
In der Lungenhistologie lässt sich in der OVA-Gruppe ein deutliches leukozytäres Infiltrat um die Atemwege und die Gefäße der Lunge erkennen, das ähnlich wie in der BAL hauptsächlich aus eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten besteht. Allerdings ist in der Histologie sowohl in der poly (I:C) wie auch in der R-848 ein deutliches peribronchiales bzw. perivaskuläres Infiltrat zu erkennen, das sich weder im Ausmaß noch in seiner Zusammensetzung von der Entzündung der OVA-Gruppe unterscheidet. Es lässt sich also keine Verminderung der Entzündung im Atemwegsgewebe erkennen, wie es in der BAL zu beobachten war. Die Entzündung der Atemwege ist, wie in der PAS-Färbung (Abb. 3.4.3) zu sehen ist, jeweils mit einer für das allergische Asthma typische Becherzellhyperplasie assoziiert.

Neben einer allergischen Atemwegsentzündung und einer Becherzellhyperplasie ließ sich, wie sich in der Analyse der Lungenfunktion zeigte, auch einer Atemwegsüberempfindlichkeit induzieren. Während die PBS-Gruppe, die als Vergleichswert für die übrigen Gruppen diente, bei durchschnittlich 112,6 ± 10,7 mg/ml MCh mit einer 50%igen Reduktion des EF<sub>50</sub> reagierte, zeigten die Tiere der OVA-Gruppe die gleiche Reaktion schon bei 48,5 ± 6,9 mg/ml MCh. Im Vergleich zum Wildtyp zeigte die R-848-Gruppe keine Verminderung der AHR, sondern reagierte ähnlich wie die OVA-Gruppe (R-848: 44,9 ± 5,2 mg/ml). Bei der poly (I:C)-Gruppe ließ sich sogar noch eine deutliche Steigerung der Atemwegsreagibilität gegenüber der OVA-Gruppe verzeichnen (poly (I:C): 16,9 ± 2,6 mg/ml) (Abb. 3.4.4).



**Abb. 3.4.3** Beeinflussung der allergischen Entzündung durch virale TLR-Liganden in IL-12 - /- BALB/c Tieren: Allergische Atemwegspathologie

IL-12p35 defiziente BALB/c Mäuse (je Gruppe n=8) wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abb. 2.2.1). An den Tagen 40, 42, 44, 46 und 47 des Sensibilisierungsprotokolls wurde poly (I:C) bzw. R-848 systemisch appliziert. Die Lungen wurden durch Instillation von Formalinlösung entfaltet und *in-situ* fixiert. 3 µm dicke Paraffinschnitte wurden HE- bzw. PAS-gefärbt.



**Abb. 3.4.5 Einfluss viraler TLR-Liganden auf die Atemwegsreabilität in IL-12 <sup>-/-</sup> BALB/c Tieren**

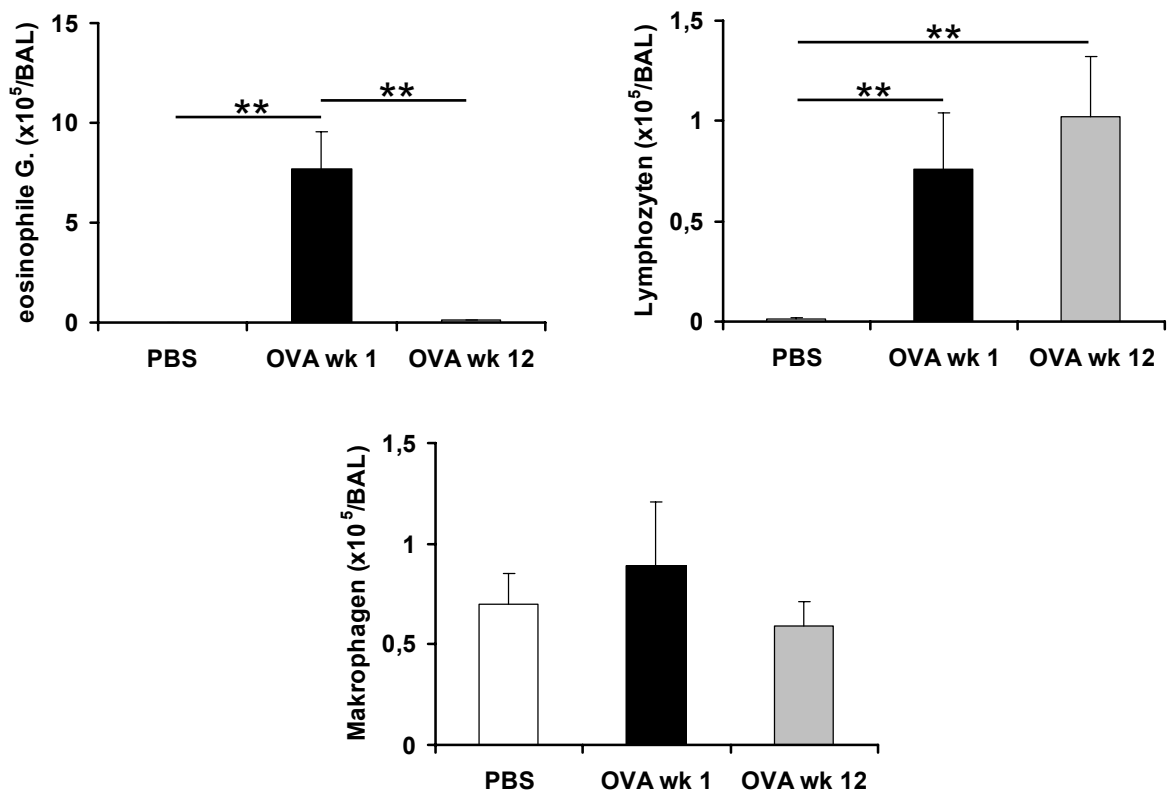
IL-12p35 defiziente BALB/c Mäuse (je Gruppe n=8) wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abb. 2.2.1). An den Tagen 40, 42, 44, 46 und 47 des Sensibilisierungsprotokolls wurde poly (I:C) bzw. R-848 systemisch appliziert. Die Atemwegsreabilität wurde 24 Stunden nach der letzten OVA-Exposition mittels Head-out Body-Plethysmographie bestimmt und wird als die Konzentration an  $\beta$ -Methyl-Acetylcholin (MCh<sub>50</sub>) ausgedrückt, die eine 50%ige Reduktion des Ausgangswerts des halbmaximalen expiratorischen Atemflusses bewirkt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (\* p < 0,05).

Zusammenfassend zeigt sich also, dass Makrophagen des Peritonealraums bei Kontakt mit poly (I:C) bzw. R-848 mit der Produktion von IL-12 reagieren. In IL-12p35 defizienten Tieren war die systemische Applikation von poly (I:C) bzw. von R-848 nicht mit einer Verminderung des Serumtiters an OVA<sub>spec</sub> IgG<sub>1</sub>, der Konzentration von IL-5 in der BAL oder der peribronchialen allergischen Entzündung assoziiert. Die in der OVA-Gruppe beobachtete AHR wurde nicht, wie im Wildtyp zu erkennen, durch die Applikation von poly (I:C) bzw. R-848 vermindert, sondern z.T. sogar noch verstärkt.



### 3.5 Eine chronische Allergenexposition induziert eine chronische Atemwegsentzündung in der sensibilisierten BALB/c-Maus

Murine Modelle für eine akute allergische Atemwegsentzündung reflektieren zwar die akute Entzündungssituation während einer Exazerbation des allergischen Asthmas, jedoch ist es in diesen Modellen nicht möglich das *Airway remodelling*, eines der wesentlichen Charakteristika des humanen Asthma bronchiale, adäquat widerzuspiegeln. Um diese Limitation des murinen Asthma-Modells zu überwinden wurden einige neue Modelle etabliert, in denen durch eine fortwährende Allergenexposition ein ständiger Entzündungsreiz induziert wurde, der zu strukturellen Veränderungen der Atemwegswand führt.



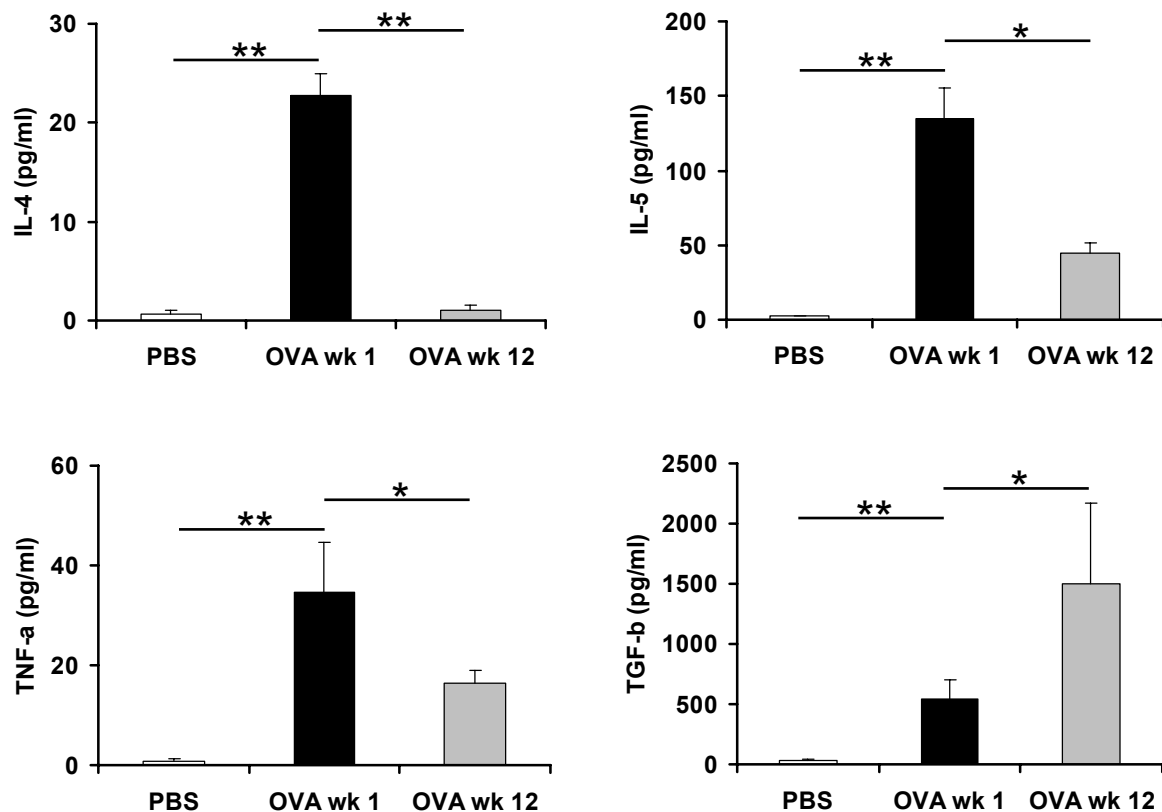
**Abb. 3.5.1 Leukozytensubpopulationen in broncho-alveolärer Lavage-Flüssigkeit (BALF) nach chronischer Allergenprovokation**

BALB/c Mäuse (je Gruppe n=8) wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abb. 2.2.3). Die Broncho-alveoläre Lavage fand 24 Stunden nach der letzten OVA-Exposition statt. Die Quantifizierung der eosinophilen Granulozyten wurde lichtmikroskopisch anhand zytologischer Kriterien durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (\*\*\*) p < 0,001).

Allerdings zeigten alle diese Modelle eine Adaption des Organismus an die ständige Konfrontation mit dem Allergen, so dass sich mit andauernder Allergenexposition eine Suppression der allergischen Atemwegsentzündung einstellte.

Innerhalb dieser Arbeit wurde ein Protokoll etabliert, das durch eine fortwährende Allergenprovokation eine chronische Atemwegsentzündung induziert, die sich von der akuten Entzündungssituation deutlich unterscheidet. Während das leukozytäre Infiltrat im murinen Modell für eine akute allergische Atemwegsentzündung (OVA wk 1) durch eine große Anzahl von eosinophilen Granulozyten ( $7,72 \pm 2,87 \times 10^5$  Zellen/BAL) und in geringerem Umfang von Lymphozyten ( $0,76 \pm 0,28 \times 10^5$  Zellen/BAL) bei unveränderter Anzahl von Makrophagen ( $0,89 \pm 0,32 \times 10^5$  Zellen/BAL) gekennzeichnet ist, lassen sich im chronischen Modell nur relativ wenige eosinophile Granulozyten ( $0,12 \pm 0,02 \times 10^5$  Zellen/BAL) in der BAL identifizieren. Dabei ist ebenfalls die Anzahl an Makrophagen ( $0,59 \pm 0,12 \times 10^5$  Zellen/BAL) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS) ( $0,7 \pm 0,15 \times 10^5$  Zellen/BAL) bzw. zur OVA wk1-Gruppe nicht signifikant verändert, während die Anzahl an Lymphozyten ( $1,02 \pm 0,30 \times 10^5$  Zellen/BAL) gegenüber der OVA wk 1-Gruppe sogar noch erhöht ist (Abb. 3.5.1).

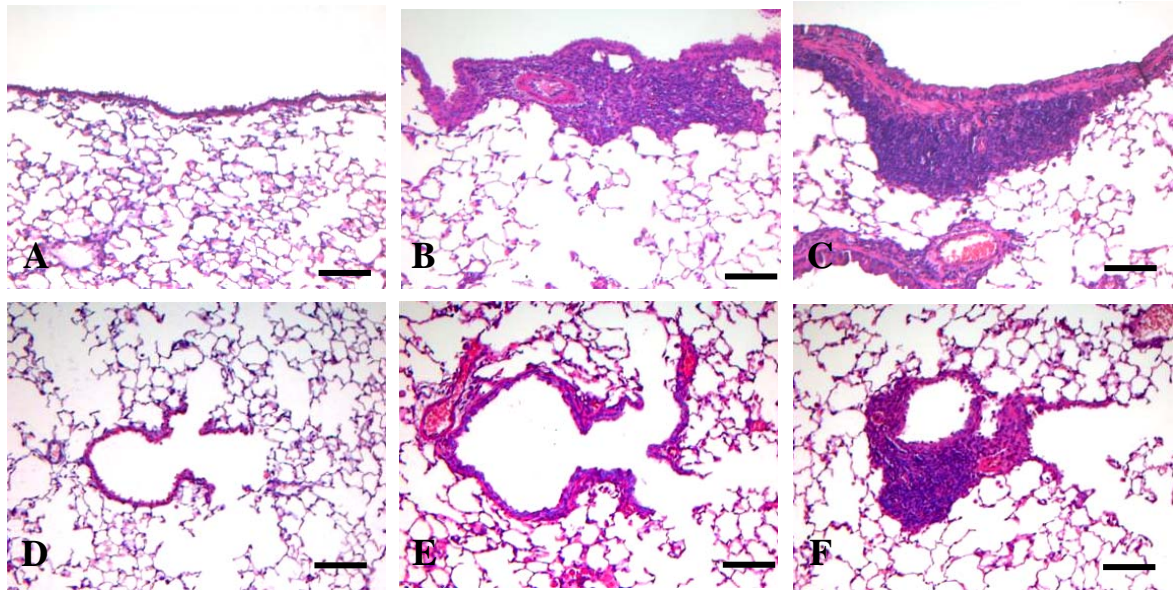
Zur weiteren Charakterisierung der intra-luminalen Entzündung wurden die Konzentrationen verschiedener Zytokine bestimmt. Dabei ließ sich im Vergleich zur akuten allergischen Atemwegsentzündung, die durch das Vorkommen der TH<sub>2</sub>-Zytokine IL-4 ( $22,8 \pm 2,1$  pg/ml) und IL-5 ( $134,4$  pg/ml) sowie von TNF- $\alpha$  ( $34,6 \pm 10,1$  pg/ml) gekennzeichnet ist, deutlich geringere Konzentration an IL-5 ( $44,9 \pm 6,3$  pg/ml) und TNF- $\alpha$  ( $16,3 \pm 2,7$  pg/ml) nach chronischer Allergenprovokation feststellen. IL-4 war nicht mehr in der BAL dieser Tiere nachzuweisen. Im Gegensatz dazu war verglichen mit der akuten Entzündung ein massiver Anstieg der Konzentration des anti-inflammatorischen TGF- $\beta$  in der BAL zu verzeichnen (OVA wk 1:  $547,8 \pm 149,9$  pg/ml; OVA wk 12:  $1502,8 \pm 665,9$  pg/ml). In der PBS-Gruppe war neben einer geringen Konzentration an TGF- $\beta$  ( $31,9 \pm 9,6$  pg/ml), keines der weiteren Zytokine detektierbar (Abb. 3.5.2).



**Abb. 3.5.2 Zytokinkonzentration in BALF nach chronischer Allergenprovokation**

BALB/c Mäuse (je Gruppe n=8) wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abb. 2.2.3). Die Broncho-alveoläre Lavage fand 24 Stunden nach der letzten OVA-Exposition statt. Die jeweilige Zytokinkonzentration wurde mittels CBA-Technik bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01;\*\*\* p < 0,001).

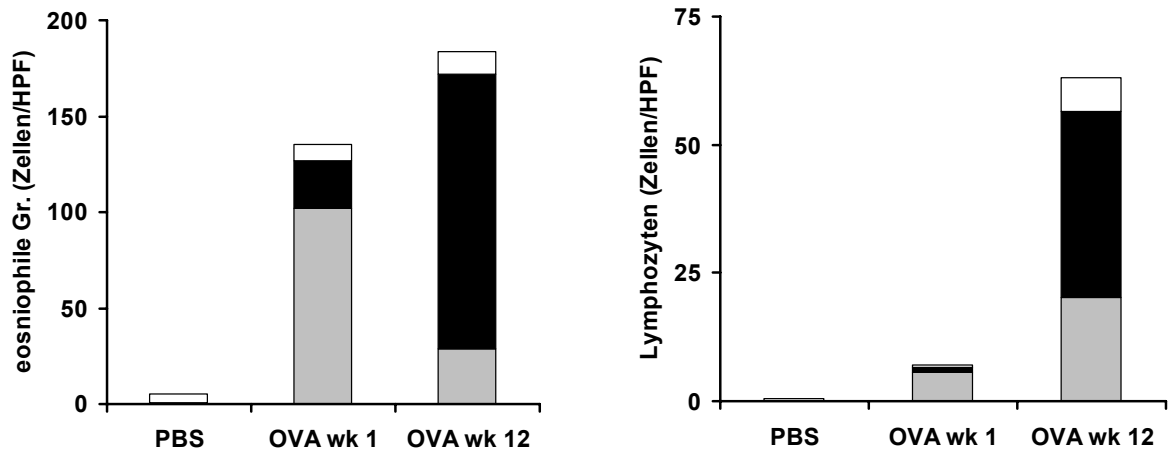
War in der BAL eine deutliche Abnahme der Entzündung zu erkennen, so zeigte sich bei der Analyse des Atemwegsgewebes nicht nur keine Verminderung, sondern sogar eine Progression der Entzündungsreaktion. Dabei ließen sich deutliche Unterschiede zur akuten Entzündung feststellen. Die akute allergische Entzündung ist im Mausmodell vor allem durch ein massives leukozytäres Infiltrat, vornehmlich bestehend aus eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten, gekennzeichnet, das sich vor allem auf die proximalen Atemwege konzentriert, sich in den intermediären Atemwegen verringert und in den distalen Abschnitten der Atemwege nahezu nicht mehr zu entdecken ist (OVA wk 1:  $7 \pm 2$  Leukozyten/HPF).



**Abb. 3.5.3 Allergische Atemwegpathologie nach chronischer Allergenprovokation**

BALB/c Mäuse (je Gruppe n=8) wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abb. 2.2.3). Die Lungen wurden durch Instillation von Formalinlösung entfaltet und *in-situ* fixiert. 3 µm dicke Paraffinschnitte wurden HE-gefärbt. Dargestellt sind repräsentative Längsschnitte durch proximale (A-C) bzw. distale (D-F) Atemwege mit akuter (B, E) oder chronischer Atemwegsentzündung (C, F) bzw. ohne Entzündung (A, D). Balken = 100 µm.

Nach chronischer Allergenexposition ließ sich im Gegensatz zur intra-luminalen Entzündung keine Verringerung der Atemwegsentzündung im Bereich der proximalen Atemwege erkennen (OVA wk 1:  $135 \pm 6$  Leukozyten/HPF; OVA wk 12:  $184 \pm 15$  Leukozyten/HPF). Weiterhin ist die allergische Atemwegsentzündung nicht mehr auf die proximalen Atemwegsbereiche begrenzt, sondern betrifft das gesamte pulmonale Atemwegssystem bis hin zu den distalen Abschnitten, die in den *Ductus alveolaris* übergehen (OVA wk 12:  $63 \pm 7$  Leukozyten/HPF) (Abb. 3.5.3 u. Abb. 3.5.4).



#### Abb. 3.5.4 Leukozytensubpopulationen der chronisch-allergischen Atemwegsentzündung

BALB/c Mäuse (je Gruppe n=8) wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abb. 2.2.3). Die Lungen wurden durch Instillation von Formalinlösung entfaltet und *in-situ* fixiert. 3 µm dicke Schnitte Paraffinschnitte wurden HE-gefärbt. In je vier Präparaten pro Gruppe wurde je 6 proximale bzw. distale Atemwegsareale in der High-Powerfield-Mikroskopie (HPF) ausgezählt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von Makrophagen (weiß), Lymphozyten (Schwarz) und eosinophilen Granulozyten (Grau) (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

Neben einer Progression der chronisch-allergischen Atemwegsentzündung von proximal nach distal fällt nach der Quantifizierung der infiltrierten Leukozyten in der High-Powerfield-Mikroskopie eine Veränderung der Zusammensetzung der Infiltrats auf. So dominieren in der akuten Entzündung sowohl in der BAL wie auch im Gewebe die eosinophilen Granulozyten als Effektorzellen der allergischen Immunantwort, die zwischen 75-78% des Infiltrats ausmachen. Daneben kommen in viel geringerem Maße Lymphozyten (14-18%) und Makrophagen (6-7%) vor. Gänzlich anders ist die Zusammensetzung des chronisch-allergischen Infiltrats. Hier besteht die Atemwegsentzündung hauptsächlich aus Lymphozyten (58-78%) während eosinophile Granulozyten weitaus weniger vorkommen (16-32%). Der Anteil an Makrophagen ist hingegen nicht deutlich verändert (6-10%).

Zur weiteren Charakterisierung des lymphozytären Infiltrats nach chronischer Antigenexposition wurden Lymphozyten mit einer Reinheit von 95-97% aus dem Lungengewebe isoliert und zunächst einer FACS-Analyse unterzogen. Im

Vergleich zur akuten Entzündung zeigten die Lymphozyten der chronischen Atemwegsentzündung allerdings keine veränderte Expression der Oberflächenmarker CD3, CD4 oder CD8.

**Tab. 3.5.1 Differentielle Genexpression in Lymphozyten aus akuter (A) bzw. chronischer (B) Atemwegsentzündung**

**A**

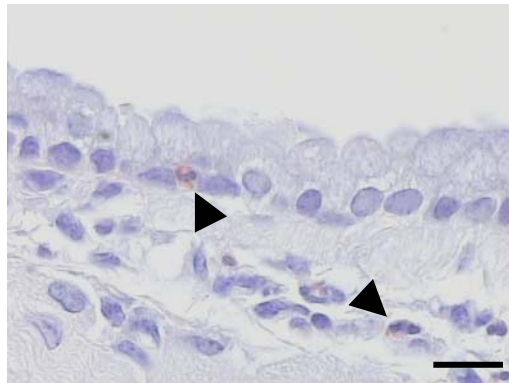
| Name des Gens | Kurzbezeichnung |
|---------------|-----------------|
| Protein 1     | P1              |
| Protein 2     | P2              |
| Protein 3     | P3              |
| Enzym 1       | E1              |
| Enzym 2       | E2              |
| Kernprotein 1 | K1              |
| Kernprotein 2 | K2              |
| Kernprotein 3 | K3              |

**B**

| Name des Gens | Kurzbezeichnung |
|---------------|-----------------|
| Protein 4     | P4              |
| Protein 5     | P5              |
| Protein 6     | P6              |
| Protein 7     | P7              |
| Protein 8     | P8              |
| Protein 9     | P9              |
| Protein 10    | P10             |
| Protein 11    | P11             |
| Protein 12    | P12             |
| Enzym 3       | E3              |
| Enzym 4       | E4              |
| Enzym 5       | E5              |
| Enzym 6       | E6              |
| Enzym 7       | E7              |
| Kernprotein 4 | K4              |
| Kernprotein 5 | K5              |
| Kernprotein 6 | K6              |
| Kernprotein 7 | K7              |
| Kernprotein 8 | K8              |
| Kernprotein 9 | K9              |

CD4+ T-Lymphozyten wurden aus Lungengewebe von BALB/c-Mäusen mit akuter (A) bzw. chronischer (B) allergischer Atemwegsentzündung isoliert. Von diesen Zellen wurde RNA aufgereinigt und amplifiziert. Mit dieser RNA wurde eine vergleichende Genexpressionsanalyse mittels 11,5 k Gene-Array durchgeführt. Das Signifikanz-Niveau einer erhöhten Expression lag bei 2,0. Kernproteine sind blau, Enzyme gelb und weitere Proteine grün dargestellt.

Somit wurde eine differentielle Genexpressionsanalyse mittels Gene-Array-Technik durchgeführt, die deutliche Unterschiede zwischen Lymphozyten aus der akuten und der chronischen Atemwegsentzündung zeigten. Zunächst sind eine Reihe von ribosomalen und Kern-Proteinen (blau) verschieden exprimiert (Tab. 3.5.1), was für eine veränderte Expressionstätigkeit der jeweiligen Zellen typisch ist. Daneben finden sich auch eine Reihe von Enzymen (gelb) und Proteinen (grün), die bislang nicht im Zusammenhang mit Lymphozyten oder allergischen Erkrankungen beschrieben sind. Zuletzt sind vor allem bei Lymphozyten aus der chronischen Entzündung über 20 weitere Gene höher als in Lymphozyten der akuten Entzündung exprimiert, deren Genprodukt noch nicht bekannt ist.



**Abb. 3.5.3 Intraepitheliale eosinophile Granulozyten nach chronischer Allergenprovokation**  
BALB/c Mäuse (je Gruppe n=8) wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abb. 2.2.3). Die Lungen wurden durch Instillation von Formalinlösung entfaltet und *in-situ* fixiert. 3 µm dicke Schnitte Paraffinschnitte wurden HE-gefärbt. Dargestellt ist ein repräsentative Längsschnitt durch einen intermediären Atemweg mit chronischer Atemwegsentzündung. Pfeile kennzeichnen eosinophile Granulozyten. Balken = 25 µm. (In Kooperation mit Prof. Dr. H. Fehrenbach).

Ein weiteres Merkmal der allergischen Entzündung des humanen Asthmas ist weiterhin die Infiltration eosinophiler Granulozyten nicht nur in die verschiedenen Schichten der Atemwegswand, sondern auch in das Atemwegsepithel. Diese intraepithelialen eosinophilen Granulozyten ließen sich nicht in der akuten Entzündungssituation, wohl aber nach chronischer Allergenprovokation finden (Abb. 3.5.5).

Um weiterhin zu untersuchen, ob die durch chronische Allergenprovokation induzierte allergische Atemwegsentzündung über einen längeren Zeitraum persistiert, wurden Tiere nach 12-wöchiger Allergenprovokation weitere sechs Wochen unter Standardbedingungen gehalten und erst dann untersucht. Diese Tiere zeigten im Vergleich zur OVA wk 12-Gruppe eine deutliche Verringerung der Entzündung vor allem der Infiltration durch eosinophile Granulozyten. Nichtsdestotrotz ließen sich in allen Tieren sowohl in der BAL wie auch im Atemwegsgewebe Lymphozyten nachweisen (Tabelle 3.5).

**Tab. 3.5.4 Leukozytensubpopulationen der allergischen Atemwegsentzündung**

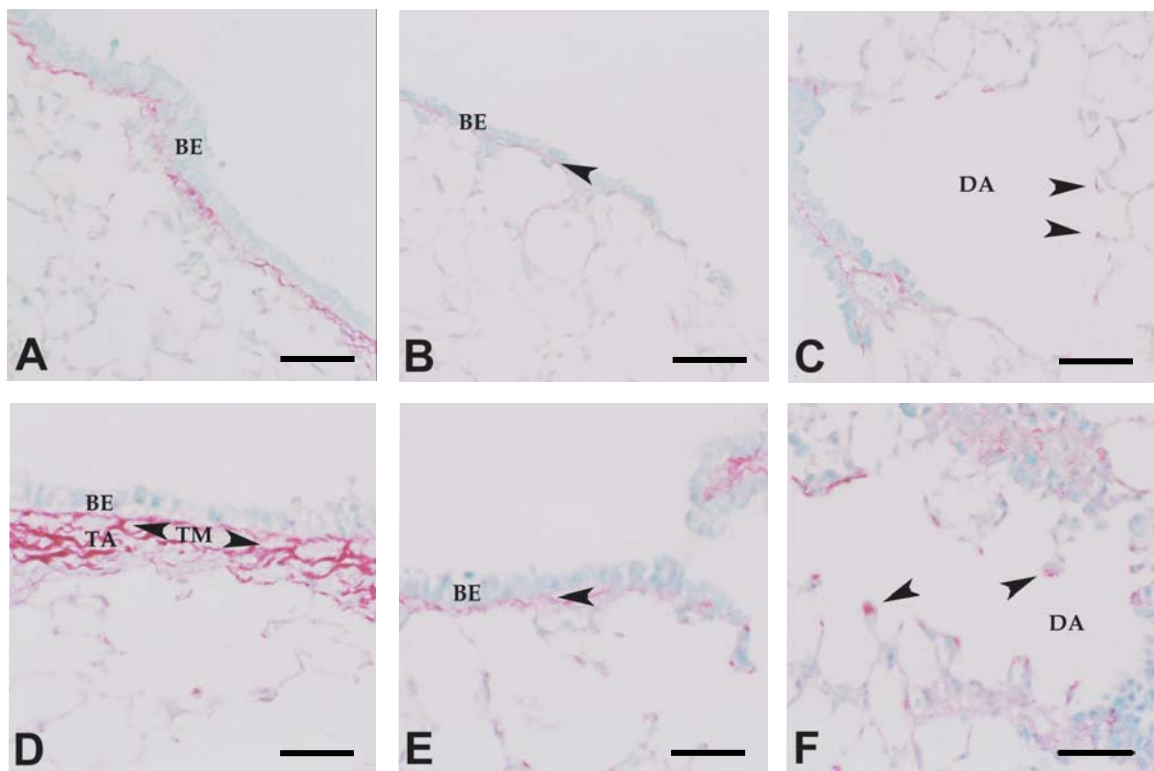
| Kompartiment                               | Zellart        | PBS         | OVA wk 12                  | OVA wk 12+6               |
|--|----------------|-------------|----------------------------|---------------------------|
| <b>BAL</b><br>(10 <sup>4</sup> Zellen/BAL) | eosinophile G. | 0,09 ± 0,05 | 10,25 ± 2,0 <sup>***</sup> | 0 ± 0                     |
|  | Lymphozyten    | 0,16 ± 0,06 | 1,02 ± 0,3 <sup>***</sup>  | 2,4 ± 0,64 <sup>***</sup> |
|  | Makrophagen    | 7,56 ± 1,33 | 5,94 ± 1,24                | 9,72 ± 0,83               |
| <b>Atemwegsgewebe</b><br>(Zellen/HPF)      | eosinophile G. | 0 ± 0       | 20,17 ± 4,45 <sup>**</sup> | 1,25 ± 0,52 <sup>*</sup>  |
|  | Lymphozyten    | 0 ± 0       | 36,33 ± 5,12 <sup>**</sup> | 9,17 ± 1,25 <sup>**</sup> |
|  | Makrophagen    | 0 ± 0       | 6,67 ± 1,43 <sup>**</sup>  | 3,67 ± 0,88 <sup>*</sup>  |

BALB/c Mäuse (je Gruppe n=4) wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abb. 2.2.3). Die Broncho-alveoläre Lavage fand 24 Stunden nach der letzten OVA-Exposition statt. Die Quantifizierung der eosinophilen Granulozyten wurde lichtmikroskopisch anhand zytologischer Kriterien durchgeführt. Die Lungen wurden durch Instillation von Formalinlösung entfaltet und *in-situ* fixiert. 3 µm dicke Paraffinschnitte wurden HE-gefärbt. In je vier Präparaten pro Gruppe wurde je 6 proximale bzw. distale Atemwegsareale in der High-Powerfield-Mikroskopie (HPF) ausgezählt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).



### 3.6 Die chronische Atemwegsentzündung ist mit strukturellen Veränderungen der Atemwege assoziiert

Da in der BAL chronisch allergen-exponierter Tiere sehr hohe Mengen an TGF- $\beta$ , einem Zytokin mit sowohl anti-inflammatorischer wie auch pro-fibrotischer Wirkung nachgewiesen werden konnten, wurde in der Folge untersucht, ob die ständige Allergen-Provokation und damit die ständige Atemwegsentzündung mit fibrotischen Umbau-Prozessen der Atemwegswand assoziiert sind. In der *Sirius red / Fast green*-Färbung lässt sich selektiv fibrilläres Kollagen Typ I nachweisen.



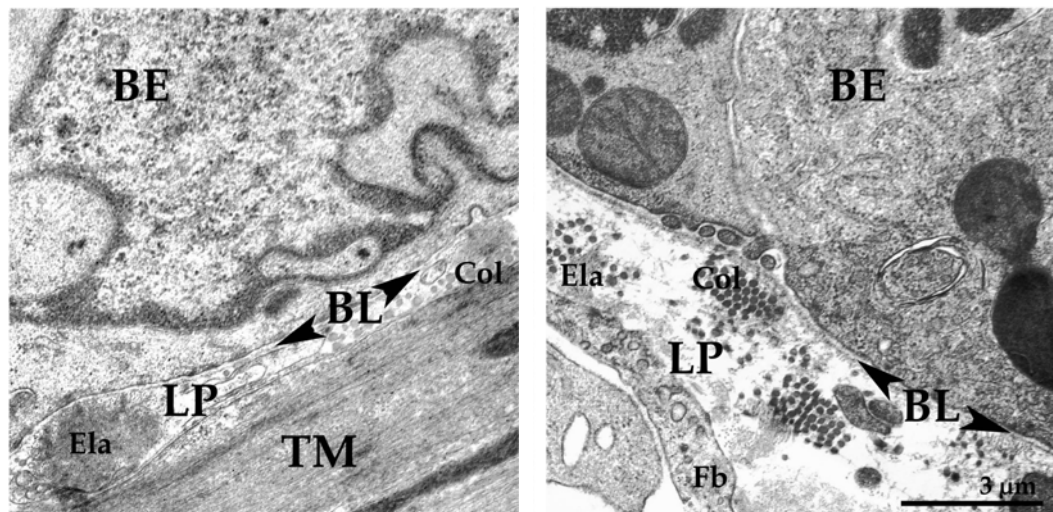
**Abb. 3.6.1 Allergische Atemwegspathologie nach chronischer Allergenprovokation**

BALB/c Mäuse (je Gruppe n=8) wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abb. 2.2.3). Die Lungen wurden durch Instillation von Formalinlösung entfaltet und *in-situ* fixiert. 3  $\mu$ m dicke Paraffinschnitte wurden mit *Sirius Red* und *fast green* gefärbt. Dargestellt sind repräsentative Längsschnitte durch proximale (A, D), intermediäre (B, E) bzw. distale (C, F) Atemwege der PBS-Gruppe (A-C) oder mit chronischer Atemwegsentzündung (D-F). Pfeile kennzeichnen Bereiche mit Kollageneinlagerung. BE= Bronchialepithel; DA = *Ductus alveolaris*; TM = *Tunica muscularis*; TA = *Tunica adventitia*; Balken = 50  $\mu$ m. (In Kooperation mit Prof. Dr. H. Fehrenbach).

In den proximalen Atemwegen der PBS-Tiere lassen sich deutlich Kollagenfasern Typ I nachweisen, allerdings sind diese in den distalen Atemwegen nahezu nicht mehr zu detektieren. Im *Ductus alveolaris* lassen sich Kollagenfasern Typ I nur noch am Alveolareingang erkennen.

In chronisch allergen-provozierten Tieren ist deutlich eine vermehrte Einlagerung von kollagenen Fasern des Typs I sowohl in den proximalen wie auch in den distalen Bereichen zu erkennen. Dabei sind vor allem die Bereiche der *Tunica muscularis* und der *Tunica adventitia* betroffen. Selbst in den Bereichen des Alveolareingangs sind fibrotische Umbau-Prozesse zu erkennen (Abb. 3.6.1).

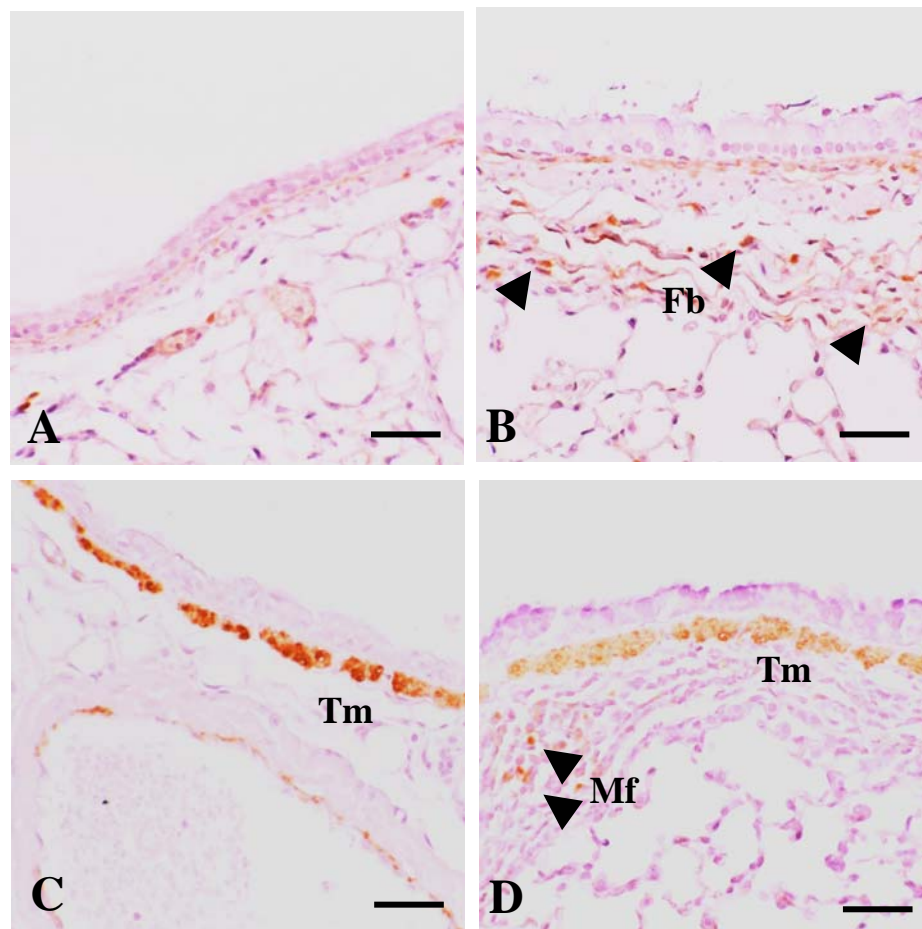
Um die genaue Lokalisation der Kollageneinlagerung zu identifizieren wurde eine ultrastrukturelle Analyse des Atemwegsgewebes mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie durchgeführt. Diese ergab, dass vor allem in der *Lamina propria reticularis* der Atemwegswand eine vermehrte Einlagerung der kollagenen Fasern stattfand (Abb. 3.6.2). Diese ist im Vergleich zur *Lamina propria reticularis* der PBS-Gruppe deutlich verdickt.



**Abb. 3.6.2 Allergische Atemwegspathologie nach chronischer Allergenprovokation - Ultrastruktur**

BALB/c Mäuse (je Gruppe n=8) wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abb. 2.2.3). Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Transmissions-Elektronen-Mikroskopie eines distalen Atemweges eines PBS-Tier bzw. nach chronischer Allergen-Provokation. Fb = Fibroblast; SC = Seröse Zelle; SMC = glatte Muskelzelle; Col = kollagene Fasern; Ela = Elastin. Balken = 3 µm. (In Kooperation mit Prof. Dr. H. Fehrenbach).

Da TGF- $\beta$  in Fibroblasten nicht nur eine gesteigerte Neo-Synthese extrazellulärer Matrix, vor allem kollagener Fasern, induziert, sondern auch eine gesteigerte Proliferation dieser Zellen bewirken kann, wurde eine immunhistologische Färbung gegen das fibroblasten-spezifische Peptid (FSP) durchgeführt. Dabei lässt sich vor allem in den intermediären und distalen Atemwegen eine erhöhte Anzahl an Fibroblasten in der Atemwegswand erkennen.

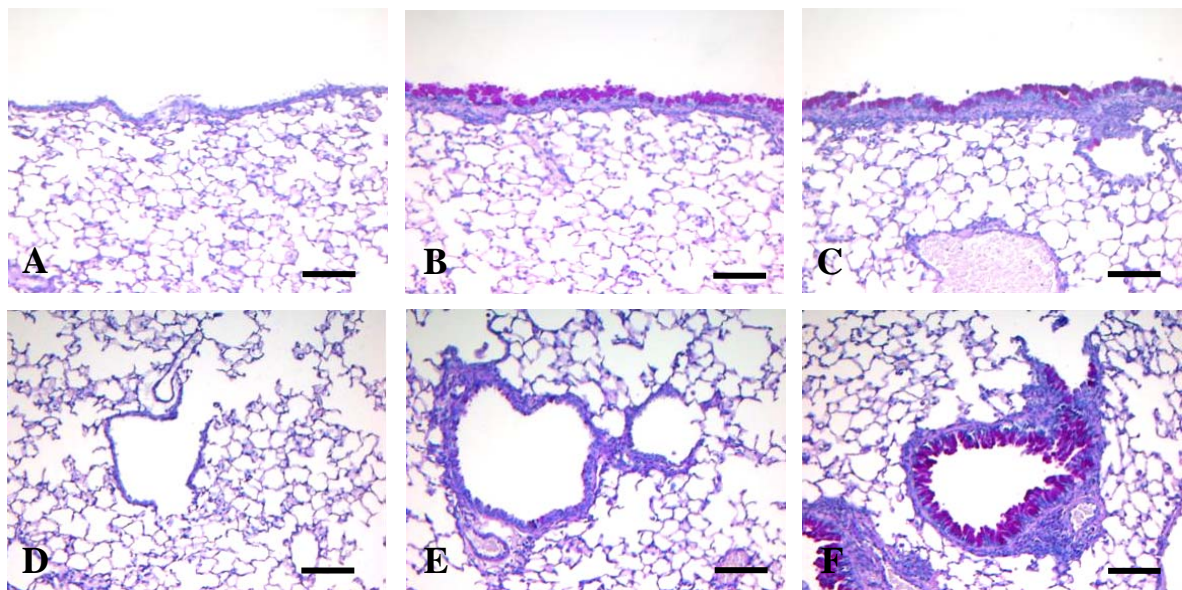


**Abb. 3.6.3 Allergische Atemwegspathologie nach chronischer Allergenprovokation**

BALB/c Mäuse (je Gruppe n=8) wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abb. 2.2.3). Die Lungen wurden durch Instillation von Formalinlösung entfaltet und *in-situ* fixiert. 3  $\mu$ m dicke Paraffinschnitte wurden immunhistologisch gegen FSP (A, B) bzw. gegen  $\alpha$ -SMA (C, D) gefärbt. Dargestellt sind repräsentative Längsschnitte durch intermediäre Atemwege der PBS-Gruppe (A,C) oder mit chronischer Atemwegsentzündung (B, D). Pfeile kennzeichnen Fibrozyten (A, B) bzw. Myofibroblasten (C, D). TM = *Tunica muscularis*; Fb = Fibroblasten; Mf = Myofibroblasten; Balken = 50  $\mu$ m. (In Kooperation mit Prof. Dr. H. Fehrenbach).

Eine weitere Färbung gegen  $\alpha$ -SMA wurde angewandt, um eine eventuelle Hyperplasie der *Tunica muscularis* feststellen zu können. Auch wenn TGF- $\beta$  proliferationssteigernd auf Myozyten wirken kann, war keine Hyperplasie dieser Zellen und damit keine Verdickung der *Tunica muscularis* zu erkennen. Allerdings wiesen chronisch allergen-provozierte Tiere in der Atemwegswand zahlreiche  $\alpha$ -SMA-positiven Myofibroblasten auf (Abb. 3.6.3), die in der Atemwegswand der Kontrolltiere bzw. bei einer akuten allergischen Entzündung nicht vorhanden sind.

Neben dem *Airway remodelling* ist für das allergische Asthma eine vermehrte Mukusproduktion typisch. Diese äußert sich zum einen in einer Mukushypersekretion submuköser Drüsen und zum anderen in einer Hyperplasie der Becherzellen des Atemwegsepithels. In der Maus befinden sich submuköse Drüsen allerdings nur unterhalb des Kehlkopfs in der Trachea, weiter distal wird eine Steigerung der Mukusproduktion nur noch durch eine Hyperplasie der Becherzellen erreicht.



**Abb. 3.6.4 Allergische Atemwegspathologie nach chronischer Allergenprovokation**

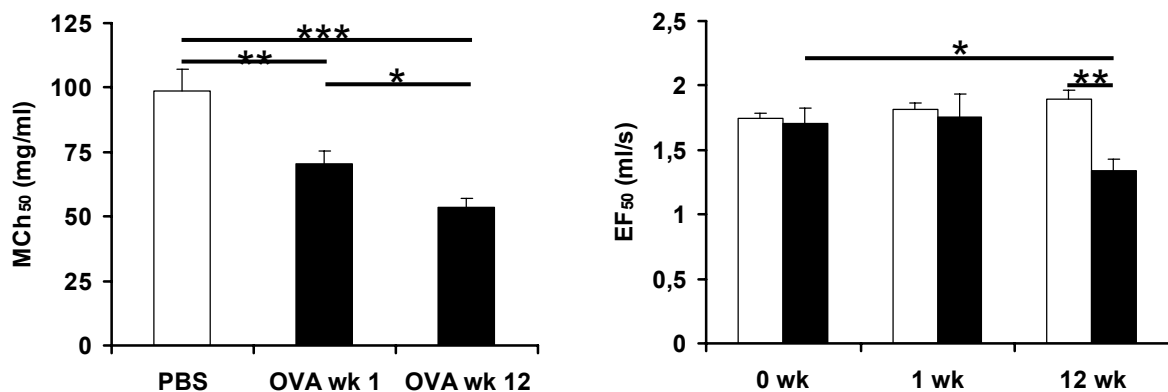
BALB/c Mäuse (je Gruppe n=8) wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abb. 2.2.3). Die Lungen wurden durch Instillation von Formalinlösung entfaltet und *in-situ* fixiert. 3  $\mu$ m dicke Paraffinschnitte wurden PAS-gefärbt. Dargestellt sind repräsentative Längsschnitte durch proximale (A-C) bzw. distale (D-F) Atemwege mit akuter (B, E) oder chronischer Atemwegsentzündung (C, F) bzw. ohne Entzündung (A, D). Balken = 100  $\mu$ m.

Diese ist im Akut-Modell wie auch die allergische Atemwegsentzündung auf die proximalen Abschnitte der Atemwege bzw. auf den Hauptbronchus und die folgende erste Abzweigung begrenzt. Im Gegensatz dazu findet nach chronischer Allergen-Provokation im gesamten Bronchialsystem eine Hyperplasie der Becherzellen statt. Wie in der PAS-Färbung deutlich zu erkennen ist, lassen sich selbst am Übergang vom Bronchus in den *Ductus alveolaris* noch Becherzellen nachweisen (Abb. 3.6.4).

### **3.7 Die chronische Atemwegsentzündung und das Airway remodeling sind mit einer Veränderung der Lungenfunktion assoziiert**

Im Mausmodell für das akute allergische Asthma ist die Atemwegsentzündung mit der Entwicklung einer Atemwegsüberempfindlichkeit assoziiert und spiegelt damit ein wichtiges klinisches Charakteristikum der humanen Erkrankung wider. Da nach chronischer Allergenexposition zwar eine Verringerung der intra-luminalen Entzündung im Gegensatz dazu allerdings eine Progression der Entzündung des Atemwegsgewebes zu beobachten war, wurde weiterhin untersucht, ob die Veränderung der Entzündungssituation eventuell mit einer Veränderung der Atemwegsreagibilität einhergeht. Während PBS-Tiere bei durchschnittlich  $98,8 \pm 8,4$  mg/ml MCh mit einer 50%igen Reduktion des  $EF_{50}$  reagierten, zeigten in die Tiere mit akuter allergischer Atemwegsentzündung (OVA wk 1) eine signifikant erhöhte Atemwegsreagibilität ( $70,2 \pm 5,2$  mg/ml MCh). In der chronisch allergen-provozierten Gruppe (OVA wk 12) war eine gegenüber der OVA wk 1-Gruppe noch deutlich erhöhte Atemwegsreaktivität zu erkennen (Abb. 3.7.1).

In Patienten mit chronischem Asthma bronchiale gehen sowohl die chronische Entzündung wie auch die strukturellen Veränderungen der Atemwege mit der Entwicklung einer irreversiblen Atemwegsobstruktion einher. Da auch im Mausmodell nach chronischer Allergenprovokation eine chronische, das ganze Bronchialsystem betreffende Atemwegsentzündung sowie ein umfangreicher struktureller Atemwegsumbau vorliegen, wurde untersucht, ob diese eventuell mit einer Veränderung der Lungenfunktion assoziiert sind. Dazu wurde bei Tieren in der Head-out Body-Plethysmographie der halbmaximale expiratorische Atemfluss ( $EF_{50}$ ) unter Ruhebedingungen gemessen.



**Abb. 3.7.1 Einfluss chronischer Allergenprovokation auf die Lungenfunktion: A) Atemwegsreabilität gegenüber  $\beta$ -Methyl-Acetylcholin; B) Atemphysiologie**

BALB/c Mäuse (je Gruppe n=8) wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abb. 2.2.3). Die Atemwegsreabilität (AR) bzw. der expiratorische Atemfluss (EF<sub>50</sub>) wurde 24 Stunden nach der zweiten (OVA wk 1) bzw. nach der letzten OVA-Exposition (OVA wk 12) mittels Head-out Body-Plethysmographie bestimmt. Die AR wird als die Konzentration an  $\beta$ -Methyl-Acetylcholin (MCh<sub>50</sub>) ausgedrückt, die eine 50%ige Reduktion des Ausgangswerts des halbmaximalen expiratorischen Atemflusses bewirkt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (\* p < 0,05).

Der EF<sub>50</sub> der PBS- bzw. OVA-Tiere vor Beginn der Experimentalserie lag zwischen 1,71 ml/s und 1,75 ml/s. Während sich der EF<sub>50</sub> der PBS-Gruppe im Verlauf des Experiments auf  $1,89 \pm 0,07$  ml/s erhöhte, stellte sich in der OVA-Gruppe nach chronischer Allergenexposition eine deutliche Verringerung des EF<sub>50</sub> ein. Mit  $1,34 \pm 0,09$  ml/s war dieser sowohl im Vergleich zum Ausgangswert der OVA-Gruppe, wie auch zum EF<sub>50</sub> der gleichaltrigen PBS-Gruppe, signifikant verringert, was auf einen erhöhten Atemwegswiderstand hindeuten könnte.

### 3.8 Eosinophile Granulozyten spielen eine zentrale Rolle innerhalb des Chronifizierungsprozesses der allergischen Asthmas

Eosinophile Granulozyten stehen als Effektorzellen der allergischen Immunantwort mit erheblichem zytotoxischem Potential im Verdacht sowohl für die strukturellen Veränderungen der Atemwegswand wie auch für die Entwicklung



einer Atemwegshyperreagibilität eine entscheidende Rolle zu spielen. Um diese Hypothese zu untersuchen wurde in dem in dieser Arbeit etablierten Mausmodell für ein chronisch-allergisches Asthma ein CCR-3-Antagonist eingesetzt, der effizient die Infiltration eosinophiler Granulozyten aus dem Gefäßsystem in das Zielgewebe, in diesem Fall in das Atemwegsgewebe, verhindert.

**Tabelle 3.8.1: Die anti-inflammatorischen Effekte des CCR-3-Antagonisten auf die akute allergische Atemwegsentszündung**

|   | <b>PBS</b>  | <b>OVA</b>    | <b>CCR-3 Ant.<br/>10 mg/kg KG</b> | <b>CCR-3 Ant.<br/>30 mg/kg KG</b> |
|---|-------------|---------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Zellen in der<br/>BAL<br/>(10<sup>4</sup>/BAL):<sup>1)</sup></b> |             |               |                                   |                                   |
| <b>eosinophile G.</b>   | 0,01 ± 0,01 | 148,06 ± 8,20 | 94,83 ± 6,63                      | 85,10 ± 9,10                      |
| <b>Lymphozyten</b>  | 0,08 ± 0,04 | 14,33 ± 1,85  | 22,99 ± 2,47**                    | 15,13 ± 7,85**                    |
| <b>Makrophagen</b>  | 4,89 ± 1,08 | 19,77 ± 1,63  | 20,89 ± 1,81                      | 18,67 ± 1,90                      |
| <b>Zytokine in<br/>der BAL<br/>(pg/ml):<sup>2)</sup></b>            |             |               |                                   |                                   |
| <b>IL-4</b>   | unter DL    | 41,2 ± 5,9    | 37,8 ± 7,1                        | 35,0 ± 5,5                        |
| <b>IL-5</b>   | unter DL    | 140,1 ± 14,9  | 133,7 ± 18,6                      | 119,5 ± 17,0                      |
| <b>IFN-γ</b>  | 25,8 ± 2,9  | 27,7 ± 5,5    | 22,8 ± 4,0                        | 30,2 ± 6,2                        |
| <b>TNF-α</b>  | unter DL    | 63,5 ± 15,7   | 55,7 ± 13,4                       | 51,6 ± 9,1                        |
| <b>MCh<sub>50</sub><br/>(mg/ml)<sup>3)</sup></b>                    | 88,9 ± 7,8  | 54,4 ± 2,8    | 59,5 ± 6,6                        | 78,4 ± 2,5**                      |

BALB/c Mäuse (je Gruppe n=8) wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abb. 2.2.1). Der CCR-3-Antagonist wurde in zwei verschiedenen Dosen je 30 Minuten vor und 5 Stunden nach der OVA-Challenge per os appliziert. Alle Analysen fanden ca. 24 Stunden nach der letzten OVA-Challenge statt. <sup>1)</sup> Absolute Anzahl an Leukozyten in der BAL. Zytokin-Konzentration in der BAL-Flüssigkeit bestimmt durch CBA-Technik. <sup>3)</sup> Die Atemwegsreabilität wurde mittels Head-out Body-Plethysmographie bestimmt und wird als die Konzentration an β-Methyl-Acetylcholin (MCh<sub>50</sub>) ausgedrückt, die eine 50%ige Reduktion des Ausgangswerts des halbmaximalen expiratorischen Atemflusses bewirkt. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. (\* p < 0,05; \*\*p < 0,01).

Die Wirkung dieses CCR-3-Antagonisten auf die allergische Atemwegsentzündung wurde zunächst in einem weniger aufwendigen Modell des akuten allergischen Asthmas untersucht. Dabei wurden zwei verschiedene Konzentrationen verwendet, 10 bzw. 30 mg/kg Körpergewicht (KG) der Maus. Untersucht wurde das Ausmaß der leukozytäre Infiltration in das bronchoalveoläre Lumen, die Level der Zytokine IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  in der BAL und die Atemwegsreagibilität. Dabei zeigte sich, dass die Dosis von 10 mg/kg KG zwar die Anzahl eosinophiler Granulozyten in der BAL um ca. 30% verringerte, allerdings, zu keiner wesentlichen Veränderung der Atemwegsreagibilität führte.

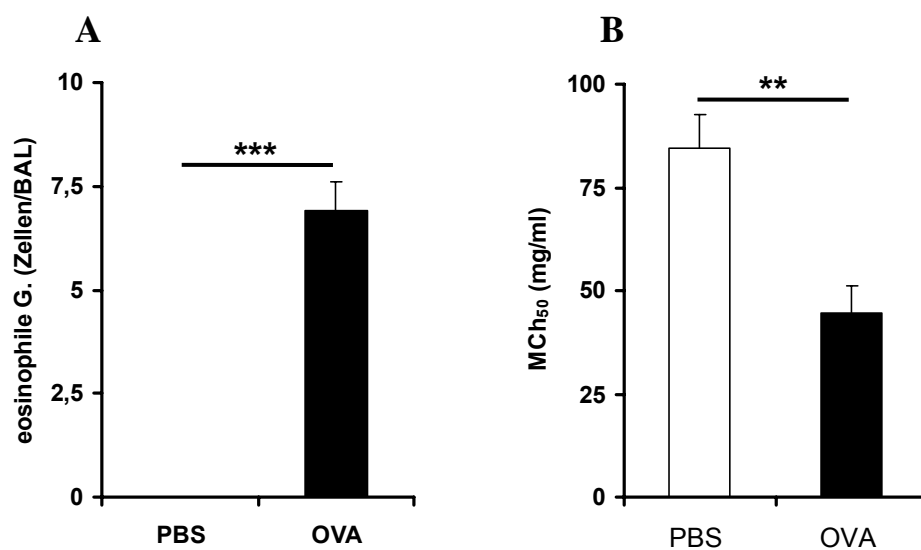
Die Dosis von 30 mg/kg KG reduzierte die Anzahl der eosinophilen Granulozyten in der BAL um ca. 40%, wobei die Menge an infiltrierten Lymphozyten oder Makrophagen im Vergleich zur OVA-Gruppe, die als positive Kontrollgruppe diente, nicht verändert waren. Auch die gemessenen Zytokinspiegel waren im Vergleich zur OVA-Gruppe unverändert hoch. Die Verringerung der Infiltration eosinophiler Granulozyten in die Atemwege war jedoch mit einer signifikanten Verringerung der Atemwegsreagibilität gegenüber unspezifischen Stimuli assoziiert (Tab.). Damit wirkte sich die Applikation des CCR-3-Antagonisten vor allem auf die Infiltration eosinophiler Granulozyten in die Atemwege und damit einhergehend auf die Atemwegsreagibilität aus, ohne die OVA-spezifischen TH<sub>2</sub>-Antwort zu beeinflussen.

Um nun die Rolle eosinophiler Granulozyten für das beim Asthma beobachtete Airway remodelling zu untersuchen, wurde eine Dosis von 30 mg/kg KG CCR-3-Antagonist eingesetzt, die die Infiltration dieser Zellen in die Atemwege wirksam verhindern sollte. Der Beginn der oralen Applikation des CCR-3-Antagonisten wurde dabei so gewählt, dass die Infiltration weiterer eosinophiler Granulozyten in die Atemwege unterbunden wurde, bevor im Mausmodell Anzeichen für einen fibrotischen Umbau der Atemwege zu beobachten war.

Nach vier Wochen Allergen-Exposition konnte in der BAL OVA-sensibilisierter Tiere noch eine große Anzahl eosinophiler Granulozyten ( $6,9 \pm 0,72$  Zellen/BAL) festgestellt werden. Die allergische Atemwegsentzündung war zudem mit einer im Vergleich zur PBS-Gruppe deutlich profunderen AHR assoziiert (Abb. 3.7.1).



Die Applikation des CCR-3-Antagonisten begann genau zu diesem Zeitpunkt und wurde bis zum Ende der zwölften Expositionswoche fortgeführt. Die unbehandelte OVA-Gruppe zeigte zu diesem Zeitpunkt eine deutlich geringere intraluminale Entzündung als vier Wochen zuvor, allerdings resultierte die fortwährende Allergenprovokation in einer massiven Entzündung des Atemwegsgewebes entlang des gesamten Bronchialsystems. Aus diesem Grund wurde zur Abschätzung der Effizienz der CCR-3-Antagonisierung neben der BAL auch die Lungenhistologie herangezogen.



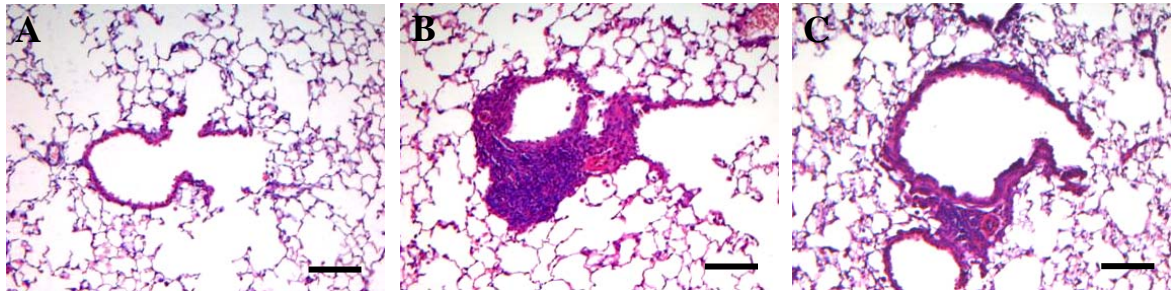
**Abb. 3.8.1 Einfluss des CCR-3-Antagonisten auf das experimentelle Asthma: A) Atemwegsreabilität gegenüber  $\beta$ -Methyl-Acetylcholin; B) Atemphysiologie**

BALB/c Mäuse (je Gruppe n=8) wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abb. 2.2.3). Die Broncho-alveoläre Lavage fand 24 Stunden nach der letzten OVA-Exposition statt. Die Quantifizierung der eosinophilen Granulozyten wurde lichtmikroskopisch anhand zytologischer Kriterien durchgeführt. Die Atemwegsreabilität wurde 24 Stunden nach der letzten OVA-Exposition mittels Head-out Body-Plethysmographie bestimmt und wird als die Konzentration an  $\beta$ -Methyl-Acetylcholin (MCh<sub>50</sub>) ausgedrückt, die eine 50%ige Reduktion des Ausgangswerts des halbmaximalen expiratorischen Atemflusses bewirkt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

Die histologischen Lungenpräparate offenbaren in der OVA-Gruppe ein massives peribronchiales Infiltrat aus eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten, wie es bereits zuvor beschrieben ist (siehe 3.5). Im Gegensatz dazu resultierte die Applikation des CCR-3-Antagonisten (CCR-3) in einer deutlichen Reduktion der

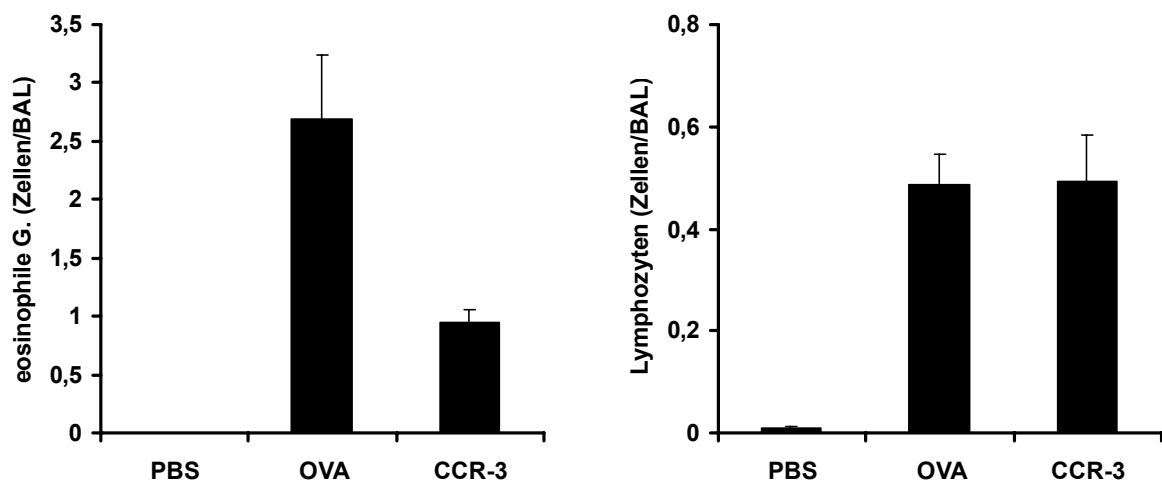
Anzahl infiltrierender eosinophiler Granulozyten, während die Anzahl der in das Atemwegewebe infiltrierten Lymphozyten unverändert blieb (Abb. 3.7.2).

Ein ähnliches Bild zeigt auch die Analyse der Leukozytensubpopulationen der BAL.



**Abb. 3.8.2 Einfluss des CCR-3-Antagonisten auf die allergische Atemwegspathologie**

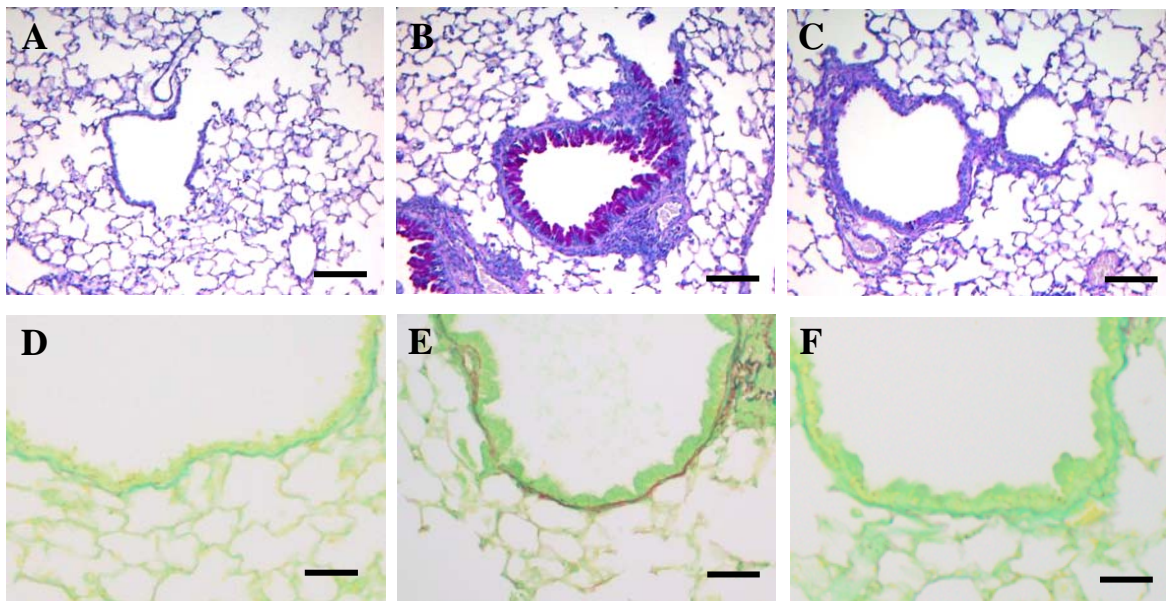
BALB/c Mäuse (je Gruppe n=8) wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abb. 2.2.3). Die Applikation des CCR-3-Antagonisten fand über einen Zeitraum von der 4.-8. Provokationswoche statt. Die Lungen wurden durch Instillation von Formalinlösung entfaltet und *in-situ* fixiert. 3 µm dicke Paraffinschnitte wurden PAS-gefärbt. Dargestellt sind repräsentative Querschnitte distale Atemwege der PBS-Gruppe (A), der OVA-Gruppe (B) und der CCR-3-Gruppe (C). Balken = 100 µm.



**Abb. 3.8.3 Einfluss des CCR-3-Antagonisten auf die allergische Atemwegsentszündung**

BALB/c Mäuse (je Gruppe n=8) wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit OVA sensibilisiert, provoziert und mit CCR-3-Antagonisten behandelt (siehe Abb. 2.2.3). Die Bronchoalveoläre Lavage wurde 24 Stunden nach der letzten OVA-Exposition durchgeführt. Die Quantifizierung der Leukozyten wurde lichtmikroskopisch anhand zytologischer Kriterien durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. der unsensibilisierten (PBS) und sensibilisierten Kontrollgruppe (OVA), sowie der CCR-3-Gruppe (CCR-3) (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

Während in der BAL der OVA-Gruppe neben Lymphozyten ( $0,49 \pm 0,06 \times 10^5$  Zellen/BAL) vor allem eosinophile Granulozyten ( $2,69 \pm 0,55 \times 10^5$  Zellen/BAL) den Hauptanteil des leukozytären Infiltrats stellen, ist die Anzahl der eosinophilen Granulozyten nach CCR-3-Antagnisierung signifikant reduziert ( $0,95 \pm 0,1 \times 10^5$  Zellen/BAL). Auch hier bleibt die Anzahl an Lymphozyten ( $0,49 \pm 0,09 \times 10^5$  Zellen/BAL) in der BAL nahezu unbeeinflusst (Abb. 3.7.3).



**Abb. 3.8.4 Einfluss des CCR-3-Antagonisten auf die allergische Atemwegspathologie**

BALB/c Mäuse (je Gruppe n=8) wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit OVA sensibilisiert und provoziert (siehe Abb. 2.2.3). Die Applikation des CCR-3-Antagonisten fand über einen Zeitraum von der 4.-8. Provokationswoche statt. Die Lungen wurden durch Instillation von Formalinlösung entfaltet und *in-situ* fixiert. 3  $\mu$ m dicke Paraffinschnitte wurden PAS-gefärbt. Dargestellt sind repräsentative Querschnitte distale Atemwege der PBS-Gruppe (A, D), der OVA-Gruppe (B, E) und der CCR-3-Gruppe (C, F) in PAS- (A-C) bzw. *Sirius red* / *Fast green* (D-F) Färbung. Balken = 100  $\mu$ m.

#### 4. Diskussion

Die Hauptergebnisse der vorliegenden Arbeit sind zum einen die Charakterisierung des Einflusses viraler TLR-Liganden auf das allergische Asthma. Dabei konnte gezeigt werden, dass die TLR-3- bzw. TLR-7-Aktivierung während der Sensibilisierungsphase, in einer Verhinderung der allergischen Sensibilisierung resultiert (I). Somit unterbleibt sowohl eine allergische humorale Immunantwort als auch eine allergische Entzündungsreaktion in der Lunge nach lokalem Allergenkontakt. Zum anderen supprimiert die TLR-3- bzw. TLR-7-Aktivierung im sensibilisierten Tier die allergische Entzündung und die damit assoziierte Atemwegshyperreagibilität nach erneutem Allergenkontakt in der Lunge (II). Dabei zeigten sich sogar Unterschiede in der Wirkung der verschiedenen TLR-Liganden, die z.T. supprimierten, z.T. eine TH<sub>1</sub>-Antwort induzierten (III). In IL-12p35 defizienten Tieren konnten diese Effekte nicht gezeigt werden, was auf eine zentrale Rolle dieses Zytokins innerhalb immunmodulierenden Wirkung von viralen TLR-Liganden auf die allergische Entzündungsreaktion schließen lässt (IV).

Daneben konnte im sensibilisierten Tier durch eine chronische Allergenprovokation eine chronisch-allergische Entzündung des gesamten Bronchialsystems induziert werden, die sich deutlich von der akuten allergischen Entzündungssituation unterscheidet und über einen langen Zeitraum persistiert (V). Diese chronische Entzündung ist dabei assoziiert mit strukturellen Veränderungen des gesamten Bronchialsystems, wie z.B. einer subepithelialen Fibrose, einer Becherzellhyperplasie und dem vermehrten Vorkommen von Fibroblasten und Myofibroblasten in der Atemwegswand (VI). Die entzündlichen und strukturellen Veränderungen des Bronchialsystem waren dabei zudem assoziiert mit einer gesteigerten Atemwegsreagibilität und einer persistierenden Atemflusslimitation (VII). Somit resultierte die chronische Allergenprovokation in einem Phänotyp, der den des Menschen in hohem Maß reflektiert. Durch die Blockade der Eosinophileninfiltration vor Beginn der Redemodellingvorgänge in den Atemwegen konnte gezeigt werden, dass ohne eosinophile Granulozyten kein Airway remodelling stattfindet (VIII).

Verschiedene Studien haben bisher virale Infektionen mit der Pathogenese des allergischen Asthmas assoziiert, allerdings sind in diesem Kontext zum Teil gegensätzliche Effekte beschrieben. So konnte bisher kein kausaler Zusammenhang zwischen einer Respiratory Syncytial Virus (RSV)-Infektion und der Entwicklung atopischer Erkrankungen hergestellt werden und es ist weiterhin unklar, ob eine solche RSV-Infektion tatsächlich das Risiko für Entwicklung eines allergischen Asthmas erhöht oder ob gerade Kinder, die später eine atopische Erkrankung entwickeln werden, eine schwerere Verlaufsform dieser Erkrankung während einer RSV-Infektion erleiden werden (Peebles, 2004). Wie für die Infektion mit RSV, so scheint auch die Infektion mit Rhino-Viren eine Rolle bei der Entwicklung des allergischen Asthmas zu spielen (Kotaniemi-Syrjänen, 2003). Allerdings ist die Rolle dieser Viren in diesem Zusammenhang ebenfalls nicht ganz klar. So werden beide Viren, wie auch Parainfluenza und Metapneumoviren mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer atopischen Erkrankung assoziiert, auf der anderen Seite zeigten verschiedene epidemiologische Studien, dass die frühkindliche Infektion der oberen Atemweg durch Viren protektiv auf die Entwicklung allergischer Erkrankungen einwirken kann (Wright, 1989; Ball, 2000). Diese Beobachtungen lassen sich mit der Hygiene-Hypothese übereinbringen, die die frühkindliche Induktion von TH<sub>1</sub>-Antworten als Grund für ein niedrigeres Risiko für die Erkrankung an Allergien postuliert (Strachnan, 1989). Für andere Viren wie das Hepatitis-A-Virus (HAV), die nicht den Respirationstrakt infizieren, konnte eindeutig belegt werden, dass eine solche Infektion mit einem reduzierten Langzeitrisiko für die Entwicklung einer atopischen Erkrankung einhergeht (McIntire, 2003).

Die TLR-3- bzw. TLR-7-Aktivierung verhindert die allergische Sensibilisierungsreaktion

Viren können das Immunsystem über verschiedene Wege aktivieren bzw. stimulieren. Dabei ist die Präsentation viraler Proteinf Fragmente auf MHC-I-Molekülen und die darauf folgende Aktivierung CD8<sup>+</sup> T-Zellen die wichtigste Komponente. Daneben zeigen auch das virale Genom bzw. die Zwischenprodukte, die bei der Replikation des viralen Genoms gebildet werden,

bestimmte Eigenschaften, die im Wirtsorganismus nicht vorhanden sind. Zu diesen gehören einzelsträngige RNA (ssRNA) mit einem hohen Gehalt an unmethylierten CpG-Motiven und doppelsträngige RNA (dsRNA). Viele der oben erwähnten „Respiratorischen Viren“, wie RSV, Rhinoviren, Parainfluenza- und Influenzaviren besitzen ein ssRNA-Genom. Für die Replikation ist es daher nötig mittels einer viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase einen komplementären RNA-Strang als Matrize für die Genomproduktion zu generieren. Dabei entsteht als Zwischenprodukt dsRNA (Cann, 1993). SsRNA und dsRNA, wie auch ihre synthetischen Analoga R-848 und Poly (I:C), werden über TLR-3 bzw. TLR-7 erkannt und können antigenpräsentierende Zellen über diesen Kontakt aktivieren (Alexopoulou, 2001; Lund, 2004). Allerdings ist bislang über den Einfluss dieser TLR-Liganden auf die Initiation bzw. Progression TH<sub>2</sub>-gesteuerter Erkrankungen, wie sie das allergische Asthma darstellt, nichts bekannt (Eisenbarth, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden diese TLR-Liganden zum ersten Mal in diesem Kontext untersucht. Wichtig ist dabei, dass „Respiratorische Viren“ zunächst die Zellen des Atemwegsepithels infizieren, was das Vorkommen viraler TLR-Liganden allerdings nicht auf dieses Kompartiment beschränkt. Alle oben beschriebenen Viren werden freigesetzt, wenn das jeweilige Virus die infizierte Zelle durch die Induktion eines zytopathischen Effekts zerstört, um die neu produzierten Viren freizusetzen. Dabei werden die einzelnen RNA-Moleküle, sowie deren Zwischenprodukte, die im Übermaß produziert werden ebenfalls freigesetzt und gelangen in die umgebenden Kompartimente (Majde, 1998). Daneben sind einige dieser Viren in der Lage antigenpräsentierende Makrophagen und Monozyten direkt zu infizieren und in diesen sogar zu persistieren (Van Reeth, 1997; Guerrero-Plata, 2001). Aus diesem Grund wurden die synthetischen TLR-Liganden R-848 und poly (I:C) systemisch appliziert.

Die Applikation des TLR-3-Liganden poly (I:C) als auch des TLR-7-Liganden R-848 verhinderte zum einen die allergische Sensibilisierungsreaktion und verminderte zum anderen die allergische Sekundärantwort auf den lokalen Allergenkontakt in der Lunge. Somit hatte die TLR3- bzw. TLR-7-Aktivierung einen Effekt sowohl auf die systemische wie auch auf die lokale Immunantwort. Auf die allergische Sensibilisierungsreaktion haben antigenpräsentierende Zellen (APC) einen entscheidenden Einfluss. Nach der Phagozytose des potentiellen

Allergens durch Makrophagen bzw. dendritische Zellen (DC) wird dieses zunächst prozessiert und danach in Form eines Peptidfragments gebunden an das MHC-II-Molekül auf der APC-Oberfläche präsentiert. Bei einem eventuellen Kontakt mit einer antigen-spezifischen CD 4-positiven T-Zelle, führt die Bindung des T-Zell-Rezeptors (TCR) mit dem Peptid-MHC-II-Komplex zu einer Aktivierung der T-Zelle wie auch der APC (Steinman, 1993), wenn simultan der weitere Kontakt zwischen den kostimulatorisch wirkenden Oberflächenmolekülen CD 28 und B 7.1 bzw. B 7.2 gewährleistet ist (Liu, 1992). Für eine effiziente Immunantwort auf ein Antigen ist allerdings neben der Aktivierung und der darauf folgenden Proliferation von TH<sub>0</sub>-Zellen auch deren Differenzierung zu einer TH<sub>1</sub>- bzw. TH<sub>2</sub>-Zelle unbedingt notwendig. Diese Differenzierung geschieht unter dem Einfluss von Zytokinen, die von den APC's sezerniert werden. So differenzieren sich TH<sub>0</sub>-Zellen unter dem Einfluss von IL-12 und IFN- $\gamma$  zu TH<sub>1</sub>-Zellen (Hsieh, 1993) und unter dem Einfluss von IL-4 und besonders IL-6 zu TH<sub>2</sub>-Zellen (Scott, 1993). Das bedeutet, dass die APC durch das von ihr sezernierte Zytokinprofil ganz wesentlichen Einfluss auf den Fortgang der Immunantwort hat. Im Fall der allergischen Sensibilisierungsreaktion differenzieren sich allergenspezifische TH<sub>0</sub>-Zellen präferenziell zu TH<sub>2</sub>-Zellen, die durch die Freisetzung der Zytokine IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 die allergische Entzündungsreaktion steuern (Collins, 1995; O'Hehir, 1991). Unter dem Einfluss von IL-4 führen aktivierte allergenspezifische B-Zellen einen Klassenswitch von IgM zu IgE (in der Maus auch zu IgG<sub>1</sub>) durch und bewirken damit den Aufbau einer allergenspezifischen humoralen Immunität (Yoshimoto, 1995). Diese verursacht bei nochmaligem Allergenkontakt im Falle eines allergischen Asthmas durch Mastzelldegranulation eine lang anhaltende Bronchokonstriktion, die sich physiologisch in einer Verminderung des expiratorischen Atemflusses widerspiegelt (Anderson, 1992).

Im Mausmodell konnte nach systemischer Applikation eines TLR-3- bzw. eines TLR-7-Liagnden weder die eine allergische Sensibilisierungsreaktion durch den Nachweis allergenspezifischer Antikörper vom Typ IgE bzw. IgG<sub>1</sub> noch eine allergische Entzündungsreaktion in der Lunge festgestellt werden. Daneben ließen sich in PL-Flüssigkeit nach i.p. Injektion von Poly (I:C) wie auch von R-848 hohe Konzentrationen an IL-10, IL-12 und IFN- $\gamma$  nachweisen.

Dieses Zytokinprofil lässt sich auf die Produktion durch Makrophagen, die sich in großer Anzahl in der Peritonealhöhle befinden zurückführen, da diese sowohl TLR-3 als auch TLR-7 in hoher Dichte auf der Zelloberfläche exprimieren und somit als Zielzellen für diese Liganden prädestiniert sind (Miettinen M, 2001). Diese Ergebnisse decken sich dabei mit Studien, die in *in-vitro* die Produktion von IL-12 und IFN- $\gamma$  durch sowohl Makrophagen als auch DCs in Reaktion auf R-848 wie auch auf poly (I:C) demonstrieren konnten (Lore, 2003; Thomson, 2004; Lee, 2004). Die Produktion von IL-10 durch APC ist bisher zwar nicht in Reaktion auf TLR-3- bzw. TLR-7-Aktivierung beschrieben, allerdings konnte diese für Aktivierung von Monozyten durch den TLR-2-Liganden LPS beobachtet werden (Thoma-Uszynski, 2000).

Diese Zytokine können zweierlei verschiedene Effekte auf die Sensibilisierungsreaktion und damit die Differenzierung allergenspezifischer TH<sub>2</sub>-Zellen entfalten. Für das IL-10 sind zumeist anti-inflammatorische Effekte beschrieben. Zum einen stellt IL-10 einen hoch-potenten Inhibitor der adaptiven T-Zell-vermittelten Immunantwort dar (Moore, 2001), zum anderen konnte gezeigt werden, dass IL-10 die Reaktion des angeborenen Immunsystems auf viele mikrobielle Stimuli, wie auch TLR-Liganden, dämpft (Yamamoto, 2004). Letzteres ist vor allem deshalb interessant, da TLR-Liganden die stärksten Aktivatoren der angeborenen Immunabwehr darstellen. Die Produktion von IL-10 wird auch bei viralen Infektionen beobachtet. Allerdings ist über die Rolle dieses Zytokins in diesem Zusammenhang bisher nichts bekannt (Vicari, 2004). Somit kann das Unterbleiben der allergischen Sensibilisierungsreaktion durchaus auf die anti-inflammatorische Wirkung des von Peritoneal-Makrophagen sezernierten IL-10's zurückzuführen sein, die die Proliferation und Aktivierung antigen-spezifischer T-Zellen unterbindet. Ohne diese fehlt ferner der Kontakt, den die antigen-spezifische B-Zelle für ihre Aktivierung benötigt (Parker, 1993) bzw. es fehlen die von der TH<sub>2</sub>-Zelle gebildeten Zytokine, die in antigen-spezifischen B-Zellen einen Klassenswitch hin zur IgE- bzw. IgG<sub>1</sub>-Produktion bewirken. Damit würde dann unter dem anti-inflammatorischen Einfluss von IL-10 keine Sensibilisierungsreaktion geschehen, die die Voraussetzungen für die lokale allergische Entzündungsreaktion in der Lunge nach lokalem Antigen-Kontakt schafft. In Tieren, die eine systemische Applikation von poly (I:C) bzw. R-848 erhalten hatte, war letztere auch nicht zu beobachten: weder fand eine allergische



Atemwegsentzündung einhergehend mit einer Becherzellhyperplasie statt, noch entwickelten diese Tiere eine Atemwegshyperreagibilität.

Die TLR-3- bzw. TLR-7-Aktivierung haben unterschiedlich immun-modulierende Wirkungen auf die sekundäre allergische Entzündungsreaktion

Neben einem anti-inflammatorischen Effekt von IL-10, könnten die beobachteten Effekte auch auf die Produktion von IL-12 bzw. IFN- $\gamma$  durch Peritoneal-Makrophagen als Reaktion auf die TLR-3- bzw. TLR-7-Liganden sein. Wie bereits beschrieben dirigieren beide Zytokine die Differenzierung von TH<sub>0</sub>-Zellen zu TH<sub>1</sub>-Zellen (Hsieh, 1993). Somit ist es durchaus möglich, dass durch die i.p. Injektion von OVA und Alum unter dem Einfluss des hier vorherrschenden Zytokinmilieus eine OVA-spezifische TH<sub>1</sub>-Antwort induziert wird. Unterstützt wird diese These zumindest für die Applikation von R-848, da in diesem Fall eine vermehrte Produktion OVA-spezifischer Antikörper der Klasse IgG<sub>2a</sub> zu verzeichnen war. Ein Klassenswitch hin zur IgG<sub>2a</sub>-Produktion wird von antigen-spezifischen, aktivierten B-Zellen nur unter dem Einfluss von IFN- $\gamma$ , das zumeist von TH<sub>1</sub>-Zellen und unter Umständen auch von APC's gebildet wird, durchgeführt (Lorenz, 1995). Da ohne die Aktivierung durch antigen-spezifische T-Zellen und die zuvor erwähnten Zytokine, antigen-spezifische B-Zellen durch Apoptose zugrunde gehen würden (Goodnow, 1995), deutet das Vorhandensein OVA-spezifischer IgG<sub>2a</sub> auf die Induktion einer OVA-spezifischen TH<sub>1</sub>-Antwort hin.

Eine wiederholte Provokation OVA-sensibilisierter Tiere induziert eine sekundäre Immunantwort. Diese unterscheidet sich von einer primären Immunantwort vor allem durch die erhöhte Produktion OVA-spezifischer Antikörper und eine kürzere Reaktionszeit des Immunsystems. Diese Unterschiede sind nur deshalb möglich, da nach dem Rückgang der primären Immunantwort, sowohl OVA-spezifische B- als auch T-Zellen überleben und als sogenannte Memory-Zellen Teil des „Immunologischen Gedächtnisses“ werden. Diese Zellen verbleiben in den peripheren lymphatischen Organen, wie zum Beispiel den regionalen Lymphknoten oder den bronchien-assoziierten lymphatischen Geweben. Bei erneutem Allergenkontakt findet eine klonale Selektion allergen-spezifischer Lymphozyten zwar statt, allerdings werden die bereits vorhandenen allergen-

spezifischen Gedächtniszellen früher aktiviert und beginnen mit der klonalen Expansion, die in einer im Vergleich zur Primärantwort schnelleren Abwehrreaktion resultiert (Mandell, 2000). Ein weiterer Unterschied sind die bereits vorhandenen allergen-spezifischen Immunglobuline der Klassen IgE und IgG<sub>1</sub>. Während letztere in hohen Titern über einen langen Zeitraum in Blut und Lymphe zirkulieren, sind allergen-spezifische IgE zumeist an die hochaffinen Fc<sub>ε</sub>-Rezeptoren auf der Mastzelloberfläche gebunden. Neben der Bildung eines OVA-spezifischen Gedächtnisses hat die primäre Immunantwort beim allergischen Asthma jedoch auch lokale Folgen, denn die Atemwege wurden durch die Freisetzung zytotoxischer Mediatoren durch eosinophile Granulozyten geschädigt, was ferner mit einer erhöhten Atemwegsreagibilität assoziiert ist. Im Mausmodell wurde aus diesem Grund solange mit der erneuten Allergenprovokation gewartet, bis sich die Tiere erholt hatten und eine Atemwegshyperreagibilität nicht mehr vorhanden war. Dies ist im verwendeten Tiermodell nach etwa 10-12 Tagen der Fall.

Die TLR-3- bzw. TLR-7-Aktivierung supprimiert die sekundäre allergische Entzündungsreaktion in der Lunge

Die Induktion einer sekundären Immunantwort unterliegt allerdings trotz der oben erwähnten Unterschiede zur primären Immunantwort denselben Mechanismen. So wird auch hier das Allergen, in diesem Fall inhaliert, von mukosa-ständigen APC`s aufgenommen, prozessiert und in den regionalen Lymphknoten bzw. lymphatischen Geweben allergen-spezifischen Gedächtniszellen präsentiert, was letztlich in der Induktion der bronchialen Entzündungsreaktion mündet. Also stehen auch in diesem Fall APC`s an einer entscheidenden regulierenden Stelle, da sie auch hier mit dem von ihnen während der Antigenpräsentation sezernierten Zytokinprofil die Effektorfunktion der TH-Zellen reguliert (Bradley, 2000). In der vorliegenden Arbeit sollte weiterhin der Effekt viraler TLR-Liganden auf die sekundäre allergische Immunantwort im Tiermodell untersucht werden. Zunächst wurden zu diesem Zweck Milzzellkulturen OVA-sensibilisierter Tiere mit dem Allergen alleine oder mit dem Allergen in Verbindung mit dem jeweiligen TLR-3- bzw. TLR-7-Liganden restimuliert. Während die Allergenrestimulation die Produktion der klassischen TH<sub>2</sub>-Zytokine IL-2, IL-4 und IL-5 induzierte, waren

diese bei Zugabe des jeweiligen TLR-Liganden kaum noch nachzuweisen. Wie auch für die Zytokinproduktion in der Peritoneallavage beschrieben, konnten hohe Konzentrationen an IL-10, IL-12 und IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden.

Im Mausmodell hatte die Applikation der TLR-3 bzw. TLR-7-Liganden während der Allergenrechallenge eine deutlichen Verringerung der erneut induzierten Atemwegsentzündung zur Folge, die auch mit einer minimal erhöhten Anzahl an Becherzellen im Atemwegsepithel einherging. In beiden Fällen wurde keine AHR beobachtet. Diese Effekte können, wie schon für die allergische Sensibilisierungsreaktion in den unterschiedlichen Effekten zweier Zytokine begründet sein: zum einen in der Induktion einer gegenregulatorischen allergenspezifischen TH<sub>1</sub>-Antwort, wie sie für den TLR-7-Liganden Resiquimod beschrieben wurde (Quarcoo, 2004), zum anderen in der anti-inflammatorischen Wirkung des IL-10, das in der Zellkultur in sehr hohen Konzentrationen vorhanden war. Eine Verminderung der allergischen Atemwegsentzündung und der allergen-spezifischen TH<sub>2</sub>-Antwort, erkennbar an den deutliche verminderten IL-5-Konzentrationen in der BAL, wäre mit der Wirkung beider Zytokine in Verbindung zu bringen. Im Gegensatz zur Applikation von poly (I:C) und R-848 während der Sensibilisierungsphase konnten in diesem Fall die Produktion OVA-spezifischer IgE bzw. IgG<sub>1</sub> nachgewiesen werden. Diese setzen die Anwesenheit regulierender TH<sub>2</sub>-Zytokine wie IL-4 voraus. Allerdings sind die Serumtiter dieser Immunglobuline im Vergleich zur OVA-Gruppe signifikant reduziert. Erklärbar ist diese Beobachtung dadurch, dass die Produktion dieser Immunglobuline bereits vor der Applikation der TLR-Liganden stattgefunden hat und das nur die erneute Produktion der allergen-spezifischen Immunglobuline unterbunden wurde. In der OVA-Gruppe fand diese jedoch statt, sodass sich durch Addition der beiden Ig-Produktionen ein erhöhter Spiegel an OVA-spezifischen Immunglobulinen nachweisen lässt. Die Addition ist dabei möglich, da die Halbwertszeit des IgG<sub>1</sub> im Blut im Vergleich zu den übrigen Immunglobulinklassen relativ lang ist und die erneute Allergenprovokation bereits kurze Zeit nach der primären Immunantwort stattgefunden hat (Pollack, 1968). Im Gegensatz dazu ließ sich eine erhöhte Produktion OVA-spezifischer IgG<sub>2a</sub> nachweisen, was wiederum auf eine humorale B-Zellantwort hindeutet, die unter dem Einfluss allergen-spezifischer TH<sub>1</sub>-Zellen steht. Im Vergleich zu den Titern an allergen-spezifischem IgE bzw. IgG<sub>1</sub> sind die

Titer an IgG<sub>2a</sub> jedoch relativ niedrig. Dies ist durch die Kürze der Zeit erklärbar, die zwischen Applikation der viralen TLR-Liganden und der Analyse der Tiere verstrichen ist. Zwar sind eindeutig Hinweise auf eine TH<sub>1</sub>-Antwort vorhanden, jedoch im Vergleich zur TH<sub>2</sub>-Antwort in geringerem Ausmaß. Schließlich konnten in der BAL oder im Bronchialgewebe keine infiltrierenden neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden, wie sie für die TH<sub>1</sub>-gesteuerte Immunantwort, die sich typischerweise gegen Bakterien richtet, charakteristisch sind (Mims, 1987). Also zeigte sich in diesen Tieren keine typische TH<sub>1</sub>-Pathologie, so dass möglicherweise eine neu beschriebene Unterart der regulatorischen T-Zellen, die sog. TH<sub>1</sub>-regulatorischen T-Zellen, für die beobachteten suppressiven Effekte verantwortlich sein könnten. Die Differenzierung zu TH<sub>1</sub>-regulatorische T-Zellen verläuft nur in Anwesenheit von IL-10 und IL-12. Weiterhin produzieren diese Zellen IL-10 und IFN- $\gamma$  und können damit sowohl eine allergische Atemwegsentzündung als auch eine AHR supprimieren (Stock, 2004). Die Produktion von IFN- $\gamma$  könnte zusätzlich eine Rolle bei der Induktion allergen-spezifischer IgG<sub>2a</sub> spielen.

Interleukin 12 (IL-12) ist an der Mediation des supprimierenden Effekts viraler TLR-Liganden auf das experimentelle Asthma beteiligt

Um weiter zu untersuchen, auf welchen pathogenetischen Mechanismen die beobachtete Effekte der viralen TLR-Liganden auf die allergische Entzündungsreaktion beruht, wurde dasselbe Protokoll in IL-12 defizienten Tieren durchgeführt. Die Produktion von IL-12 wurde sowohl in der Zellkultur wie auch in der Peritoneallavage in Reaktion auf die Zugabe viraler TLR-Liganden beobachtet werden. Zudem konnte die Produktion von IFN- $\gamma$  als auch von allergen-spezifischen IgG<sub>2a</sub> in Reaktion auf die viralen TLR-Liganden beobachtet werden, was auf die Induktion einer OVA-spezifischen TH<sub>1</sub>-Antwort hindeutet. Dies setzt wiederum die Anwesenheit von IL-12 bei der Aktivierung antigen-spezifischer TH<sub>0</sub>-Zellen voraus (Macatonia, 1995). Die verwendeten Tiere können aufgrund eines genetischen Defekts die bioaktive Form gerade dieses Zytokins nicht herstellen. Der Defekt liegt dabei in der Expression der p35-Komponente des bioaktiven IL-12. IL-12 ist ein heterodimeres Zytokin von 70 kDa Größe, das aus

zwei kovalent gebundenen Untereinheiten, einer 35 kDa schweren p35- und einer 40 kDa schweren p40-Untereinheit besteht (Kobayashi, 1989).

Im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren konnte in diesen Tieren kein reduzierender Effekt auf die Pathologie des experimentellen Asthmas festgestellt werden. So war die allergische Atemwegsentzündung vom selben Umfang wie in der OVA-Gruppe. Auch hier ließ sich eine Becherzellhyperplasie und eine erhöhte Atemwegsreagibilität erkennen. Durch die Wegfall des IL-12 hatten also die viralen TLR-Liganden nicht den im Wildtyp beobachtete Effekt, was darauf hindeutet, dass IL-12 für diese Effekte notwendig ist. Es könnte ferner bedeuten, dass zwar IL-10 in großen Mengen in Reaktion auf den Kontakt mit viralen TLR-3- bzw. TLR-7-Liganden gebildet wird, dieses aber nicht zwingend notwendig ist. In diesem Fall wären allerdings weitere Untersuchungen nötig, um die Rolle von IL-10 in diesem Zusammenhang eingehend zu untersuchen, so z.B. die Durchführung der tierexperimentellen Protokolle an IL-10 defizienten BALB/c-Mäusen oder die Applikation von  $\alpha$ -IL-10-Antikörpern zur spezifischen Elimination dieses Zytokins.

In IL-12p35 defizienten Tieren hatte die systemische Applikation von sowohl R-848 als auch von poly (I:C) nahezu keinen reduzierenden Effekt auf das experimentelle Asthma, wie er im Wildtyp beobachtet wurde, allerdings waren die Serumtiter an OVA-spezifischem IgE auch in diesen Tieren reduziert. Interessanterweise ließ sich weiterhin eine Reduktion der Infiltration eosinophiler Granulozyten in das broncho-alveoläre Lumen verzeichnen. Diese Effekte könnten, wie bereits erwähnt, aus der Produktion hoher Mengen an IL-10 in Reaktion auf virale TLR-Liganden resultieren. Es wäre aber auch möglich, dass ein weiteres Zytokin für diese Effekte verantwortlich ist, nämlich IL-23.

Wie beschrieben, wurden für die Untersuchung der Rolle von IL-12 bei der Immunreaktion auf virale TLR-Liganden IL-12p35 defiziente Tiere verwendet, die kein bioaktives IL-12 besitzen. Allerdings ist nur die Expression der p35-Untereinheit gestört. Die Expression der p35- und p40-Gene ist unabhängig voneinander reguliert. Die Expression der p35-Untereinheit ist streng reguliert und benötigt die Co-Expression der p40-Untereinheit durch dieselbe Zelle (Wolf, 1991). Dagegen ist die Expression weitaus weniger streng reguliert so dass die p40-Untereinheit in deutlich größeren Mengen exprimiert wird als nur für die Bildung des IL-12p70 Heterodimers benötigt wird (Trinchieri, 1992). Die p40-

Untereinheit kann zum einen Homodimere bilden, die in freier Form als natürliche Inhibitoren der IL-12-Produktion fungieren (Gillesen, 1995), zum anderen bildet es mit einer p19-Untereinheit das Heterodimer IL-23 (Oppmann, 2000). Dieses Zytokin gehört zur IL-12-Familie und hat ähnliche Effekte auf Makrophagen, dendritische Zellen oder T-Zellen, wie sie für IL-12 beschrieben sind (Stober, 2001; O`Garra, 2000). Da die Expression der IL-12p40-Untereinheit nicht gestört ist und IL-12p40 sowohl in der BAL wie auch in der Peritoneallavage-Flüssigkeit nachweisbar ist (Daten nicht gezeigt), könnte auch IL-23 eine Rolle innerhalb der Immunantwort auf virale TLR-Liganden spielen, zumal bekannt ist, dass eine virale Infektion Makrophagen zur Produktion dieses Zytokins veranlasst (Pirhonen, 2002). Um diese These zu festigen sind allerdings weitere Studien nötig, die in demselben Zusammenhang Experimente mit IL-12p40 defizienten Tieren beinhalten würden, die weder IL-12 noch IL-23 produzieren können. Im Vergleich zu den Daten, die aus den Studien mit den IL-12p35 defizienten Tieren stammen, könnten dann Rückschlüsse auf die Rolle von IL-23 in diesem Zusammenhang gezogen werden.

Vorerst abschließend lässt sich feststellen, dass die systemische Applikation synthetischer TLR-3- bzw. TLR-7-Liganden weder die allergische Sensibilisierung ermöglicht noch unterstützt, sondern dieser sogar entgegenwirkt. Weiterhin hat die systemische Applikation von poly (I:C) oder R-848 keine Exazerbation des experimentellen Asthmas zur Folge, sondern führt sogar zu einer Reduktion des asthmatischen Phänotyps im Tier. Man kann hier also von einer Immun-Modulation der TH<sub>2</sub>-Antwort durch die viralen TLR-Liganden sprechen. Dabei lassen viele Effekte auf eine Mediation von IL-12 und damit auf die Induktion einer gegenregulatorischen TH<sub>1</sub>-Antwort schließen, wobei jedoch auch andere Zytokine beteiligt sein können. Zusammenfassend ist also das systemische Vorkommen viraler TLR weder ein Risikofaktor noch ein Triggerfaktor für die Entwicklung bzw. Exazerbation des allergischen Asthmas.

Eine chronische Allergenexposition induziert eine chronische Atemwegsentzündung in der sensibilisierten BALB/c-Maus

Für die Untersuchung der Rolle verschiedener Faktoren, wie dem ständigen Influx eosinophiler Granulozyten während einer chronischen Atemwegsentzündung, auf

die Pathologie des chronischen Asthma bronchiale, wurde ein Tiermodell entwickelt, das den humanen Phänotyp des allergischen Asthmas so nah wie möglich wiederzugeben im Stande ist. Ausgehend von der Situation im Menschen, der je nach Art des Allergens ständig oder saisonal einer Inhalation des Allergens oder der Allergene exponiert ist, wurde das bisher verwendete Tiermodell für eine akute allergische Atemwegsentzündung modifiziert. Statt einer kurzzeitigen Allergenprovokation wurde eine intervallartige Langzeitprovokation verwendet, um eine chronische Atemwegsentzündung zu induzieren.

Die fortwährende Allergenprovokation über einen Zeitraum von 12 Wochen induzierte eine Atemwegsentzündung, die sich deutlich von der akuten Entzündungssituation unterscheidet und das gesamte Bronchialsystem betrifft, in Verbindung mit einer profunden Atemwegshyperreagibilität und verschiedenen strukturellen Veränderungen der Atemwege, wie einer Becherzellhyperplasie, einer vermehrten Einlagerung kollagener Fasern in die *Lamina propria*, sowie einem vermehrten Auftreten von Fibroblasten und Myofibroblasten in der Atemwegswand. Die strukturellen Veränderungen der Atemwegswand gehen dabei einher mit massiv erhöhten Konzentrationen von TGF- $\beta$ . Zusammengenommen zeigen diese Veränderungen der allergischen Atemwegsentzündung und des *Airway remodellings* große Ähnlichkeit mit dem im atopischen Patienten beobachteten Asthma-Phänotyp (Roche, 1989).

Das Entzündungsbild nach zwölf-wöchiger Allergenexposition unterscheidet sich deutlich von der akuten Entzündungssituation nach Kurzzeitallergenexposition. So zeigte sich nicht nur eine Progression der Entzündung nach weiter distal, sondern auch eine Verschiebung der Anteile der Leukozytensubpopulationen innerhalb des Infiltrats. In der chronischen Entzündung dominierten nun nicht mehr eosinophile Granulozyten, wie in der akuten Entzündung, sondern Lymphozyten. Weitere Untersuchungen zeigten, dass gerade Lymphozyten über einen Zeitraum von über sechs Wochen nach der letzten Allergenprovokation noch in der Atemwegsmukosa persistierten. Bislang sind diese Veränderungen der Atemwegsentzündung noch nicht im Tiermodell beschrieben, allerdings lassen sich beim Asthma-Patienten ebenfalls Lymphozyten in allen Abschnitten der Atemwege nachweisen, obwohl die letzte Allergenprovokation lange zurückliegt (Larche, 2003). Es wäre also möglich, dass gerade diese Lymphozyten, die

größtenteils zu den CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen gehören, zur Aufrechterhaltung einer chronischen Atemwegsentzündung beitragen. Während sich das Verteilungsbild der Oberflächenmarker CD3, CD4 und CD8 nicht von Lymphozyten der akuten Atemwegsentzündung unterschied, zeigte die Genexpressionsanalyse eine Reihe von Genen, die bei Lymphozyten der chronischen Entzündung deutlich höher exprimiert werden. Viele dieser Gene sind bislang nicht im Zusammenhang mit Lymphozyten bzw. mit allergischen Erkrankungen beschrieben und eine ganze Reihe ist noch vollständig unbekannt. Gerade diese Genprodukte könnten aber Zielgene für eine therapeutische Intervention bilden. Allerdings sind dazu noch weitere umfangreiche Untersuchungen nötig, die diese Gene eindeutig charakterisieren und innerhalb des zeitlichen Rahmens dieser Arbeit nicht mehr durchzuführen waren.

Mit der zunehmenden Infiltration von Lymphozyten in das Atemwegsgewebe zeigte sich jedoch auch eine deutliche Abnahme der Infiltration eosinophiler Granulozyten. Möglicherweise ist dies auf die Entwicklung einer Toleranz gegenüber der chronischen Allergenprovokation zurückzuführen. Eine solche Toleranzentwicklung ist bereits in vielen Tiermodellen beschrieben worden und stellt ein Problem bei der Entwicklung geeigneter Tiermodelle für das chronische Asthma dar (Epstein, 2004). Ein Teil dieses veränderten Entzündungsverhaltens könnte mit den stark erhöhten Konzentrationen an TGF- $\beta$  in der BAL zu erklären sein (Zhang, 1999), allerdings steht dies im Gegensatz zu gesteigerter Infiltration von Lymphozyten in das Atemwegsgewebe.

Ferner konnte bereits gezeigt werden, dass eine wiederholte Allergenprovokation sowohl in einer Schleimhautverdickung wie auch in einer vermehrten Ablagerung kollagener Fasern in der Submukosa der Trachea sowie der proximalen Atemwegsabschnitte resultieren kann (Temelkovski, 1998). Allerdings konnten diese strukturellen Veränderungen bisher nicht in den distalen Abschnitten des Bronchialsystems gezeigt werden (Blyth, 1996; Henderson, 2002; Tanaka, 2001). In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass strukturelle Veränderungen, bedingt durch eine fortwährende Allergenprovokation und damit durch eine chronische Atemwegsentzündung, selbst in den Atemwegsabschnitten auftreten, die direkt in das gasaustauschende Lungenparenchym übergehen.



Die chronische Atemwegsentzündung ist mit strukturellen Veränderungen der Atemwege assoziiert

Allgemein besteht die These, dass die Initiation und Progression fibrotischer Umbauprozesse abhängig ist von der Expression verschiedener Mediatoren, die die Funktion residenter Zellen des Atemwegssystems verändern können. Bei asthmatischen Patienten führt die Exposition gegenüber dem jeweiligen Allergen zu einer TH<sub>2</sub>-gesteuerten Atemwegsentzündung, die durch die Expression der Zytokine IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 charakterisiert ist. Im Falle einer chronisch-allergischen Atemwegsentzündung wird meist noch TGF- $\beta$  beobachtet, das sowohl von infiltrierenden Leukozyten (Wenzel, 1999) wie auch von residenten Zellen der Lunge produziert wird (Renauld, 2001). TGF- $\beta$  scheint dabei vor allem mit der Entwicklung und Aufrechterhaltung fibrotischer Umbauprozesse in Verbindung zu stehen. So resultiert die *in-vitro* Stimulation von Fibroblasten aus der Bronchialwand von Asthma-Patienten mit TGF- $\beta$  in einer Transformation zu Myofibroblasten, die durch die Expression von  $\alpha$ -SMA und Pro-Kollagen charakterisiert sind (Hashimoto, 2001; Richter, 2001). Die gesteigerte Expression gerade dieses Zytokins ist charakteristisch für die chronische Entzündungssituation des Asthma bronchiale (Ohno, 1996; Minshall, 1997). Die wiederholte Allergenexposition gemäß des in dieser Arbeit verwendeten Protokolls induzierte nicht nur eine Vermehrung der mukosa-ständigen Myofibroblasten und Fibroblasten, sondern auch die vermehrte Produktion und Ablagerung kollagener Fasern in der *Lamina propria* der Atemwegswand, jeweils assoziiert mit massiv erhöhten Konzentrationen von TGF- $\beta$  in der BAL. Sowohl aktivierte Fibroblasten wie auch Myofibroblasten sind in der Lage unter dem Einfluss von TGF- $\beta$ , das in diesen Zellen die Synthese und Sekretion von Prokollagen induziert, in der Submukosa der Atemwege einen massiven fibrotischen Umbau zu bewerkstelligen (Zhang, 1999).

Die Schädigung und die darauf folgende strukturelle Veränderung der Atemwegsarchitektur ist sowohl für das allergische Asthma wie auch für andere chronische Lungenerkrankungen, wie die chronische Bronchitis, beschrieben (Knight, 2001). Während eosinophile Granulozyten und ihre Produkte als mögliche Ursache für die beobachteten Zerstörung bronchialer Strukturen

diskutiert werden, herrscht über die Mechanismen, aufgrund derer im Rahmen einer Wundheilung der Ersatz der zerstörten Strukturen von statten geht, noch Unklarheit (Thompson, 1995). Zurzeit werden insbesondere Atemwegsepithelzellen und Fibroblasten als Zellen diskutiert, die zentral an der „Wundheilung“ im Rahmen des Airway remodellings beteiligt sind. Neben ihrer Funktion als physikalische und funktionelle Grenze gegenüber externen Noxen reguliert das Bronchialepithel eine ganze Bandbreite an biologischen Reaktionen, die neben dem Schutz gegen chemische und mikrobiologische Verletzungen auch die Modulation von Reparaturprozessen beinhalten. Zu diesen zählt dabei sowohl die Sekretion extrazellulärer Matrix-Proteine wie auch die Interaktion mit weiteren am Reparaturprozess beteiligten Zellen, vor allem mit den Fibroblasten (Robins, 1997). Während eines chronisch-entzündlichen Prozesses innerhalb der Atemwege, wie er beim allergischen Asthma vorkommt, werden Bronchialepithelzellen massiv geschädigt, was nicht nur zu einer Ablösung ganzer Teile des Bronchialepithels (Laitinen, 1985), dem „epithelial shedding“, sondern auch zu einer Aktivierung der überlebenden Bronchialepithelzellen und der darunter liegenden Fibroblasten führt (Knight, 2001). Neben der Sekretion extrazellulärer Matrix, reagieren diese aktivierten Zellen auch mit der Freisetzung verschiedener Zytokine und Chemokine, die zur Regulation des Wundheilungsprozesses beitragen. Die Sekretion extrazellulärer Matrix sorgt dabei zunächst für einen provisorischen Abschluss des geschädigten Bronchialgewebes (Devalia, 1993). Die Sekretion von Kollagen Typ IV und Laminin durch Fibroblasten und Bronchialepithelzellen stellt also den ersten Schritt des Wundheilungsprozesses dar (Shoji, 1990; McGowan, 1992). Wie bereits erwähnt spielen dabei Zytokine wie IL-1 $\beta$ , PDGF und vor allem das im Mausmodell in hohen Konzentrationen vorgefundene TGF- $\beta$  eine bedeutende regulierende Rolle (Roche, 1989), die sowohl die Chemotaxis als auch die Aktivierung von Fibroblasten umfasst (Martined, 1996). Neuerdings wird in diesem Zusammenhang auch der Nerve growth factor (NGF) diskutiert, der ebenfalls in sehr hohen Konzentration in der BAL chronisch exponierter Tiere nachweisbar war (Daten nicht gezeigt) (Micera, 2001).

Im Rahmen der Wiederherstellung des geschädigten Gewebes als zweiter Schritt des Wundheilungsprozesses migrieren nun weitere mesenchymale Zellen,

Fibroblasten und Myofibroblasten zu den geschädigten Arealen und beginnen zu proliferieren, was bei Asthmapatienten in einer Verdickung der Atemwegswand resultiert (Dunhill, 1960).

Während die Rolle von Fibroblasten, wie sie sowohl im hier etablierten Mausmodell für das Asthma bronchiale wie auch im Asthmapatienten in großer Anzahl in der Bronchialwand auftreten, im Rahmen des Remodellingprozesses z.T. verstanden ist, bleibt die Funktion der Myofibroblasten weitgehend ungeklärt (Shore, 2004).

Rein phänotypisch lassen sich diese Zellen als eine Zwischenstufe von Fibroblasten und Myozyten beschreiben, die Aktin-Filamente enthalten, kontraktile sind und sich unter bestimmten Umständen zu Zellen differenzieren können, die sich äußerlich nicht mehr von Myozyten unterscheiden (Schmidt, 2003). Weiterhin ist bekannt, dass Myofibroblasten ähnlich wie Fibroblasten Komponenten der extrazellulären Matrix sezernieren können und damit zur subepithelialen Fibrose beitragen können, wie sie sowohl im Asthmapatienten als auch im hier etablierten Tiermodell zu beobachten ist (Vignola, 2000; Holgate, 2000). Ferner steigt kurze Zeit nach einer Allergenprovokation die Anzahl an Myofibroblasten in der Bronchialwand an (Gizycki, 1997). Darüber hinaus wird diskutiert, ob diese Zellen vielleicht sogar an der Regulation der chronischen Atemwegsentzündung beteiligt sind, da sie sowohl mit TH<sub>1</sub>- als auch mit TH<sub>2</sub>-Zellen interagieren und damit die chemoattraktive Aktivität für eosinophile Granulozyten und Makrophagen modulieren können (Teran, 1999). Ihre eigene Aktivität wird dabei vor allem durch TGF- $\beta$  reguliert (Zhang, 1999).

Klinische Studien berichten von einer Kompartimentalisierung der TGF- $\beta$  -Produktion nach der Allergenprovokation (Magnan, 1997). Während nicht atopische Kontrollpersonen vor allem eine TGF- $\beta$ -Produktion durch das Atemwegsepithel aufweisen, konnte diese in Asthma-Patienten nicht im Epithel, sondern in infiltrierenden Leukozyten beobachtet werden. Im Mausmodell ist die Quelle der hohen TGF- $\beta$ -Konzentrationen nicht eindeutig charakterisiert. So konnte in OVA-sensibilisierten und allergenprovozierten Tieren zum einen TGF- $\beta$  im Epithel zum anderen in eosinophilen Granulozyten nachgewiesen werden (Flood-Page, 2003; McMillan, 2004). Demnach ist es durchaus möglich, dass das Atemwegsepithel normalerweise TGF- $\beta$ , das neben einer profibrotischen auch

eine anti-inflammatorische Wirkung aufweist, produziert, um eine unangemessen Immunantwort auf die Inhalation eines harmlosen Allergens zu limitieren und damit die pulmonale Homeostase wieder herzustellen.

Untersuchungen an Tieren, die die TH<sub>2</sub>-typischen Zytokine IL-4, IL-5, IL-9, IL-11 und IL-13 überexprimieren, konnten jeweils zeigen, dass diese Zytokine nicht nur an der Regulation der akuten allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge sondern auch an der Induktion fibrotischer Umbauprozesse in der Atemwegswand beteiligt sind (Rankin, 1996; Lee, 1997; Temann, 1998; Zhu, 1999; Tang, 1996). Somit kann der durch die fortwährende Allergenexposition bedingte Entzündungsreiz die ständige Sekretion dieser Zytokine und somit die Initiation struktureller Veränderungen der Atemwegswand hervorrufen. McMillan et al. konnten in einem Maus-Modell für das chronische Asthma die unter ständiger Allergenexposition steigenden BAL-Konzentrationen an IL-4 und IL-5 mit zunehmender Fibroisierung der Bronchialwand korrelieren (McMillan, 2004). Andere Modelle für chronisches Asthma berichten allerdings von einer immunsuppressiven Wirkung durch die fortwährende Allergenprovokation, die zu einer deutlichen Verringerung der allergen-spezifischen TH<sub>2</sub>-Antwort und der dazugehörigen Zytokinproduktion führen, so dass der Einfluss der TH<sub>2</sub>-Zytokine auf die Ablagerung von kollagenen Fasern in der Atemwegswand bislang nicht vollständig aufgeklärt ist. In der vorliegenden Studie konnte mit andauernder Allergenprovokation ebenfalls eine Verringerung der leukozytären Infiltration in das broncho-alveoläre Lumen und damit auch eine deutliche Verringerung der TH<sub>2</sub>-Zytokin-Konzentrationen in der BAL beobachtet werden. Allerdings fand gleichzeitig eine Progression der allergischen Entzündung des Atemwegsgewebes statt. Es wäre durchaus möglich, dass hier eine fortwährende Sekretion von TH<sub>2</sub>-Zytokinen vonstatten geht, die zwar aufgrund einer Schleimhautverdickung und erhöhten Mukusproduktion nicht in der BAL nachzuweisen sind, jedoch trotzdem ihre Wirkung direkt im Atemwegsgewebe entfalten können. Um diese These zu stützen wären allerdings weitergehende, vor allem immunhistologische Untersuchungen nötig, die im zeitlichen Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr durchführbar waren.

Neben der Induktion fibrotischer Umbauprozesse konnte für die TH<sub>2</sub>-Zytokine IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 jeweils auch die Induktion einer Becherzellhyperplasie belegt werden, wobei allerdings nur IL-9 diese direkt bewirkt (Wills-Karp, 2000; Rose, 2001). Die erhöhte Anzahl an Becherzellen im Atemwegsepithel und die damit einhergehende Mukushypersekretion gehört ebenfalls in den Formenkreis des *Airway remodellings* des allergischen Asthmas (Kumar, 2001; Jeffery, 2001). In Asthma-Patienten ist ihr Vorkommen allerdings auf die intermediären und distalen Atemwege beschränkt, während die Mukusproduktion in den proximalen, knorpelhaltigen Atemwegsabschnitten durch submuköse Drüsen gewährleistet wird (Widdicombe, 1999). Im Vergleich zu gesunden Probanden zeigen Patienten mit moderatem Asthma eine bis zu dreifach, Patienten mit chronischem schweren Asthma eine bis zu 30-fach erhöhte Häufigkeit von Becherzellen im Atemwegsepithel vor allem in weiter distalen Bronchien (Ordonez, 2001; Aikawa, 1992; Shimura, 1996). Da es in weiter distalen Atemwegsabschnitten nicht möglich ist, den gebildeten Mukus durch Abhusten zu entfernen, kommt der gesteigerten Mukusproduktion in diesen Atemwegsbereichen große pathophysiologische Bedeutung zu (Widdicombe, 1999). Im Mausmodell ist die allergen-induzierte Atemwegsentszündung zumeist mit einer Becherzellhyperplasie der proximalen Atemwege assoziiert, allerdings zeigt bisher keine Studie das Vorkommen mukus-produzierender Zellen in distalen Atemwegsabschnitten (Smith, 2001). In der hier vorliegenden Studie war es möglich, durch die fortwährende Allergenprovokation nicht nur die Progression der Atemwegsentszündung, sondern auch der Becherzellhyperplasie, bis in die distalen Atemwege zu induzieren. Dabei ist es durchaus möglich, dass durch die chronische Allergenexposition geringe Mengen an Allergen auch bis in die distalen Atemwege gelangen und eine dort eine Atemwegsentszündung und die damit einhergehenden pathophysiologischen Veränderungen des Atemwegsepithels auslösen können, was nach kurzzeitiger Allergeninhalation aufgrund geringerer Allergenkonzentrationen in diesen Atemwegsabschnitten eben nicht der Fall sein könnte.

Zusammenfassend resultierte die wiederholte Allergenprovokation in einem Airway remodelling, das durch die Beteiligung der distalen Atemwege dem beim humanen Asthma bronchiale beobachteten Phänotyp in einem hohen Maße ähnelt.

Die chronische Atemwegsentzündung und das Airway remodeling sind mit einer Veränderung der Lungenfunktion assoziiert

Die Atemwegshyperreagibilität (AHR) ist das klinisch auffälligste Merkmal des Asthma bronchiale. Eosinophile Granulozyten und deren Mediatoren stehen in Verdacht in die Induktion einer AHR involviert zu sein. Nach 12-wöchiger Allergen-Provokation konnte eine im Vergleich zu Tieren mit akuter allergen-induzierter Atemwegsentzündung eine noch gesteigerte Atemwegsreagibilität gegenüber MCh festgestellt werden. Interessanterweise geht dabei die Steigerung der Atemwegsreagibilität einher mit einer Verringerung der intraluminalen Entzündung. Allerdings nimmt im Verlauf der Studie die Entzündung des Atemwegsgewebes nicht ab, sondern nimmt im Umfang sogar noch zu und betrifft weitere Bereiche des Bronchialsystems. Zwar verringert sich der Anteil eosinophiler Granulozyten innerhalb des allergischen Atemwegsinfiltrats deutlich, jedoch sind über den gesamten Expositionsverlauf stets eosinophile Granulozyten sowohl in der BAL als auch im Gewebe zu beobachten. Eventuell ist gerade die Lokalisation der eosinophilen Granulozyten, die sich in der chronischen Atemwegsentzündung in unmittelbarer Nähe der glatten Atemwegsmuskulatur befinden von Bedeutung. Hinzu kommt die Progression der allergischen Entzündung nach distal, so dass nun auch Atemwegsabschnitte betroffen sind, die zuvor nicht in die Asthmapathogenese involviert waren. Somit könnte die Entzündung die distalen Atemwegsabschnitte kumulativ zu der gesteigerten Atemwegsreagibilität beitragen.

Neben Zellen des allergischen Atemwegsinfiltrats werden auch verschiedene Nervenwachstumsfaktoren wie NGF und die Zellen der glatten Atemwegsmuskulatur mit der Ausbildung einer Atemwegsüberempfindlichkeit in Zusammenhang gebracht (Shore, 2004). In Bronchial-Biopsien von Asthma-Patienten konnte gezeigt werden, dass die glatte Atemwegsmuskulatur sowohl eine Hyperplasie der einzelnen Zellen als auch eine Hypertrophie aufweist. Patienten, die an einer schweren Asthma-Exazerbation verstarben, weisen im Vergleich zu Asthma-Patienten, die durch andere Ursachen zu Tode kamen, eine deutlich verdickte Atemwegsmuskulatur auf (Carroll, 1993). Weiterhin beschreiben einige Studien gewisse Unterschiede zwischen der glatten

Atemwegsmuskulatur eines Asthma-Patienten und der gesunder Individuen. In Bronchialmuskelbiopsien konnte eine erhöhte Expression und eine gesteigerte Aktivität der Myosin-Leichtketten-Kinase bei Asthma-Patienten nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen korrelierten ferner mit einer höheren Kontraktionsgeschwindigkeit bzw. Kontraktionsstärke der glatten Atemwegsmuskulatur, die mit der Ausbildung einer AHR einhergehen könnten (Johnson, 2001). Der genaue Mechanismus der Entstehung bronchialer Hyperreaktivität ist allerdings bisher ungeklärt.

Somit gehören auch Veränderungen der glatten Atemwegsmuskulatur zum Formenkreis des Airway remodellings beim Asthma bronchiale. Solche Veränderungen konnten auch schon in der Ratte in Folge einer chronischen Allergenprovokation gezeigt werden (Salmon, 1999). Allerdings ist es bisher nicht gelungen, Veränderungen der glatten Atemwegsmuskulatur in der Maus zu induzieren. Möglicherweise ist dieser Verhalt auf die Atemwegsanatomie der Maus zurückzuführen, deren intermediären und distalen Atemwegsabschnitte überhaupt keine glatte Muskulatur mehr aufweisen.

Der Ursprung der hinzugekommenen glatten Muskelzellen ist bisher noch nicht geklärt (Shore, 2004). Es ist unter Umständen möglich, dass diese durch Teilung aus den bereits vorhandenen Myocyten der geschädigten Atemwege hervorgehen. Jedoch werden, wie bereits erwähnt in der Bronchialwand von Asthma-Patienten auch kontraktile Myofibroblasten in erhöhter Anzahl festgestellt, nachdem eine Allergenprovokation durchgeführt wurde. Diese Zellen stammen laut Schmidt et al. von im Blut zirkulierenden Fibrozyten ab, die ihren Ursprung in hämatopoetischen Zellen haben (Schmidt, 2003). Somit könnten Myofibroblasten einen Übergangsphänotyp vom Fibrozyt zum Myozyt darstellen, auf den die Hypertrophie der glatten Atemwegsmuskulatur zurückzuführen ist. Damit würde eine erhöhte Anzahl an Myofibroblasten auch mit der Entwicklung einer AHR in Zusammenhang stehen. In dem hier etablierten Modell für das chronische Asthma ist eine erhöhte Anzahl an Myofibrozyten in der Bronchialwand mit einer im Vergleich zur akuten Entzündungssituation deutlich gesteigerten Atemwegsreagibilität assoziiert.

Seit Boulet et al. festgestellt haben, dass das Ausmaß der subepithelialen Fibrose der Bronchien beim allergischen Asthma mit der Atemwegsüberempfindlichkeit

gegenüber unspezifischen Reizen wie MCh korreliert, wird immer wieder über den Einfluss des Airway remodellings auf die Lungenfunktion diskutiert (Boulet, 1997). Allerdings konnte diese Beobachtung bisher nicht bestätigt werden, so dass es über diese Korrelation hinaus keinerlei Hinweise gibt, die einen solchen Zusammenhang erklären könnten (Chetta, 1996). Neben der Entwicklung einer Atemwegsüberempfindlichkeit wird in Asthmapatienten mit zunehmendem Alter auch eine zunehmende Beeinträchtigung der Ruheatmung beobachtet, die in einer persistierenden Atemwegsobstruktion begründet ist (Bai, 2000). Bisher konnten bereits mehrere Studien einen Zusammenhang dieser persistierenden Atemwegsobstruktion mit dem Alter der Patienten, der Dauer und dem Schweregrad der asthmatischen Erkrankung und mit dem Ausmaß des Airway remodellings herstellen (Brown, 1984; Boulet, 1994; Chetta, 1996; Bai, 2000; Bumbacea, 2004). Neben diesem Zusammenhang gibt es allerdings bisher noch keine Erkenntnisse über den zugrundeliegenden Pathomechanismus. Im Mittelpunkt der Diskussionen steht das Airway remodelling, dessen Ausmaß ebenfalls sowohl mit dem Schweregrad wie auch mit der Dauer der Erkrankung korreliert (Bai, 2000). Atemphysiologisch äußert sich eine Atemwegsobstruktion in einer Verringerung der Ein-Sekundenkapazität ( $FEV_1$ ) bzw. in einem gestiegenen Atemwegswiderstand. Geht man davon aus, dass das Bronchialsystem in allen Regionen ungefähr dieselbe Oberflächeneigenschaften aufweist, ist der Kaliber der Atemwege der Hauptparameter, der den Atemwegswiderstand beeinflusst. Bei Verringerung des Atemwegskalibers vergrößert sich gemäß Strömungsmechanik der Widerstand, der einer Strömung innerhalb einer Röhre entgegengebracht wird (Stroppe, 1994). Das würde bedeuten, dass sämtliche Veränderungen der Atemwegswand, die zu einer Verringerung des Atemwegskalibers führen, eine Erhöhung des Atemwegswiderstands zur Folge haben könnten. Beim chronischen Asthma bronchiale kommen verschiedene Einflüsse in Frage, die solche Veränderungen mit sich bringen könnten: die Atemwegsentzündung geht einher mit einem Ödem sowie mit der Infiltration von Zellen in das Bronchialgewebe, durch Einlagerung von kollagenen Fasern und durch die die Hyperplasie bzw. Hypertrophie der glatten Atemwegsmuskulatur wird die Atemwegswand verdickt. Letztlich führt die vermehrte Produktion von Mukus in Verbindung mit einer entzündungsbedingten Schädigung des Atemwegsepithels und damit seines Ziliarapparates zu einer verschlechterten



Mukusclearance und damit ebenfalls zu einer Verminderung des Atemwegskalibers. Da Bronchien in ihrem Kaliber normalerweise variabel sind, könnten viele dieser Einflüsse eventuell ausgeglichen werden. Beim Asthma bronchiale findet aber eine zunehmende Fibrosierung der Bronchien statt, die die Kalibervariabilität der Atemwege einschränken (Roche, 1989) kann. In dem hier etabliertem Modell korreliert eine beständige Verringerung des expiratorischen Atemflusses sowohl mit der Progression der allergischen Atemwegsentzündung wie auch mit dem Ausmaß des Airway remodellings. Eine solche Korrelation konnte bisher nicht im Tiermodell gezeigt werden. Dies könnte darin begründet sein, dass bisher in keinem Tiermodell für das chronische Asthma entzündliche oder strukturelle Veränderungen der distalen Atemwegsabschnitte beschrieben sind, denen bei der Betrachtung der Lungenfunktion große Bedeutung zukommt. Schließlich beträgt der Anteil der distalen Atemwege am Gesamtwiderstand des Bronchialsystems bis zu 50% (Yanai, 1992), wodurch die Beteiligung distaler Atemwege im Falle einer AHR besonders schwerwiegend ist (Wagner, 1998). Zusammenfassend repräsentiert das hier etablierte Mausmodell des chronisch-experimentellen Asthmas den humanen Phänotyp zu einem sehr hohen Grad, sowohl was die chronische Entzündung der Atemwege als auch die verschiedenen strukturellen Veränderungen der Atemwege anbelangt. Die Beteiligung der distalen Atemwegsabschnitte und die damit einhergehende Beeinträchtigung der Lungenfunktion konnten bisher nicht im Tiermodell gezeigt werden. Daher könnte dieses Modell besonders geeignet sein, um die pathogenetischen Mechanismen zu untersuchen, die innerhalb des Asthma bronchiale zum Airway remodelling wie auch zu einer persistierenden Beeinträchtigung der Lungenfunktion führen.

Eosinophile Granulozyten spielen eine zentrale Rolle innerhalb des Chronifizierungsprozesses des allergischen Asthmas

Dieses Modell des chronisch-experimentellen Asthmas in der Maus wurde nun verwendet, um die Rolle eosinophiler Granulozyten innerhalb der Chronifizierungsphase der Erkrankung näher zu charakterisieren.

Die Beobachtung, dass der Beginn und auch die Progression des allergischen Asthmas mit dem Beginn der Infiltration eosinophiler Granulozyten in die Lunge

einhergeht, bildet die Grundlage verschiedener Strategien zur näheren Charakterisierung der Rolle dieser Zellen innerhalb der Asthma-Pathogenese. So z.B. wurde zunächst durch den Einsatz von IL-5-spezifischen Antikörpern versucht, die Aktivierung und das Überleben eosinophiler Granulozyten im entzündeten Gewebe zu verringern. Aufgrund der potentiellen Wirkung von IL-5 auf verschiedene andere Zellen, wurde allerdings dieser Weg nicht weiter beschritten (Lee, 2001). Deshalb wurde innerhalb dieser Arbeit eine andere, neue Strategie benutzt, um spezifisch die Infiltration eosinophiler Granulozyten in die Lunge zu verhindern. Diese beruht darauf, dass die Chemokine Eotaxin-1 und Eotaxin-2 ihre spezifische chemotaktische Wirkung auf eosinophile Granulozyten durch die Antagonisierung des Chemokinrezeptors CCR-3 nicht mehr entfalten können und damit die weitere Infiltration dieser Zellen in das Lungengewebe unterbunden wird. Ganz entscheidend ist dabei die Spezifität der CCR-3-Expression auf eosinophilen Granulozyten. Grimaldi et al. konnten mit FACS-Analysen zeigen, dass CCR-3 nahezu ausschließlich auf eosinophilen Granulozyten exprimiert wird (Grimaldi, 1999). Weiterhin führt die systemische Applikation eines CCR-3-spezifischen Antikörpers in Mäusen mit experimentellem Asthma zu einer Depletion eosinophiler Granulozyten im Blutkreislauf und in peripheren lymphatischen Organen, wie der Milz und den Lymphknoten, ohne weitere Leukozyten, vor allem TH<sub>2</sub>-Zellen, in Ihrer Aktivität zu beeinflussen (Justice, 2003).

Der Beginn der CCR-3-Antagonisierung im Tiermodell für ein chronisch-allergisches Asthma wurde so gewählt, dass die Tiere zwar eine allergische Entzündung der Atemwege in Verbindung mit einer Atemwegshyperreagibilität allerdings noch keinerlei Anzeichen für ein *Airway remodelling* vor allem in den distalen Atemwegen zeigten. Während der Etablierung dieses Tiermodells fiel auf, dass eine solche Situation nach vierwöchiger Allergenprovokation erreicht wird, denn danach progressiert die Entzündung und damit die Becherzellhyperplasie des Atemwegsepithels immer weiter nach distal und erste Fibrosierungsprozesse innerhalb der *Lamina propria* setzen ein. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe konnte durch CCR-3-Antagonisierung eine deutliche Reduktion der eosinophilen Granulozyten sowohl in der BAL wie auch im Atemwegsgewebe erzielt werden. Damit ging eine deutliche Verringerung der Becherzellhyperplasie, die in distalen Atemwegen überhaupt nicht vorhanden war, einher. Weiterhin war

in distalen Atemwegsabschnitten keine vermehrte Einlagerung kollagener Fasern in die Atemwegswand zu beobachten; die Atemwegsreagibilität war nahezu normalisiert.

Da die Anwesenheit eosinophiler Granulozyten im Atemwegsgewebe auf den Schweregrad des allergischen Asthmas schließen lässt und sogar in Patienten mit einer leichten Asthmaverlaufsform beobachtet wird, wird allgemein postuliert, dass eosinophile Granulozyten erheblichen Anteil an der Asthmapathogenese haben (Bousquet, 1990). Auch ist es im Tiermodell nicht möglich, experimentelles Asthma zu induzieren, deren Genese von eosinophilen Granulozyten genetisch gestört ist. Seit bekannt ist, dass eosinophile Granulozyten sowohl TGF- $\beta$  als auch Zysteinyll-Leukotriene sezernieren können, stehen diese Zellen weiterhin im Verdacht, den fibrotischen Umbauprozess der Atemwege zu induzieren bzw. zu unterstützen (Beller, 2004). Daneben können eosinophile Granulozyten und Fibroblasten derart interagieren, dass letztere sowohl zu einer gesteigerten Proliferation wie auch zu einer gesteigerten Synthese und Sekretion von Prokollagen stimuliert werden (Levi-Schaffer 1999; Gharaee-Kermani, 1998). In der hier vorliegenden Arbeit war die Reduktion eosinophiler Granulozyten in der Lunge assoziiert mit dem Ausbleiben fibrotischer Umbauprozesse in den distalen Atemwegen, was ebenfalls auf eine Beteiligung dieser Zellen am Vorgang des Airway remodellings schließen lässt. Unterstützt wird diese These auch von Beobachtungen von Humbles et al., wonach eosinophile Granulozyten unter Umständen sogar essentiell für die beim experimentellen Asthma beobachteten Umbauprozesse der Atemwege sind (Humbles, 2004). Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit nicht eine völlige Unterdrückung der Einlagerung kollagener Fasern, die auch nach Applikation des CCR-3-Inhibitors weiterhin vermehrt in den proximalen Atemwegsabschnitten beobachtet werden konnte, erreicht werden. Dieses Ergebnis könnte auf dem Design des hier verwendeten Protokolls basieren, da mit der CCR-3-Applikation erst begonnen wurde, als bereits eine allergische Atemwegsentzündung etabliert war und durch den CCR-3-Antagonisten die weitere Infiltration eosinophiler Granulozyten vor allem in die distalen Atemwegsabschnitte verhindert wurde.

Neben der Reduktion der allergischen Atemwegsentzündung, sowie der Mukushypersekretion und der Verhinderung der subepithelialen Fibrose, zeigten Tiere aus der CCR-3-Gruppe eine deutliche Verbesserung der

Atemwegsreabilität. Wie bereits erwähnt stehen eosinophile Granulozyten im Verdacht eine zentrale Rolle bei der Induktion einer AHR zu spielen. In der vorliegenden Arbeit hatte allein die Verminderung der Infiltration eosinophiler Granulozyten die Normalisierung der Atemwegsreaktivität zur Folge, trotz dass weiterhin eosinophile Granulozyten sowohl in der BAL als auch im Bronchialgewebe nachweisbar waren. Dieser Umstand könnte durch dadurch erklärt werden, dass zwar die Infiltration eosinophiler Granulozyten ab der vierten Provokationswoche effizient durch den CCR-3-Antagonisten verhindert wird, vor diesem Zeitpunkt bereits eine massive Infiltration eosinophiler Granulozyten in das Bronchialgewebe und die BAL stattgefunden hat. Da die Vorexperimente mit dem CCR-3-Antagonisten zeigen konnten, dass dieser die bestehende TH<sub>2</sub>-Antwort nicht beeinflusst, können die vorhandenen eosinophilen Granulozyten unter Einfluss des TH<sub>2</sub>-Zytokins IL-5, was noch nach der zwölften Provokationswoche in der BAL nachzuweisen ist, im Atemwegsgewebe überleben. Allerdings wäre über den beobachteten Zeitraum von zwölf Wochen ein so genannter „Burn out“-Effekt bei den eosinophilen Granulozyten denkbar, da dieser Zellen über den gesamten Zeitraum ihre zytotoxischen Produkte freisetzen müssten. Unter Umständen könnten diese nicht mehr im gleichen Umfang wie zu Beginn der Entzündungsreaktion basische Proteine und radikalische Sauerstoffmetaboliten produzieren, die bei der Entwicklung einer AHR eine bedeutende Rolle spielen (Coyle, 1993; Coyle, 1993; Jacoby, 1993). Da die Infiltration neuer, „leistungsfähiger“ eosinophiler Granulozyten ausbleibt, würden sehr viel geringere Konzentrationen dieser Substanzen im Bronchialgewebe vorhanden sein, so dass eine Regeneration der Bronchialmuskulatur möglich wäre. Zur Stützung dieser These wären allerdings weitere Untersuchungen nötig, die vor allem die Konzentration verschiedener Eosinophilenprodukte in der Bronchialschleimhaut in Abhängigkeit von der Zeit bzw. der Menge an eingesetztem CCR-3-Inhibitor beinhalten würde.

Zusammenfassend konnte für die eosinophilen Granulozyten eine Beteiligung an Remodellingvorgängen der Bronchialwand wie auch für die Aufrechterhaltung der Atemweshyperreabilität beim experimentellen Asthma belegt werden.

## 5. Literatur

**Adel-Patient K, Nahori MA, Proust B, Lapa e Silva JR, Creminon C, Wal JM, Vargaftig BB.** Elicitation of the allergic reaction in beta-lactoglobulin-sensitized Balb/c mice: biochemical and clinical manifestations differ according to the structure of the allergen used for challenge. *Clin Exp Allergy*. 2003 Mar;33(3):376-85.

**Aikawa T, Shimura S, Sasaki H, Ebina M, Takishima T.** Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. *Chest*. 1992 Apr;101(4):916-21.

**Alarie Y.** Irritating properties of airborne materials to the upper respiratory tract. *Arch Environ Health*. 1966 Oct;13(4):433-49.

**Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA.** Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001 Oct 18;413(6857):732-8.

**Alkan SS, Akdis AC, Feuerlein D, Gruninger M.** Direct measurement of cytokines (IFN-gamma, IL-4, -5, and -6) from organs after antigenic challenge. *Ann N Y Acad Sci*. 1996 Oct 31;796:82-90.

**Amdur MO, Mead J.** Mechanics of respiration in unanesthetized guinea pigs. *Am J Physiol*. 1958 Feb;192(2):364-8.

**Anderson JA.** Allergic reactions to drugs and biological agents. *JAMA*. 1992 Nov 25;268(20):2844-57.

**Asher MI, Keil U, Anderson HR, Beasley R, Crane J, Martinez F, Mitchell EA, Pearce N, Sibbald B, Stewart AW, et al.** International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods. *Eur Respir J*. 1995 Mar;8(3):483-91.

**Bacharier LB, Jabara H, Geha RS.** Molecular mechanisms of immunoglobulin E regulation. *Int Arch Allergy Immunol*. 1998 Apr;115(4):257-69.

**Bai TR, Cooper J, Koelmeyer T, Paré PD, Weir TD.** The effect of age and duration of disease on airway structure in fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162: 663-9.

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

**Barnes KC, Neely JD, Duffy DL, Freidhoff LR, Breazeale DR, Schou C, Naidu RP, Levett PN, Renault B, Kucherlapati R, Iozzino S, Ehrlich E, Beaty TH, Marsh DG.** Linkage of asthma and total serum IgE concentration to markers on chromosome 12q: evidence from Afro-Caribbean and Caucasian populations. *Genomics*. 1996 Oct 1;37(1):41-50.

**Beasley R, Nishima S, Pearce N, Crane J.** Beta-agonist therapy and asthma mortality in Japan. *Lancet*. 1998 May 9;351(9113):1406-7.

**Beller TC, Friend DS, Maekawa A, Lam BK, Austen KF, Kanaoka Y.** Cysteinyl leukotriene 1 receptor controls the severity of chronic pulmonary inflammation and fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 2;101(9):3047-52.

**Bentley AM, Meng Q, Robinson DS, Hamid Q, Kay AB, Durham SR.** Increases in activated T lymphocytes, eosinophils, and cytokine mRNA expression for interleukin-5 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in bronchial biopsies after allergen inhalation challenge in atopic asthmatics. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1993 Jan;8(1):35-42.

**Blyth DI, Pedrick MS, Savage TJ, Hessel EM, Fattah D.** Lung inflammation and epithelial changes in a murine model of atopic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996 May;14(5):425-38.

**Boulet LP, Turcotte H, Brochu A.** Persistence of airway obstruction and hyperresponsiveness in subjects with asthma remission. *Chest*. 1994; 105: 1024-31.

**Boulet LP, Laviolette M, Turcotte H, Cartier A, Dugas M, Malo JL, Boulet M.** Bronchial subepithelial fibrosis correlates with airway responsiveness to methacholine. *Chest*. 1997; 112: 45-52.

**Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM.** Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 May;161(5):1720-45.

**Bradley LM, Harbertson J, Feschi GC, Kondrack R, Linton PJ.** Regulation of development and function of memory CD4 subsets. *Immunol Res*. 2000; 21: 149-158.

**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, von Mutius E; Allergy and Endotoxin Study Team.** Environmental exposure to

endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med*. 2002 Sep 19;347(12):869-77.

**Brewer JP, Kisselgof AB, Martin TR.** Genetic variability in pulmonary physiological, cellular, and antibody responses to antigen in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Oct;160(4):1150-6.

**Brown PJ, Greville HW, Finucane KE.** Asthma and irreversible airflow obstruction. *Thorax*. 1984; 39: 131-6.

**Brusselle G, Kips J, Joos G, Bluethmann H, Pauwels R.** Allergen-induced airway inflammation and bronchial responsiveness in wild-type and interleukin-4-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995 Mar;12(3):254-9.

**Bumbacea D, Campbell D, Nguyen L, Carr D, Barnes PJ, Robinson D, Chung KF.** Parameters associated with persistent airflow obstruction in chronic severe asthma. *Eur Respir J*. 2004 ; 24 : 122-8.

**Busse WW, Gern JE.** Viruses in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Aug;100(2):147-50.

**Calhoun WJ, Bates ME, Schrader L, Sedgwick JB, Busse WW.** Characteristics of peripheral blood eosinophils in patients with nocturnal asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1992 Mar;145(3):577-81.

**Cann AJ.** Principles of Molecular Virology. London New York, San Diego (Academic Press, Harcourt Brace & Company Publishers). 1993. 121pp.

**Carroll N, Elliot J, Morton A, et al.** The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1993; 147: 405-10.

**Chetta, A, Foresi, A, Del Donno M, Consigli GF, Bertorelli G, Pesci A, Barbee RA, Olivieri D.** Bronchial responsiveness to distilled water and methacholine and its relationship to inflammation and remodelling of the airways in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996; 153: 910-7.

**Chinn S, Burney P, Jarvis D, Luczynska C.** Variation in bronchial responsiveness in the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). *Eur Respir J*. 1997 Nov;10(11):2495-501.

**Cohn L, Homer RJ, Marinov A, Rankin J, Bottomly K.** Induction of airway mucus production By T helper 2 (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. *J Exp Med*. 1997 Nov 17;186(10):1737-47.

**Cohn L, Elias JA, Chupp GL.** Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:789-815.

**Collins PD, Marleau S, Griffiths-Johnson DA, Jose PJ, Williams TJ.** Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *J Exp Med.* 1995 Oct 1;182(4):1169-74.

**Coyle AJ, Mitzner W, Irvin CG.** Cationic proteins alter smooth muscle function by an epithelium-dependent mechanism. *J Appl Physiol.* 1993 Apr;74(4):1761-8.

**Coyle AJ, Ackerman SJ, Irvin CG.** Cationic proteins induce airway hyperresponsiveness dependent on charge interactions. *Am Rev Respir Dis.* 1993 Apr;147(4):896-900.

**D'Amato G, Liccardi G, D'Amato M.** Environmental risk factors (outdoor air pollution and climatic changes) and increased trend of respiratory allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2000 May-Jun;10(3):123-8.

**Daniels SE, Bhattacharrya S, James A, Leaves NI, Young A, Hill MR, Faux JA, Ryan GF, le Souef PN, Lathrop GM, Musk AW, Cookson WO.** A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. *Nature.* 1996 Sep 19;383(6597):247-50.

**Devalia JL, Campbell AM, Sapsford RJ, Runsznak C, Quint D, Goddard P, Bousquet J, Davies RJ.** Effect of nitrogen dioxide on synthesis of inflammatory cytokines expressed by human bronchial epithelial cells in vitro. *Am J Resp Cell Mol Biol.* 1993; 9: 271-8.

**Dohi M, Tsukamoto S, Nagahori T, Shinagawa K, Saitoh K, Tanaka Y, Kobayashi S, Tanaka R, To Y, Yamamoto K.** Noninvasive system for evaluating the allergen-specific airway response in a murine model of asthma. *Lab Invest.* 1999 Dec;79(12):1559-71.

**Dunhill MS.** The pathology of asthma with special reference to changes in bronchial mucosa. *J Clin Pathol.* 1960; 131: 599-606.

**Edelmann KH, Richardson-Burns S, Alexopoulou L, Tyler KL, Flavell RA, Oldstone MB.** Does Toll-like receptor 3 play a biological role in virus infections? *Virology.* 2004 May 1;322(2):231-8.

**Elias JA, Zhu Z, Chupp G, Homer RJ.** Airway remodeling in asthma. *J Clin Invest.* 1999 Oct;104(8):1001-6.

**Elias JA.** Airway remodeling in asthma. Unanswered questions. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Mar;161(3 Pt 2):S168-71.

**Epstein MM.** Do mouse models of allergic asthma mimic clinical disease? *Int Arch Allergy Immunol.* 2004 Jan;133(1):84-100.



**Fabbri LM, Saetta M, Picotti G, Mapp CE.** Late asthmatic reactions, airway inflammation and chronic asthma in toluene-diisocyanate-sensitized subjects. *Respiration*. 1991;58 Suppl 1:18-21.

**Firestein GS, Roeder WD, Laxer JA, Townsend KS, Weaver CT, Hom JT, Linton J, Torbett BE, Glasebrook AL.** A new murine CD4<sup>+</sup> T cell subset with an unrestricted cytokine profile. *J Immunol*. 1989 Jul 15;143(2):518-25.

**Flood-Page P, Menzies-Gow A, Phipps S, Ying S, Wangoo A, Ludwig MS, Barnes N, Robinson D, Kay AB.** Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics. *J Clin Invest*. 2003 Oct;112(7):1029-36.

**Gao PS, Mao XQ, Roberts MH, Arinobu Y, Akaiwa M, Enomoto T, Dake Y, Kawai M, Sasaki S, Hamasaki N, Izuhara K, Shirakawa T, Hopkin JM.** Variants of STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6) in atopic asthma. *J Med Genet*. 2000 May;37(5):380-2.

**Gavett SH, O'Hearn DJ, Karp CL, Patel EA, Schofield BH, Finkelman FD, Wills-Karp M.** Interleukin-4 receptor blockade prevents airway responses induced by antigen challenge in mice. *Am J Physiol*. 1997 Feb;272(2 Pt 1):L253-61.

**Gehring U, Douwes J, Doekes G, Koch A, Bischof W, Fahlbusch B, Richter K, Wichmann HE, Heinrich J; INGA Study Group.** Indoor Factors and Genetics in Asthma. Beta(1-->3)-glucan in house dust of German homes: housing characteristics, occupant behavior, and relations with endotoxins, allergens, and molds. *Environ Health Perspect*. 2001 Feb;109(2):139-44.

**Gharaee-Kermani M, Phan SH.** The role of eosinophils in pulmonary fibrosis. *Int J Mol Med*. 1998 Jan;1(1):43-53.

**Giszyki MJ, Adelroth E, Rogers AV, et al.** Myofibroblasts involvement in the allergen-induced late response in mild atopic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997; 16: 3154-61.

**Glaab T, Daser A, Braun A, Neuhaus-Steinmetz U, Fabel H, Alarie Y, Renz H.** Tidal midexpiratory flow as a measure of airway hyperresponsiveness in allergic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001 Mar;280(3):L565-73.

**Gleich GJ.** The eosinophil and bronchial asthma: current understanding. *J Allergy Clin Immunol*. 1990 Feb;85(2):422-36.

**Gleich GJ, Adolphson CR, Leiferman KM.** The biology of the eosinophilic leukocyte. *Annu Rev Med.* 1993;44:85-101.

**Gomes RF, Shen X, Ramchandani R, Tepper RS, Bates JH.** Comparative respiratory system mechanics in rodents. *J Appl Physiol.* 2000 Sep;89(3):908-16.

**Gong JH, Zhang M, Modlin RL, Linsley PS, Iyer D, Lin Y, Barnes PF.** Interleukin-10 downregulates Mycobacterium tuberculosis-induced Th1 responses and CTLA-4 expression. *Infect Immun.* 1996 Mar;64(3):913-8.

**Goodnow CC, Cyster JG, Hartley SB, Bell SE, Cooke MP, Healy JI, Akkaraju S, Rathmell JC, Pogue SL, Shokat KP.** Self-tolerance checkpoints in B lymphocyte development. *Adv Immunol.* 1995;59:279-368.

**Grimaldi JC, Yu NX, Grunig G, Seymour BW, Cottrez F, Robinson DS, Hosken N, Ferlin WG, Wu X, Soto H, O'Garra A, Howard MC, Coffman RL.** Depletion of eosinophils in mice through the use of antibodies specific for C-C chemokine receptor 3 (CCR3). *J Leukoc Biol.* 1999 Jun;65(6):846-53.

**Guerrero-Plata A, Ortega E, Gomez B.** Persistence of respiratory syncytial virus in macrophages alters phagocytosis and pro-inflammatory cytokine production. *Viral Immunol.* 2001. 14: 19-30.

**Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG, Gelfand EW.** Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Sep;156(3 Pt 1):766-75.

**Hamelmann E, Wahn U, Gelfand EW.** Role of the Th2 cytokines in the development of allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999 Feb-Apr;118(2-4):90-4.

**Hamelmann E, Takeda K, Haczku A, Cieslewicz G, Shultz L, Hamid Q, Xing Z, Gauldie J, Gelfand EW.** Interleukin (IL)-5 but not immunoglobulin E reconstitutes airway inflammation and airway hyperresponsiveness in IL-4-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000 Sep;23(3):327-34.

**Hantos Z, Adamicza A, Govaerts E, Daroczy B.** Mechanical impedances of lungs and chest wall in the cat. *J Appl Physiol.* 1992 Aug;73(2):427-33.

**Hashimoto S, Gon Y, Takeshita I, Matsumoto K, Maruoka S, Horie T.** Transforming growth Factor-beta1 induces phenotypic modulation of human lung fibroblasts to myofibroblast through a c-Jun-NH2-terminal kinase-dependent pathway. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Jan;163(1):152-7.

**Heinzmann A, Blattmann S, Forster J, Kuehr J, Deichmann KA.** Common polymorphisms and alternative splicing in the ILT3 gene are not associated with atopy. *Eur J Immunogenet.* 2000 Jun;27(3):121-7.

**Henderson WR Jr, Tang LO, Chu SJ, Tsao SM, Chiang GK, Jones F, Jonas M, Pae C, Wang H, Chi EY.** A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Jan 1;165(1):108-16.

**Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML, Chatila TA.** The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. *N Engl J Med.* 1997 Dec 11;337(24):1720-5.

**Herz U, Lumpp U, Daser A, Gelfand EW, Renz H.** Murine animal models to study the central role of T cells in immediate-type hypersensitivity responses. *Adv Exp Med Biol.* 1996;409:25-32.

**Heumann D, Roger T.** Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin Chim Acta.* 2002 Sep;323(1-2):59-72.

**Hizawa N, Yamaguchi E, Jinushi E, Kawakami Y.** A common FCER1B gene promoter polymorphism influences total serum IgE levels in a Japanese population. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Mar;161(3 Pt 1):906-9.

**Hoffjan S, Nicolae D, Ober C.** Association studies for asthma and atopic diseases: a comprehensive review of the literature. *Respir Res.* 2003 Dec 04;4(1):14.

**Hogaboam CM, Bone-Larson CL, Steinhauser ML, Matsukawa A, Gosling J, Boring L, Charo IF, Simpson KJ, Lukacs NW, Kunkel SL.** Exaggerated hepatic injury due to acetaminophen challenge in mice lacking C-C chemokine receptor 2. *Am J Pathol.* 2000 Apr;156(4):1245-52.

**Holgate ST.** Mediator and cytokine mechanisms in asthma. *Thorax.* 1993 Feb;48(2):103-9.

**Holgate ST, Bodey KS, Janezic A, Frew AJ, Kaplan AP, Teran LM.** Release of RANTES, MIP-1 alpha, and MCP-1 into asthmatic airways following endobronchial allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Nov;156(5):1377-83.

**Hogan ST, Koskinen A, Matthaei KI, Young IG, Foster PS.** Interleukin-5-producing CD4+ T cells play a pivotal role in aeroallergen-induced eosinophilia,

bronchial hyperreactivity, and lung damage in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Jan;157(1):210-8.

**Holgate ST, Davies DE, Lackie PM, et al.** Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000; 105: 193-204.

**Holt PG, Rose AH, Batty JE, Turner KJ.** Induction of adjuvant-independent IgE responses in inbred mice: primary, secondary, and persistent IgE responses to ovalbumin and ovomucoid. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1981;65(1):42-50.

**Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM.** Development of TH1 CD4<sup>+</sup> T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages.

*Science*. 1993 Apr 23;260(5107):547-9.

**Humbles AA, Lloyd CM, McMillan SJ, Friend DS, Xanthou G, McKenna EE, Ghiran S, Gerard NP, Yu C, Orkin SH, Gerard C.** A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. *Science*. 2004 Sep 17;305(5691):1776-9.

**Jacoby DB, Gleich GJ, Fryer AD.** Human eosinophil major basic protein is an endogenous allosteric antagonist at the inhibitory muscarinic M2 receptor. *J Clin Invest*. 1993 Apr;91(4):1314-8.

**Jain VV, Businga TR, Kitagaki K, George CL, O'Shaughnessy PT, Kline JN.** Mucosal immunotherapy with CpG oligodeoxynucleotides reverses a murine model of chronic asthma induced by repeated antigen exposure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003 Nov;285(5):L1137-46.

**Janssen EM, Wauben MH, Nijkamp FP, van Eden W, van Oosterhout AJ.** Immunomodulatory effects of antigen-pulsed macrophages in a murine model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002 Aug;27(2):257-64.

**Jarjour NN, Busse WW.** Cytokines in bronchoalveolar lavage fluid of patients with nocturnal asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Nov;152(5 Pt 1):1474-7.

**Jarjour NN, Calhoun WJ, Kelly EA, Gleich GJ, Schwartz LB, Busse WW.** The immediate and late allergic response to segmental bronchopulmonary provocation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 May;155(5):1515-21.

**Jeffery PK.** Pathology of asthma. *Br Med Bull*. 1992 Jan;48(1):23-39.

**Jeffery PK.** Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Nov 15;164(10 Pt 2):S28-38.

**John AE, Berlin AA, Lukacs NW.** Respiratory syncytial virus-induced CCL5/RANTES contributes to exacerbation of allergic airway inflammation. *Eur J Immunol.* 2003 Jun;33(6):1677-85.

**Johnson PR, Roth M, Tamm M, et al.** Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 164: 474-7

**Jungsuwadee P, Dekan G, Stingl G, Epstein MM.** Recurrent aerosol antigen exposure induces distinct patterns of experimental allergic asthma in mice. *Clin Immunol.* 2002 Feb;102(2):145-53.

**Jungsuwadee P, Dekan G, Stingl G, Epstein MM.** Inhaled dexamethasone differentially attenuates disease relapse and established allergic asthma in mice. *Clin Immunol.* 2004 Jan;110(1):13-21.

**Juntti H, Kokkonen J, Dunder T, Renko M, Niinimaki A, Uhari M.** Association of an early respiratory syncytial virus infection and atopic allergy. *Allergy.* 2003 Sep;58(9):878-84.

**Justice JP, Borchers MT, Crosby JR, Hines EM, Shen HH, Ochkur SI, McGarry MP, Lee NA, Lee JP.** Ablation of eosinophils leads to a reduction of allergen-induced pulmonary pathology *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,* Jan 2003; 284: 169 - 178.

**Kasai M, Kurasawa K, Nakajima H, Iwamoto I.** T cell vaccination eliminates antigen-specific T cells and prevents antigen-induced eosinophil recruitment into the \_\_\_\_\_ tissue. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001;125 Suppl 1:59-66.

**Kauffmann F, Dizier MH, Pin I, Paty E, Gormand F, Vervloet D, Bousquet J, Neukirch F, Annesi I, Oryszczyn MP, Lathrop M, Demenais F, Lockhart A, Feingold J.** Epidemiological study of the genetics and environment of asthma, bronchial hyperresponsiveness, and atopy: phenotype issues. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Oct;156(4 Pt 2):S123-9.

**Knight D.** Epithelium-fibroblast interaction in response to airway inflammation. *Immunol Cell Biol.* 2001; 79: 160-4.

**Kobayashi M et al.** Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med.* 1989. 170: 827-45.

**Kotaniemi-Syrjanen A, Vainionpaa R, Reijonen TM, Waris M, Korhonen K, Korppi M.** Rhinovirus-induced wheezing in infancy--the first sign of childhood asthma? *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Jan;111(1):66-71.

**Kramer U, Heinrich J, Wjst M, Wichmann HE.** Age of entry to day nursery and allergy in later childhood. *Lancet.* 1999 Feb 6;353(9151):450-4.

**Kumar RK.** Understanding airway wall remodeling in asthma: a basis for improvements in therapy? *Pharmacol Ther.* 2001 Aug;91(2):93-104.

**Kung TT, Jones H, Adams GK 3rd, Umland SP, Kreutner W, Egan RW, Chapman RW, Watnick AS.** Characterization of a murine model of allergic pulmonary inflammation. *Int Arch Allergy Immunol.* 1994 Sep;105(1):83-90.

**Kuperman D, Schofield B, Wills-Karp M, Grusby MJ.** Signal transducer and activator of transcription factor 6 (Stat6)-deficient mice are protected from antigen-induced airway hyperresponsiveness and mucus production. *J Exp Med.* 1998 Mar 16;187(6):939-48.

**Laitinen LA, Heino M, Laitinen A, Kava T, Haahtela T.** Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1985; 131: 599-606.

**Lambrecht BN, Pauwels RA, Fazekas De St Groth B.** Induction of rapid T cell activation, division, and recirculation by intratracheal injection of dendritic cells in a TCR transgenic model. *J Immunol.* 2000 Mar 15;164(6):2937-46.

**Lange P, Parner J, Vestbo J, Schnohr P, Jensen G.** A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *N Engl J Med.* 1998 Oct 22;339(17):1194-200.

**Larche M, Robinson DS, Kay AB.** The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Mar;111(3):450-63

**Lee JJ, McGarry MP, Farmer SC, Denzler KL, Larson KA, Carrigan PE, Brenneise IE, Horton MA, Haczku A, Gelfand EW, Leikauf GD, Lee NA.** Interleukin-5 expression in the lung epithelium of transgenic mice leads to pulmonary changes pathognomonic of asthma. *J Exp Med.* 1997 Jun 16;185(12):2143-56.

**Lee J, Chuang TH, Redecke V, She L, Pitha PM, Carson DA, Raz E, Cottam HB.** Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside

analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 27;100(11):6646-51.

**Lee NA, Gelfand EW, Lee JJ.** Pulmonary T cells and eosinophils: coconspirators or independent triggers of allergic respiratory pathology? *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Jun;107(6):945-57.

**Levi-Schaffer F, Garbuzenko E, Rubin A, Reich R, Pickholz D, Gillery P, Emonard H, Nagler A, Maquart FA.** Human eosinophils regulate human lung- and skin-derived fibroblast properties in vitro: a role for transforming growth factor beta (TGF-beta). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug 17;96(17):9660-5.

**Linneberg A, Ostergaard C, Tvede M, Andersen LP, Nielsen NH, Madsen F, Frolund L, Dirksen A, Jorgensen T.** IgG antibodies against microorganisms and atopic disease in Danish adults: the Copenhagen Allergy Study. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Apr;111(4):847-53.

**Liu Y, Janeway CA Jr.** Cells that present both specific ligand and costimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 May 1;89(9):3845-9.

**Loddenkemper R.** Asthma Burden. In *The European Lung White Book 2003* herausgegeben von der European Respiratory Society (ERS) und der European Lung Foundation (ELF). 2004: 16-25.

**Lopez AF, Sanderson CJ, Gamble JR, Campbell HD, Young IG, Vadas MA.** Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. *J Exp Med*. 1988 Jan 1;167(1):219-24.

**Lore K, Betts MR, Brenchley JM, Kuruppu J, Khojasteh S, Perfetto S, Roederer M, Seder RA, Koup RA.** Toll-like receptor ligands modulate dendritic cells to augment cytomegalovirus- and HIV-1-specific T cell responses. *J Immunol*. 2003 Oct 15;171(8):4320-8.

**Lorenz M, Jung S, Radbruch A.** Switch transcripts in immunoglobulin class switching. *Science*. 1995 Mar 24;267(5205):1825-8.

**Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Flavell RA.** Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 13;101(15):5598-603.

**Luster AD.** Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*. 1998 Feb 12;338(7):436-45.

**Ma W, Bryce PJ, Humbles AA, Laouini D, Yalcindag A, Alenius H, Friend DS, Oettgen HC, Gerard C, Geha RS.** CCR3 is essential for skin eosinophilia and airway hyperresponsiveness in a murine model of allergic skin inflammation. *J Clin Invest.* 2002 Mar;109(5):621-8.

**Macatonia SE, et al.** Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naïve CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol.* 1995. 15: 5071-9.

**Maggi E, Parronchi P, Manetti R, Simonelli C, Piccinni MP, Rugiu FS, De Carli M, Ricci M, Romagnani S.** Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol.* 1992 Apr 1;148(7):2142-7.

**Magnan A, Retornaz F, Tsicopoulos A, Brisse J, Van Pee D, Gosset P, Chamlian A, Tonnel AB, Vervloet D.** Altered compartmentalization of transforming growth factor-beta in asthmatic airways. *Clin Exp Allergy.* 1997 Apr;27(4):389-95.

**Majde JA, Guha-Tharkurta N, Chen Z, Bredow S, Krueger JM.** Spontaneous release of stable viral double stranded RNA into the extracellular medium by influenza virus-infected MDCK epithelial cell: implications for the viral acute phase response. 1998. *Arch. Virol.* 143: 2371-2380.

**Mandell G, Bennett J, Dolin R (Hrsg.)** Principles and Practice of Infectious Diseases. 5 Aufl. New York, Churchill Livingstone. 2000. pp.245.

**Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Schou C, Krishnaswamy G, Beaty TH.** Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science.* 1994 May 20;264(5162):1152-6.

**Matricardi PM, Rosmini F, Riondino S, Fortini M, Ferrigno L, Rapicetta M, Bonini S.** Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *BMJ.* 2000 Feb 12;320(7232):412-7.

**Maziak W, Behrens T, Brasky TM, Duhme H, Rzehak P, Weiland SK, Keil U.** Are asthma and allergies in children and adolescents increasing? Results from ISAAC phase I and phase III surveys in Munster, Germany. *Allergy.* 2003 Jul;58(7):572-9.

**McGowan SE.** Extracellular matrix and the regulation of lung development and repair. *FASEB J.* 1992; 6: 2895-904.



**McIntire JJ, Umetsu SE, Macaubas C, Hoyte EG, Cinnioglu C, Cavalli-Sforza LL, Barsh GS, Hallmayer JF, Underhill PA, Risch NJ, Freeman GJ, DeKruyff RH, Umetsu DT.** Immunology: hepatitis A virus link to atopic disease. *Nature*. 2003 Oct 9;425(6958):576.

**McMillan SJ, Lloyd CM.** Prolonged allergen challenge in mice leads to persistent airway remodelling. *Clin Exp Allergy*. 2004 Mar;34(3):497-507.

**Mehlhof PD, van de Rijn M, Goldberg AB, Brewer JP, Kurup VP, Martin TR, Oettgen HC.** Allergen-induced bronchial hyperreactivity and eosinophilic inflammation occur in the absence of IgE in a mouse model of asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Feb 18;94(4):1344-9.

**Micera A, Vigneti E, Pickholtz D, Reich R, Pappo O, Bonini S, Marquart FX, Aloe L, Levi-Schaffer F.** Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001. 2001; 98: 6162-7.

**Miettinen M, Sareneva T, Julkunen I, Matikainen S.** IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections. *Genes Immun*. 2001 Oct;2(6):349-55.

**Mims CA.** *The Pathogenesis of Infectious Diseases* (London Academic Press, 3<sup>rd</sup> Edition). 1987: 312pp.

**Minshall EM, Leung DY, Martin RJ, Song YL, Cameron L, Ernst P, Hamid Q.** Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997 Sep;17(3):326-33.

**Moffatt MF, Schou C, Faux JA, Cookson WO.** Germline TCR-A restriction of immunoglobulin E responses to allergen. *Immunogenetics*. 1997;46(3):226-30.

**Mojtabavi N, Dekan G, Stingl G, Epstein MM.** Long-lived Th2 memory in experimental allergic asthma. *J Immunol*. 2002 Nov 1;169(9):4788-96.

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

**Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL.** Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986 Apr 1;136(7):2348-57.

**Müller U, Köhler G, Mossmann H, Schaub GA, Alber G, Di Santo JP, Brombacher F, Hölscher C.** IL-12-independent IFN- $\gamma$  production by T cells in experimental Chaga's disease is mediated by IL-18. *J Immunol*. 2001;167: 3346-53.

**Nagata M, Sedgwick JB, Busse WW.** Differential effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on eosinophil and neutrophil superoxide anion generation. *J Immunol.* 1995 Nov 15;155(10):4948-54.

**Nakamura Y, Ghaffar O, Olivenstein R, Taha RA, Soussi-Gounni A, Zhang DH, Ray A, Hamid Q.** Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1999 Feb;103(2 Pt 1):215-22.

**Nickel R, Wahn U, Hizawa N, Maestri N, Duffy DL, Barnes KC, Beyer K, Forster J, Bergmann R, Zepp F, Wahn V, Marsh DG.** Evidence for linkage of chromosome 12q15-q24.1 markers to high total serum IgE concentrations in children of the German Multicenter Allergy Study. *Genomics.* 1997 Nov 15;46(1):159-62.

**Ober C, Moffatt MF.** Contributing factors to the pathobiology. The genetics of asthma. *Clin Chest Med.* 2000 Jun;21(2):245-61.

**O'Garra A, Arai N.** The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol.* 2000; 278: 542-50.

**O'Hehir RE, Garman RD, Greenstein JL, Lamb JR.** The specificity and regulation of T-cell responsiveness to allergens. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:67-95.

**Ohno I, Nitta Y, Yamauchi K, Hoshi H, Honma M, Woolley K, O'Byrne P, Tamura G, Jordana M, Shirato K.** Transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) gene expression by eosinophils in asthmatic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996 Sep;15(3):404-9.

**Openshaw PJ, Dean GS, Culley FJ.** Links between respiratory syncytial virus bronchiolitis and childhood asthma: clinical and research approaches. *Pediatr Infect Dis J.* 2003 Feb;22(2 Suppl):S58-64; discussion S64-5.

**Oppmann B et al.** Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity.* 2000; 13:715-25.

**Ordonez CL, Khashayar R, Wong HH, Ferrando R, Wu R, Hyde DM, Hotchkiss JA, Zhang Y, Novikov A, Dolganov G, Fahy JV.** Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Feb;163(2):517-23.

**Parker DC.** T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:331-60.

**Parronchi P, De Carli M, Manetti R, Simonelli C, Sampognaro S, Piccinni MP, Macchia D, Maggi E, Del Prete G, Romagnani S.** IL-4 and IFN (alpha and gamma) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones. *J Immunol.* 1992 Nov 1;149(9):2977-83.

**Paul WE, Seder RA.** Lymphocyte responses and cytokines. *Cell.* 1994 Jan 28;76(2):241-51.

**Peebles RS Jr.** Viral infections, atopy, and asthma: is there a causal relationship? *J Allergy Clin Immunol.* 2004 Jan;113(1 Suppl):S15-8.

**Persson CG, Andersson M, Greiff L, Svensson C, Erjefalt JS, Sundler F, Wollmer P, Alkner U, Erjefalt I, Gustafsson B, et al.** Airway permeability. *Clin Exp Allergy.* 1995 Sep;25(9):807-14.

**Pirhonen J, Matikainen M, Julkunen I.** Regulation of virus-induced IL-12 and IL-23 expression in human macrophages. *J Immunol.* 2002; 169: 5673-8.

**Platt-Mills TA, Sporik RB, Chapman MD, Heymann PW.** The role of indoor allergens in asthma. *Allergy.* 1995;50(22 Suppl):5-12.

**Pollack W, Gorman JG, Freda VJ, Ascari WQ, Allen AE, Baker WJ.** Results of clinical trials of RhoGAM in women. *Transfusion.* 1968. 8: 151-153.

**Quarcoo D, Weixler S, Joachim RA, Stock P, Kallinich T, Ahrens B, Hamelmann E.** Resqimod, a new immune response modifier from the family of imidazoquinolines, inhibits allergen-induced Th2 responses, airway inflammation and airway hyper-reactivity in mice. *Clin Exp Allergy.* 2004. 34:1314-20.

**Rankin JA, Picarella DE, Geba GP, Temann UA, Prasad B, DiCosmo B, Tarallo A, Stripp B, Whitsett J, Flavell RA.** Phenotypic and physiologic characterization of transgenic mice expressing interleukin 4 in the lung: lymphocytic and eosinophilic inflammation without airway hyperreactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jul 23;93(15):7821-5.

**Renauld JC.** New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol.* 2001 Aug;54(8):577-89.

**Richter A, Puddicombe SM, Lordan JL, Bucchieri F, Wilson SJ, Djukanovic R, Dent G, Holgate ST, Davies DE.** The contribution of interleukin (IL)-4 and IL-13 to the epithelial-mesenchymal trophic unit in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001 Sep;25(3):385-91.

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

Lancet. 2001 Oct 6;358(9288):1129-33.

**Robbins RA, Rennard SI.** Biology of airway epithelial cells. In: Crystal RG, West JB, eds., The Lung: Scientific Foundations. New York: Raven Press, Ltd. 1997: 445pp.

**Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsiocopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB.** Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. N Engl J Med. 1992 Jan 30;326(5):298-304.

**Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST.** Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. Lancet. 1989 Mar 11;1(8637):520-4.

**Romanet-Manent S, Charpin D, Magnan A, Lanteaume A, Vervloet D, and the EGEA Cooperative Group.** Allergic vs nonallergic asthma: what makes the difference? Allergy. 2002 July; 57(7):607-613.

**Rose MC, Nickola TJ, Voynow JA.** Airway mucus obstruction: mucin glycoproteins, MUC gene regulation and goblet cell hyperplasia. Am J Respir Cell Mol Biol. 2001 Nov;25(5):533-7.

**Rosenstreich DL, Eggleston P, Kattan M, Baker D, Slavin RG, Gergen P, Mitchell H, McNiff-Mortimer K, Lynn H, Ownby D, Malveaux F.** The role of cockroach allergy and exposure to cockroach allergen in causing morbidity among inner-city children with asthma. N Engl J Med. 1997 May 8;336(19):1356-63.

**Rothenberg ME.** Eosinophilia. N Engl J Med. 1998 May 28;338(22):1592-600.

**Sakai K, Yokoyama A, Kohno N, Hamada H, Hiwada K.** Prolonged antigen exposure ameliorates airway inflammation but not remodeling in a mouse model of bronchial asthma. Int Arch Allergy Immunol. 2001 Oct;126(2):126-34.

Roy SR, Schiltz AM, Marotta A, Shen Y, Liu AH. Bacterial DNA in house and farm barn dust. J Allergy Clin Immunol. 2003 Sep;112(3):571-8.

**Salmon M, Walsh DA, Koto H, et al.** Repeated allergen exposure of sensitized Brown-Norway rats induces airway cell DNA synthesis and remodelling. Eur Respir J. 1999 ; 14 : 633-41.

**Sanderson CJ.** Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood*. 1992 Jun 15;79(12):3101-9.

**Sandford AJ, Chagani T, Zhu S, Weir TD, Bai TR, Spinelli JJ, Fitzgerald JM, Behbehani NA, Tan WC, Pare PD.** Polymorphisms in the IL4, IL4RA, and FCER1B genes and asthma severity. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Jul;106(1 Pt 1):135-40.

**Schmidt M, Sun G, Stacey MA, Mori L, Mattoli S.** Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 164: 380-9.

**Schmitt E, Van Brandwijk R, Fischer HG, Rude E.** Establishment of different T cell sublines using either interleukin 2 or interleukin 4 as growth factors. *Eur J Immunol*. 1990 Aug;20(8):1709-15.

**Scott P.** Selective differentiation of CD4+ T helper cell subsets. *Curr Opin Immunol*. 1993 Jun;5(3):391-7.

**Sedgwick JD, Holt PG.** Down-regulation of immune responses to inhaled antigen: studies on the mechanism of induced suppression. *Immunology*. 1985 Dec;56(4):635-42.

**Shinagawa K, Kojima M.** Mouse model of airway remodeling: strain differences. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Oct 15;168(8):959-67.

**Shore SA.** Airway smooth muscle in asthma – not just more of the same. *NEJM*. 2004; 351: 531-2.

**Simon HU, Yousefi S, Schranz C, Schapowal A, Bachert C, Blaser K.** Direct demonstration of delayed eosinophil apoptosis as a mechanism causing tissue eosinophilia. *J Immunol*. 1997 Apr 15;158(8):3902-8.

**Shaheen SO, Aaby P, Hall AJ, Barker DJ, Heyes CB, Shiell AW, Goudiaby A.** Measles and atopy in Guinea-Bissau. *Lancet*. 1996 Jun 29;347(9018):1792-6.

**Shimura S, Andoh Y, Haraguchi M, Shirato K.** Continuity of airway goblet cells and intraluminal mucus in the airways of patients with bronchial asthma. *Eur Respir J*. 1996 Jul;9(7):1395-401.

**Shoji S, Ertl RF, Linder J, Koizumi S, Duckworth WC, Rennard SI.** Bronchial epithelial cells respond to insulin and insulin-like growth factor as chemoattractant. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1989; 1: 13-20.

**Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B.** Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 May;161(5):1501-7.

**Smith AK, Rogers DF.** *In-vivo* models of airway goblet cell hyperplasia and mucine gene expression. In: Salathe, M, Edt. *Cilia and Mucus: from Development to Respiratory Defense.* New York: Marcel Dekker, 2001: 239-51.

**Steinman RM.** The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:271-96.

**Stober D, Schirmbeck R, Reimann J.** IL-12/IL-18-dependent IFN-gamma release by murine dendritic cells. *J Immunol.* 2001; 167: 957-65.

**Stock P, Akbari O, Berry G, Freeman GJ, Dekruyff RH, Umetsu DT.** Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity. *Nat Immunol.* 2004 Nov;5(11):1149-56.

**Strachan DP.** Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ.* 1989 Nov 18;299(6710):1259-60.

**Stroppe H.** in: *Physik für Studenten der Natur- und Technikwissenschaften.* Stroppe H, Langer H and Streitenberger P (eds.) Fachbuchverlag Leipzig. 1994: 121 pp.

**Sung KP, Yang L, Kim J, Ko D, Stachnick G, Castaneda D, Nayar J, Broide DH.** Eotaxin induces a sustained reduction in the functional adhesive state of very late antigen 4 for the connecting segment 1 region of fibronectin. *J Allergy Clin Immunol.* 2000 Nov;106(5):933-40.

**Swirski FK, Sajic D, Robbins CS, Gajewska BU, Jordana M, Stampfli MR.** Chronic exposure to innocuous antigen in sensitized mice leads to suppressed airway eosinophilia that is reversed by granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol.* 2002 Oct 1;169(7):3499-506.

**Tanaka H, Masuda T, Tokuoka S, Komai M, Nagao K, Takahashi Y, Nagai H.** The effect of allergen-induced airway inflammation on airway remodeling in a murine model of allergic asthma. *Inflamm Res.* 2001 Dec;50(12):616-24.

**Tang W, Geba GP, Zheng T, Ray P, Homer RJ, Kuhn C 3rd, Flavell RA, Elias JA.** Targeted expression of IL-11 in the murine airway causes lymphocytic inflammation, bronchial remodeling, and airways obstruction. *J Clin Invest.* 1996 Dec 15;98(12):2845-53.

**Temann UA, Geba GP, Rankin JA, Flavell RA.** Expression of interleukin 9 in the lungs of transgenic mice causes airway inflammation, mast cell hyperplasia, and bronchial hyperresponsiveness. *J Exp Med.* 1998 Oct 5;188(7):1307-20.

**Temelkovski J, Hogan SP, Shepherd DP, Foster PS, Kumar RK.** An improved murine model of asthma: selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolised allergen. *Thorax.* 1998 Oct;53(10):849-56.

**Teran LM, Mochizuki M, Bartels J, et al.** Th1- and Th2-type cytokines regulate the expression and production of eotaxin and RANTES by human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999; 20: 777-86.

**The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee.** Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *Lancet.* 1998 Apr 25;351(9111):1225-32.

**Thoma-Uszynski S, Kiertscher SM, Ochoa MT, Bouis DA, Norgard MV, Miyake K, Godowski PJ, Roth MD, Modlin RL.** Activation of toll-like receptor 2 on human dendritic cells triggers induction of IL-12, but not IL-10. *J Immunol.* 2000 Oct 1;165(7):3804-10.

**Thompson AB, Robbins AB, Romberger DJ, Sisson JH, Spurzem JR, Teschler H, Rennard SI.** Immunological function of the pulmonary epithelium. *Eur Respir J.* 1995 ; 8 : 127-49.

**Thomsen LL, Topley P, Daly MG, Brett SJ, Tite JP.** Imiquimod and resiquimod in a mouse model: adjuvants for DNA vaccination by particle-mediated immunotherapeutic delivery. *Vaccine.* 2004 Apr 16;22(13-14):1799-809.

**Tonnel AB, Joseph M, Gosset P, Fournier E, Capron A.** Stimulation of alveolar macrophages in asthmatic patients after local provocation test. *Lancet.* 1983 Jun 25;1(8339):1406-8.

**Trinchieri G et al.** Natural killer cell stimulatory factor (NKSF) or interleukin-12 is a key regulator of immune response and inflammation. *Prog Growth Factor Res.* 1992. 4: 547-9.

**Van Reeth K, Adair B.** Macrophages and respiratory. *Pathol. Biol.* 1997. 45: 184-192.

**Van Vyve T, Chanez P, Bernard A, Bousquet J, Godard P, Lauwerijs R, Sibille Y.** Protein content in bronchoalveolar lavage fluid of patients with asthma and control subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 1995 Jan;95(1 Pt 1):60-8.

**Vicari AP, Trinchieri G.** Interleukin-10 in viral diseases and cancer: exiting the

**Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A, Profita M, Chanez P, Bellia V, Mautino G, D'accardi P, Bousquet J, Bonsignore G.** Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Dec;158(6):1945-50.

**Vignola AM, Kips J, Bousquet J.** Tissue remodelling as a feature of persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 105: 1041-53.

**Vijayaraghavan R, Schaper M, Thompson R, Stock MF, Alarie Y.** Characteristic modifications of the breathing pattern of mice to evaluate the effects of airborne chemicals on the respiratory tract. *Arch Toxicol.* 1993;67(7):478-90.

**von Mutius E, Fritzsck C, Weiland SK, Roll G, Magnussen H.** Prevalence of asthma and allergic disorders among children in united Germany: a descriptive comparison. *BMJ.* 1992 Dec 5;305(6866):1395-9.

**von Mutius E, Martinez FD, Fritzsck C, Nicolai T, Roell G, Thiemann HH.** Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994 Feb;149(2 Pt 1):358-64.

**von Mutius E, Weiland SK, Fritzsck C, Duhme H, Keil U.** Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany. *Lancet.* 1998 Mar 21;351(9106):862-6.

**Wagner EM, Bleecker ER, permutt S, Liu MC.** Direct assessment of samll airways reactivity in human subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157: 447-52.

**Wahn U, Lau S, Bergmann R, Kulig M, Forster J, Bergmann K, Bauer CP, Guggenmoos-Holzmann I.** Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life. *J Allergy Clin Immunol.* 1997 Jun;99(6 Pt 1):763-9.

**Wardlaw AJ.** The role of air pollution in asthma. *Clin Exp Allergy.* 1993 Feb;23(2):81-96.



**Wardlaw AJ.** Molecular basis for selective eosinophil trafficking in asthma: A multistep paradigm. *J Allergy Clin Immunol.* 1999 Nov;104(5):917-26.

**Wenzel SE, Fowler AA 3rd, Schwartz LB.** Activation of pulmonary mast cells by bronchoalveolar allergen challenge. In vivo release of histamine and tryptase in atopic subjects with and without asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1988 May;137(5):1002-8.

**Wenzel SE.** Inflammation, leukotrienes and the pathogenesis of the late asthmatic response. *Clin Exp Allergy.* 1999 Jan;29(1):1-3.

**Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, Halliday JL, Trudeau JB, Gibbs RL, Chu HW.** Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 Sep;160(3):1001-8.

**WHO/NHLBI Workshop Report.** 1995. Global strategy for asthma management and prevention. National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute, Bethesda, MD. Publication No. 95-3659.

**Whitehead GS, Walker JK, Berman KG, Foster WM, Schwartz DA.** Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003 Jul;285(1):L32-42.

**Widdicombe JG.** Advances in understanding and treatment of cough. *Monaldi Arch Chest Dis.* 1999 Jun;54(3):275-9.

**Wilder JA, Collie DD, Bice DE, Tesfaigzi Y, Lyons CR, Lipscomb MF.** Ovalbumin aerosols induce airway hyperreactivity in naive DO11.10 T cell receptor transgenic mice without pulmonary eosinophilia or OVA-specific antibody. *J Leukoc Biol.* 2001 Apr;69(4):538-47.

**Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, Halburnt-Rush LL, Pingsterhaus JM, Edwards KM, Wright PF, Crowe JE Jr.** Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med.* 2004 Jan 29;350(5):443-50.

**Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, Donaldson DD.** Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science.* 1998 Dec 18;282(5397):2258-61.

**Wills-Karp M.** Trophic slime, allergic slime. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000 Jun;22(6):637-9.

**Wolf SF et al.** Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J Immunol.* 1991. 146: 3074-81.

**Wright AL, Holberg CJ, Martinez FD, Morgan WJ, Taussig LM.** Breast feeding and lower respiratory tract illness in the first year of life. *Group Health Medical Associates. BMJ.* 1989. 299:946-949.

**Yamaguchi Y, Hayashi Y, Sugama Y, Miura Y, Kasahara T, Kitamura S, Torisu M, Mita S, Tominaga A, Takatsu K.** Highly purified murine interleukin 5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil chemotactic factor. *J Exp Med.* 1988 May 1;167(5):1737-42.

**Yamamoto H, Sedgwick JB, Busse WW.** Differential regulation of eosinophil adhesion and transmigration by pulmonary microvascular endothelial cells. *J Immunol.* 1998 Jul 15;161(2):971-7.

**Yamamoto M, Takeda K, Akira S.** TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol Immunol.* 2004 Feb;40(12):861-8.

**Yanai M, Sekizawa K, Ohru T, Sasaki H, Takishima T.** Site of airway obstruction in pulmonary disease: direct measurement of intrabronchial pressure. *J Appl Physiol.* 1992 Mar;72(3):1016-23.

**Yiamouyiannis CA, Schramm CM, Puddington L, Stengel P, Baradaran-Hosseini E, Wolyniec WW, Whiteley HE, Thrall RS.** Shifts in lung lymphocyte profiles correlate with the sequential development of acute allergic and chronic tolerant stages in a murine asthma model. *Am J Pathol.* 1999 Jun;154(6):1911-21.

**Ying S, Robinson DS, Meng Q, Rottman J, Kennedy R, Ringler DJ, Mackay CR, Daugherty BL, Springer MS, Durham SR, Williams TJ, Kay AB.** Enhanced expression of eotaxin and CCR3 mRNA and protein in atopic asthma. Association with airway hyperresponsiveness and predominant co-localization of eotaxin mRNA to bronchial epithelial and endothelial cells. *Eur J Immunol.* 1997 Dec;27(12):3507-16.

**Ying S, Meng Q, Zeibecoglou K, Robinson DS, Macfarlane A, Humbert M, Kay AB.** Eosinophil chemotactic chemokines (eotaxin, eotaxin-2, RANTES, monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C chemokine receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and nonatopic (Intrinsic) asthmatics. *J Immunol.* 1999 Dec 1;163(11):6321-9.

**Yoshimoto T, Bendelac A, Hu-Li J, Paul WE.** Defective IgE production by SJL mice is linked to the absence of CD4+, NK1.1+ T cells that promptly produce interleukin 4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Dec 5;92(25):11931-4.

**Yu CK, Shieh CM, Lei HY.** Repeated intratracheal inoculation of house dust mite (*Dermatophagoides farinae*) induces pulmonary eosinophilic inflammation and IgE antibody production in mice. *J Allergy Clin Immunol.* 1999 Jul;104(1):228-36.

**Zhang HY, Phan SH.** Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor beta(1). *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999 Dec;21(6):658-65.

**Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, Zhang Y, Elias JA.** Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest.* 1999 Mar;103(6):779-88.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

|                     |  |
|---------------------|--|
| AHR                 | Atemwegshyperreagibilität                    |
| Al(OH) <sub>3</sub> | Aluminiumhydroxyd                            |
| α-SMA               | α-smooth muscle actin                        |
| APC                 | Antigen-präsentierende Zelle                 |
| aRNA                | amplified RNA                                |
| BAL                 | broncho-alveoläre Lavage                     |
| BCR                 | B-Zell-Rezeptor                              |
| BE                  | Bronchialepithel                             |
| CBA                 | Cytometric bead array                        |
| CCR-3               | Chemokin-Rezeptor-3                          |
| CD-4 <sup>+</sup>   | CD4-positiv                                  |
| CD-40               | Cluster of differentiation                   |
| cDNA                | complementary DNA                            |
| Col                 | Kollagen                                     |
| CpG                 | Cytosin-Phosphat-Guanin                      |
| Cy3                 | Cyanin-3                                     |
| Cy5                 | Cyanin-5                                     |
| DA                  | Ductus alveolaris                            |
| DC                  | dendritische Zelle                           |
| DEPC                | Diethylpyrocarbonat                          |
| DNA                 | Desoxyribonucleinsäure                       |
| dNTP                | Desoxynucleotidphosphat                      |
| DO 11.10            | T-Zell-Klon DO 11.10                         |
| dscDNA              | double stranded cDNA                         |
| dsRNA               | double stranded RNA                          |
| DTT                 | Dithiothreitol                               |
| ECHRS               | European Community Respiratory Health Survey |
| ECP                 | eosinophil cationic protein                  |
| EDN                 | eosinophil-derived neuro-toxin               |
| EF <sub>50</sub>    | halbmaximaler experimatorischer Atemwefluss  |
| EPO                 | Eosinophilen-Peroxidase                      |
| Ela                 | Elastin                                      |

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| ELISA                          | Ezyme-linked Immuno-sorbend Assay                        |
| f                              | Frequenz   |
| Fb                             | Fibroblast   |
| Fc $\gamma$ RII/III            | Fc $\gamma$ -Rezeptor II/III                             |
| Fc $\epsilon$ RI               | Fc $\epsilon$ -Rezeptor I                                |
| FCS                            | fötales Kälberserum                                      |
| FITC                           | Fluoresceinisothiocyanat                                 |
| FSP                            | Fibroblasten-spezifisches Protein                        |
| GM-CSF                         | granulocyte/macrophage colony stimulating factor         |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Schwefelsäure  |
| HAV                            | Hepatitis-A Virus  |
| IFN- $\gamma$                  | Interferon- $\gamma$                                     |
| IgE                            | Immunglobulin E  |
| IgG <sub>1</sub>               | Immunglobulin G <sub>1</sub>                             |
| IgG <sub>2a</sub>              | Immunglobulin G <sub>2a</sub>                            |
| IL-?                           | Interleukin-?  |
| IL-12p35                       | IL-12-Monomer 35   |
| IL-12p70                       | IL-12-Heterodimer  |
| IL-4R                          | Interleukin-4-Rezeptor                                   |
| i.p.                           | intraperitoneal  |
| ISAAC                          | International Study of Asthma and Allergies in Childhood |
| LPS                            | Lipopolysaccharid  |
| LTC <sub>4</sub>               | Leukotrien C4  |
| LU                             | laboratory unit  |
| MBP                            | major basic protein                                      |
| MCh                            | $\beta$ -Methyl-Acetyl-Cholin                            |
| MCP-2-4                        | macrophage chemoattractant protein 2-4                   |
| MHC-II                         | major histo-compatibility complex class II               |
| MIP-1                          | macrophage inflammatory protein-1                        |
| M-MLV                          | Moloney murine lymphocyte virus                          |
| MMP-9                          | Matrix-Metallo-Proteinase                                |
| MNC                            | mononucleäre Zelle                                       |
| mRNA                           | messenger RNA  |

|                     |  |
|---------------------|--|
| NK-Zelle            | natural killer Zelle                       |
| OVA                 | Ovalbumin                                  |
| OVA <sub>spec</sub> | OVA-spezifisch                             |
| PAMP                | pattern-associated recognition particle    |
| PAS                 | Perjodsäure-Schiff-Färbung                 |
| P <sub>b</sub>      | Kammerinnendruck                           |
| PBS                 | phosphate buffered saline                  |
| PCR                 | Polymerase Ketten Reaktion                 |
| P <sub>enh</sub>    | enhanced pause                             |
| PE                  | Phycoerythrin                              |
| Per CP              | Peridinin-Chlorophyll Protein              |
| PL                  | Peritoneallavage                           |
| POD                 | Meerrettich-Peroxidase                     |
| poly (I:C)          | Poly-Inosin-poly-Cytosin                   |
| R-848               | Resiquimod                                 |
| RLT                 | Zellysepuffer                              |
| RPMI                | Rosswell Park Memorial Institute           |
| RSV                 | respiratory syncytial virus                |
| RT                  | Raumtemperatur                             |
| SC                  | seröse Zelle                               |
| SCF                 | stem cell factor                           |
| SD                  | Standardabweichung                         |
| SEB                 | Staphylokokken-Enterotoxin B               |
| SEM                 | standard error of mean                     |
| SMC                 | glatte Muskelzelle                         |
| SSC                 | saline-sodium citrate                      |
| STAT-6              | signal transducer and activator of t cells |
| TA                  | Tunica adventitia                          |
| TCR                 | T-Zell-Rezeptor                            |
| TGF- $\beta$        | transforming growth factor $\beta$         |
| TE                  | Expirationszeit                            |
| TH <sub>2</sub>     | T-Helfer                                   |
| TI                  | Inspirationszeit                           |

|               |                                 |
|---------------|---------------------------------|
| TLR           | Toll-like Rezeptor              |
| TM            | Tunica muscularis               |
| TNF- $\alpha$ | Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  |
| t-RNA         | Transport-RNA                   |
| U             | unit                            |
| VCAM-1        | vascular cell adhesion molecule |
| VLA-4         | very late antigen 4             |
| VT            | Atemzugvolumen                  |
| WHO           | world health organisation       |

## 7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 1.1.1 Ein-Jahres-Prävalenz asthmatischer Symptome in 13-14-jährigen Jugendlichen
- Abb. 1.1.3 Implikation viraler Atemwegsinfektionen beim allergischen Asthma
- Abb. 1.1.5.1 Darstellung der zentralen Bedeutung von CD4+ TH<sub>2</sub>-Zellen innerhalb der Pathogenese des allergischen Asthmas
- Abb. 1.1.5.2 Die akute Entzündungssituation beim allergischen Asthma
- Abb. 1.2.1 Mechanismen der akuten und chronischen allergischen Entzündung und der damit verbundenen Remodeling-Prozesse
- Abb. 1.3.2 Schematischer Aufbau des Head-out Body-Plethysmographen
- Abb. 2.2.1 Protokoll zur allergischen Sensibilisierung, Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung und Immunmodulation durch TLR-3- bzw. TLR-7-Aktivierung während der Sensibilisierungsphase
- Abb. 2.2.2 Protokoll zur allergischen Sensibilisierung, Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung und Immunmodulation der sekundären Immunantwort durch TLR-3- bzw. TLR-7-Aktivierung
- Abb. 2.2.3 Protokoll zur allergischen Sensibilisierung, Induktion einer chronisch-allergischen Atemwegsentzündung und der Applikation des CCR-3-Antagonisten
- Abb. 3.1.1 Beeinflussung der OVA-spezifischen Immunglobulintiter im Serum durch Applikation viraler TLR-Liganden während der Sensibilisierungsreaktion
- Abb. 3.1.2 Beeinflussung der allergischen Entzündung durch virale TLR-Liganden: A) Anzahl eosinophiler Granulozyten in broncho-alveolärer Lavage-Flüssigkeit (BALF) ; B) Interleukin-5-Konzentration in BALF
- Abb. 3.1.3 Beeinflussung der allergischen Entzündung durch virale TLR-Liganden: Allergische Atemwegspathologie
- Abb. 3.1.4 Einfluss viraler TLR-Liganden auf die Atemwegsreabilität
- Abb. 3.2.1 Beeinflussung der OVA-spezifischen Immunglobulintiter im Serum durch Applikation viraler TLR-Liganden während der Sensibilisierungsreaktion
- Abb. 3.2.2 Beeinflussung der allergischen Entzündung durch virale TLR-Liganden: A) Anzahl eosinophiler Granulozyten in broncho-alveolärer Lavage-Flüssigkeit (BALF) ; B) Interleukin-5-Konzentration in BALF



- Abb. 3.2.3 Beeinflussung der allergischen Entzündung durch virale TLR-Liganden: Allergische Atemwegspathologie
- Abb. 3.2.4 Einfluss viraler TLR-Liganden auf die Atemwegsreabilität
- Abb. 3.3.1 Quantitative Expressionsanalyse der Transkriptionsfaktoren T-bet, GATA-3 und Fox P3 in Reaktion auf virale TLR-Liganden
- Abb. 3.3.2 Zytokinkonzentrationen in Zellkulturüberständen in Reaktion auf virale TLR-Liganden
- Abb. 3.4.1 Beeinflussung der Interleukin-12-Konzentration in Peritoneallavage-Flüssigkeit durch virale TLR-Liganden
- Abb. 3.4.2 Beeinflussung der OVA-spezifischen Immunglobulintiter im Serum durch Applikation viraler TLR-Liganden in IL-12 <sup>-/-</sup> BALB/c Mäusen
- Abb. 3.4.3 Beeinflussung der allergischen Entzündung durch virale TLR-Liganden in IL-12 <sup>-/-</sup> BALB/c Tieren: A) Anzahl eosinophiler Granulozyten in broncho-alveolärer Lavage-Flüssigkeit (BALF) ; B) Interleukin-5-Konzentration in BALF
- Abb. 3.4.4 Beeinflussung der allergischen Entzündung durch virale TLR-Liganden in IL-12 <sup>-/-</sup> BALB/c Tieren: Allergische Atemwegspathologie
- Abb. 3.4.5 Einfluss viraler TLR-Liganden auf die Atemwegsreabilität in IL-12 <sup>-/-</sup> BALB/c Tieren
- Abb. 3.5.1 Leukozytensubpopulationen in broncho-alveolärer Lavage-Flüssigkeit (BALF) nach chronischer Allergenprovokation
- Abb. 3.5.2 Zytokinkonzentration in BALF nach chronischer Allergenprovokation
- Abb. 3.5.3 Allergische Atemwegspathologie nach chronischer Allergenprovokation
- Abb. 3.5.4 Leukozytensubpopulationen der chronisch allergischen Atemwegsentzündung
- Abb. 3.5.5 Intraepitheliale eosinophile Granulozyten nach chronischer Allergenprovokation
- Abb. 3.6.1 Allergische Atemwegspathologie nach chronischer Allergenprovokation
- Abb. 3.6.2 Allergische Atemwegspathologie nach chronischer Allergenprovokation – Ultrastruktur
- Abb. 3.6.3 Allergische Atemwegspathologie nach chronischer Allergenprovokation
- Abb. 3.6.4 Allergische Atemwegspathologie nach chronischer Allergenprovokation

- Abb. 3.7.1 Einfluss chronischer Allergenprovokation auf die Lungenfunktion: A) Atemwegsreabilität gegenüber  $\beta$ -Methyl-Acetylcholin; B) Atemphysiologie
- Abb. 3.8.1 Einfluss des CCR-3-Antagonisten auf das experimentelle Asthma: A) Atemwegsreabilität gegenüber  $\beta$ -Methyl-Acetylcholin; B) Atemphysiologie
- Abb. 3.8.2 Einfluss des CCR-3-Antagonisten auf die allergische Atemwegspathologie
- Abb. 3.8.3 Einfluss des CCR-3-Antagonisten auf die allergische Atemwegsentzündung
- Abb. 3.8.4 Einfluss des CCR-3-Antagonisten auf die allergische Atemwegspathologie
- Tab. 1.1.3 Toll-like Rezeptor-Liganden und ihr Einfluss auf die Pathologie des allergischen Asthma
- Tab. 3.5.1 Differentielle Genexpression in Lymphozyten aus akuter (A) bzw. chronischer (B) Atemwegsentzündung
- Tab. 3.5.4 Leukozytensubpopulationen der allergischen Atemwegsentzündung
- Tab. 3.8.1 Die anti-inflammatorischen Effekte des CCR-3-Antagonisten auf die akute allergische Atemwegsentzündung

## 8. Publikationsverzeichnis aus der Dissertation

### a) Publikationen aus dieser Arbeit:

**Wegmann M**, Renz H. Animal Models of Experimental Asthma. In *Animal Models of T Cell Mediated Skin Diseases*, Ernst Schering Res Found Workshop. Axel Springer Verlag 2004(50):69-87

**Wegmann M**, Renz H. Tiermodelle für Entzündungsmechanismen der Lunge. In *Aerosole in der Inhalationstherapie VIII* Dustri Verlag 2004

**Wegmann M**, Fehrenbach H, Fehrenbach A, Held T, Schramm C, Garn H, Renz H. Involvement of distal airways in a chronic model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy*. 2005;35:1263-1271.

**Wegmann M**, Goeggel R, Sel S, Kalkbrenner F, Renz H, Garn H. A low molecular weight CCR-3 antagonist prevents from airway remodeling in a mouse model of established experimental asthma. (submitted)

**Wegmann M**, Sel S, Bauer S, Garn H, Alber G, Renz H, Sel S. Prevention and suppression of primary and secondary reactions of experimental asthma via TLR-3 or TLR-7 activation. (submitted)

### b) Ergebnisse dieser Arbeit wurden bisher vorgestellt auf Kongressen der ATS, AAAAI, EAACI, DGP und DGAI:

**Wegmann M**, Fehrenbach H, Held T, Schramm C, Renz H. Chronic Allergen Challenge Induces Chronic Inflammation and Remodelling in Central and Peripheral Airways in a Mouse Model of Experimental Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 169(7): A304

Sel S, **Wegmann M**, Renz H. Activation of Toll-like Receptor 3 by Polyinosinic:Polycytidylic Acid Inhibits Experimental Asthma in BALB/c Mice. Virus Gene 3 (EBI3) Deficient Mice Do Not Develop Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 169(7): A716

Sel S, **Wegmann M**, Sel S, Renz H. Polyinosin-Polycytodylsäure verhindert experimentelles Asthma in BALB/c-Mäusen. *Allergo Journal*. 2004; 13: 42

**Wegmann M**, Held T, Schramm C, Herz U, Renz H. Etablierung eines Mausmodells für das chronische Asthma bronchiale. *Allergo Journal*. 2004; 13: 45

Sel S, Sel S, **Wegmann M**, Renz H. Die Suppression von etabliertem Asthma mittels TLR-7-Liganden R-848 ist teilweise IL-12 abhängig.  
Allergo Journal. 2005; 14(1): 38.

**Wegmann M**, Sel S, Sel S, Garn H, Renz H. Der therapeutische Effekt des TLR-7-Liganden Resiquimod auf das experimentelle Asthma ist IL-12-abhängig.  
Pneumologie. 2005; 1(59): 59

**Wegmann M**, Fehrenbach H, Fehrenbach A, Held T, Schramm C, Garn H, Renz H. Inflammation and Remodelling of Distal Airways in a Murine Model of Chronic Experimental Asthma.  
J Allergy Clin Immunol. 115(2): S205

Sel S, Sel S, **Wegmann M**, Garn H, Alber G, Renz H. Suppression of Established Experimental Asthma by Toll-like Receptor 7 Activation.  
J Allergy Clin Immunol. 115(2): S64

**Wegmann M**, Sel S, Sel S, Garn H, Renz H. Suppression of Experimental Asthma by Toll-like Receptor 3 Activation Requires IL-12.  
3<sup>rd</sup> EAACI Davos Meeting, Davos, Switzerland

**Wegmann M**, Sel S, Sel S, Alber G, Garn H, Renz H. Attenuation of of experimental asthma pathology by TLR-3 activation partially depends on IL-12.  
Proc ATS 2005; 2: A15

Luger EO, Fokuhl V, **Wegmann M**, Renz H, Radbruch A. The persistence of allergen-specific IgE and long-lived plasma cells.  
FOCIS Meeting 2005, Boston, USA

Luger EO, Fokuhl V, **Wegmann M**, Renz H, Radbruch A. Long-lived plasma cells and the persistence of allergen-specific IgE.  
Allergy Clin Immunol Int. 2005. Suppl. 1: 4

Hahn C, **Wegmann M**, Renz H, Nockher WA. Increased nerve growth factor (NGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) production in in vitro generated lung fibroblasts.  
Allergy Clin Immunol Int. 2005. Suppl. 1: 36

Sel S, Sel S, **Wegmann M**, Garn H, Renz H. Attenuation of experimental asthma by activation of TLR-7 partially depends on IL-12.  
Allergy Clin Immunol Int. 2005. Suppl. 1: 96

Presser K, **Wegmann M**, Lohse A, Blessing, Schramm C. CD4+CD25+ regulatory T cells modulate airway hyperreactivity via TGF- $\beta$ 1  
Immunobiology 2005 (10): 408

## 9. Zusammenfassung

Das allergische Asthma ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege, die mit einer erhöhten Mukusproduktion, verschiedenen strukturellen Veränderungen der Atemwege und der Entwicklung einer Atemwegshyperreagibilität einhergeht. Die Vielfalt der Faktoren, die zur Initiation, Progression und Chronifizierung dieser Erkrankung beitragen ist ebenso komplex, wie ihr Phänotyp. In epidemiologischen Studien konnten bislang neben genetischen Faktoren auch Umweltfaktoren, wie der Lebens- und Hygienestandard, mit der Entwicklung dieser Erkrankung assoziiert werden. Daneben wurden im Rahmen der Hygiene-Hypothese Einflüsse identifiziert, die eher mit einem erniedrigten Risiko für die Entwicklung dieser Erkrankung einhergehen. Ganz besonders kontrovers wird in diesem Zusammenhang die Rolle viraler Infektionen der Atemwege beschrieben, wie sie durch das Respiratory Syncytial Virus (RSV) oder Rhinoviren verursacht werden. Solche Infektionen verursachen zumeist eine Exazerbation des bereits etablierten Asthmas, werden allerdings, zumal wenn sie im Kindesalter auftreten, sowohl mit einer initialisierenden wie auch mit einer protektiven Wirkung in Zusammenhang gebracht. Möglicherweise spielen dabei virale Toll-like Rezeptor- (TLR-) Liganden, wie virale einzel- bzw. doppelsträngige RNA eine bedeutende Rolle. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde speziell die Wirkung dieser TLR-3- bzw. TLR-7-Liganden auf die allergische Sensibilisierungs- bzw. Entzündungsreaktion untersucht. Im Mausmodell für das allergische Asthma konnte durch die systemische Applikation von synthetische TLR-3- oder TLR-7-Liganden die allergische Sensibilisierungsreaktion vollständig verhindert werden. Bei bereits erfolgter allergischer Sensibilisierung war die sekundäre Entzündungsreaktion in der Lunge nach Allergen-Rechallenge deutlich vermindert, wenn zuvor virale TLR-Liganden appliziert wurden. Sowohl die Infiltration eosinophiler Granulozyten, wie auch der Lymphozyten in das Lungengewebe als auch die bronchiale Hyperreagibilität waren signifikant erniedrigt. Daneben fanden sich Hinweise auf die Initiation einer allergenspezifischen TH<sub>1</sub>-Antwort. Da nach intra-peritonealer Injektion synthetischer TLR-3- bzw. TLR-7-Liganden Peritonealmakrophagen mit der Produktion von Interleukin 12 (IL-2) reagierten, wurde weiterhin die Rolle von IL-12 in diesem Zusammenhang näher charakterisiert. In sensibilisierten IL-12p35 defizienten Tieren hatte die Applikation viraler TLR-Liganden keine Verminderung der allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge zur Folge. Auch die Atemwegshyperreagibilität blieb unverändert. Somit könnte die

protektive Wirkung viraler Infektionen im Kindesalter auf eine durch virale TLR-Liganden induzierte TH<sub>1</sub>-Antwort basieren, die auf eine allergenspezifische TH<sub>2</sub>-Antwort gegenregulatorisch wirkt. Dieser Effekt scheint zumindest zum Teil durch IL-12 mediert zu sein.

Um die Rolle weiterer Faktoren innerhalb des Chronifizierungsprozesses des allergischen Asthmas zu charakterisieren wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit ein Mausmodell etabliert, das den Phänotyp dieser Erkrankung möglichst komplett widerspiegelt. Durch eine zwölf-wöchige Allergenexposition wurde in sensibilisierten Mäusen eine chronische Entzündung der Atemwege induziert, die lymphozyten-dominant ist und über einen Zeitraum von mindestens sechs Wochen nach Allergenkontakt persistiert. Die chronische Atemwegsentzündung ist dabei mit umfangreichen strukturellen Veränderungen der Atemwege, wie einer subepithelialen Fibrose, einer Becherzellhyperplasie und dem vermehrten Vorkommen von Fibroblasten und Myofibroblasten in der Atemwegswand assoziiert. Im Gegensatz zu vergleichbaren Modellen wiesen diese Tiere eine deutlich verstärkte Atemwegshyperreabilität sowie eine persistierende Atemwegflusslimitation auf.

In diesem Modell wurde nach vierwöchiger Allergenprovokation, die eine profunde Atemwegsentzündung allerdings ohne strukturelle Atemwegsveränderungen hervorrief, die weitere Infiltration eosinophiler Granulozyten durch die Applikation eines CCR-3-Antagonisten verhindert, um die Rolle dieser Zellen innerhalb des Chronifizierungsprozesses zu untersuchen. Durch die Applikation des CCR-3-Antagonisten konnte nicht nur die Infiltration eosinophiler Granulozyten, sondern auch eine subepitheliale Fibrose verhindert werden. Weiterhin zeigten diese Tiere eine erhebliche Verbesserung der Atemwegsreabilität. Somit spielen eosinophile Granulozyten eine entscheidende Rolle innerhalb der Prozesse, die sowohl in einem strukturellen Umbau der Atemwege wie auch in einer gesteigerten Atemwegsreagibilität resultieren.

## **10. Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren bzw. Privat-Dozenten in Marburg:

Aumüller, Bestgen, Biederbick, Czubayko, Daut, Dressler, Elsässer, Emmrich, Feuser, Frenking, Garten, Gudermann, Hartmann, Hasilik, Heeg, Herz, Jungclas, Kaiser, Kern, Kirchner, Klenk, Kohlmeyer, Koolmann, Lammel, Lill, Löffler, Mandrek, Mazumdar, McGregor, Moll, Mutters, Müller, Ramaswamy, Renz, Richter, Rogausch, Röhm, Schäfer, Seitz, Stöckmann, Tampé, Wagner.

In Leipzig: Emmrich, Oertel.

## 11. Curriculum vitae

Diplom Humanbiologe Michael Wegmann

Anschrift (dienstlich) Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik  
Klinikum der Philipps-Universität Marburg  
Biomedizinisches Forschungszentrum (BMFZ)  
Hans-Meerwein-Strasse 3  
35043 Marburg

Geb.-Datum 21. April 1977

Geb.-Ort Münster i.W.

1983 - 1987 Grundschule Wilhelmschule Emsdetten

1987 - 1996 Gymnasium Martinum Emsdetten  
(Abiturnote: 1,5)

1996 - 1997 Zivildienst im Pflegebereich, Marienhospital Emsdetten  
Station Innere Medizin

WS 97/98 – SS 2002 Diplomstudiengang Humanbiologie an der Philipps-  
Universität Marburg

SS 1999 Diplom-Vorprüfung (Note: 1,0)

SS 2000 Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin,  
Universität Leipzig (Prof. Dr. Emmrich)

WS 01/02 – SS 2002 Diplomarbeit: „Etablierung und Charakterisierung eines  
Mausmodells für die COPD“ (Note: 1,0)

WS 02/03 Beginn der Promotion in der Abteilung Klinische Chemie  
und Molekulare Diagnostik (Prof. Dr. Renz)

seit 2004 Fellow in-training der American Academy of Allergy,  
Asthma & Immunology (AAAAI), Junior-Member der  
American Thoracic Society (ATS) und der European  
Academy of Allergy and Clinical Immunology (EACI)

seit 2005 Gutachter für die Zeitschrift *Environmental Research*

Preise International Scholarship Grant der AAAAI 2005  
Travel Grant der EACI 2005



## 12. Publikationsliste

1. **Wegmann M**, Fehrenbach H, Fehrenbach A, Held T, Schramm C, Garn H, Renz H. Involvement of distal airways in a chronic model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy*. 2005; 35:1263-1271.
2. Stech J, Garn H, **Wegmann M**, Wagner R, Klenk HD. A new approach to an influenza live vaccine: modification of the cleavage site of hemagglutinin. *Nat Med*. 2005 Jun;11(6):683-9.
3. **Wegmann M**, Fehrenbach A, Heimann S, Fehrenbach H, Renz H, Garn H, Herz U. NO<sub>2</sub>-induced airway inflammation is associated with progressive airflow limitation and development of emphysema-like lesion in C57BL/6 mice. *Exp Tox Pathol* 2005; 56(6): 341-350
4. Blümer N, Herz U, **Wegmann M**, Renz H. Prenatal lipopolysaccharide-exposure prevents allergic sensitization and airway inflammation, but not airway hyperresponsiveness in a murine model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 397-402
5. Bündler R, Mittermann I, Herz U, Focke M, **Wegmann M**, Valenta R, Renz H. Induction of autoallergy with an environmental allergen mimicking a self protein in a murine model of experimental allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2004; 114: 422-28
6. Heverhagen JT, Hahn HK, **Wegmann M**, Herz U, Whitaker CD, Matschel V, Alfke H. Volumetric analysis of mice lungs in a clinical magnetic resonance imaging scanner. *MAGMA*. 2004 Nov;17(2):80-5
7. Voswinckel R, Motejl V, Fehrenbach A, **Wegmann M**, Mehling T, Fehrenbach H, Seeger W. Characterisation of post-pneumonectomy lung growth in adult mice. *Eur Respir J*. 2004 Oct;24(4):524-32
8. **Wegmann M**, Renz H. Animal Models of Experimental Asthma. In *Animal Models of T Cell Mediated Skin Diseases*, Ernst Schering Res Found Workshop. Axel Springer Verlag 2004(50):69-87
9. **Wegmann M**, Renz H. Tiermodelle für Entzündungsmechanismen der Lunge. In *Aerosole in der Inhalationstherapie VIII* Dustri Verlag 2004
10. **Wegmann M**, Renz H, Herz U. Long-term NO<sub>2</sub> exposure induces pulmonary inflammation and progressive development of airflow obstruction in C57BL/6 mice: a mouse model for chronic obstructive pulmonary disease? *Pathobiology*. 2002-2003;70(5):284-6

### **13. Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die in dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel **“Zur Initiation, Progression und Chronifizierung des allergischen Asthma bronchiale“** in der Abteilung Klinische Chemie und molekulare Diagnostik des Universitätsklinikums Marburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Renz ohne Hilfe Dritter selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Arbeit angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den .....

(Michael Wegmann)

## **14. Danksagung**

Die vorliegende Dissertationsarbeit wurde in der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik des Klinikums der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Harald Renz angefertigt.

Herr Prof. Dr. Harald Renz möchte ich für die ausgezeichnete Betreuung sowie für die Möglichkeit, die Dissertationsarbeit in seiner Abteilung durchführen zu können, danken.

Frau Anja Spies möchte ich an dieser Stelle für die aufopferungsvolle und exzellente technische Unterstützung danken, ohne die eine solche tierexperimentelle Arbeit nur unter sehr viel schwereren Bedingungen hätte durchgeführt werden können.

Vielen Dank an Herr Dr. Holger Garn für die ständige Diskussionsbereitschaft, die zur Durchführung und Niederschrift dieser Arbeit in erheblichem Maß beigetragen hat.

Den Herren Dr. Serdar Sel und Sarper Sel vielen Dank für die gute Kooperation innerhalb der an dieser Arbeit beteiligten Projekte.

Frau Dr. Antonia Fehrenbach, sowie Herrn Prof. Dr. Fehrenbach möchte ich für die ausgezeichnete Hilfe danken, die sie mir als Morphologen bieten konnten, was bei der Beurteilung struktureller Veränderungen mehr als notwendig war.

Den Auszubildenden Anika Rühl und Nadine Müller sei an dieser Stelle für die ständige technische Unterstützung gedankt. Genauso möchte ich den übrigen wissenschaftlichen und technischen Mitarbeitern unseres Instituts danken.

Meinen Freunden Frederik Knapp, Thomas T. Tapmeier, Simone Heimann und Tobias Lerche danke ich für die notwendige Unterstützung, die mir während der Arbeit so manchmal nötig war.

Thorsten Held gebührt an dieser Stelle Dank, da er als medizinischer Doktorand großen Anteil an der Etablierung des Tiermodells gehabt hat.

Vielen Dank gilt natürlich auch meiner Familie Klemens, Ursula, Marion, Klaus und Rosa und natürlich meiner Partnerin Christina Wagner, die mich auf meinem bisherigen Weg so ausdauernd begleitet haben.

**Danke!**