

**Aus der Abteilung Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik der  
Philipps-Universität Marburg**

Direktor: Prof. Dr. med. Harald Renz

**Untersuchungen über die antiinflammatorischen  
Eigenschaften des alpha-Melanozyten-stimulierenden-  
Hormones im Bezug auf die allergische  
Atemwegsentzündung**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität vorgelegt von

**Sirius Benjamin Sohl**

aus Heidelberg

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am  
28. 07. 2005.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. Bernhard Maisch

Referent: Prof. Dr. med. Harald Renz

Korreferent: Prof. Dr. med. Michael Hertl

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... V****ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS ..... VII****1 EINLEITUNG ..... 1****1.1 Das Asthma bronchiale ..... 1**

1.1.1 Epidemiologie des Asthma bronchiale ..... 2

1.1.2 Die Immunologische Entzündung ..... 3

1.1.3 Umwelteinflüsse und Genetik..... 8

1.1.4 Neuronale Fehlregulation beim Asthma bronchiale ..... 10

1.1.5 Therapie und Prognose des Asthma bronchiale ..... 12

1.1.6 Das Mausmodell für allergische Erkrankungen ..... 15

**1.2 Das Neuropeptid  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon..... 17**1.2.1 Der Ursprung des Neuropeptids  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon (MSH) 171.2.2 Primäre Funktionen des  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierendem Hormons ..... 171.2.3 Die immunmodulatorischen Effekte des  $\alpha$ -Melanozyten-  
stimulierenden Hormons  
*in vivo* ..... 19**1.3 Zielsetzung der vorgelegten Arbeit ..... 21****2 ERGEBNISSE..... 23****2.1 Die allergische Atemwegsentzündung ..... 23**

2.1.1 Serum-Immunglobulinproduktion ..... 23

2.1.2 Zellzusammensetzung der BAL ..... 23

2.1.3 Zytokinkonzentrationen in der BAL ..... 25

**2.2 Alpha-MSH in der Lunge..... 27**

2.2.1 Alpha-MSH ist in der BAL nachweisbar ..... 27

2.2.2 Alpha-MSH ist in der BAL allergensierter Tiere erniedrigt ..... 28

2.2.3 Alpha-MSH Kinetik ..... 29

**2.3 Die funktionelle Rolle von  $\alpha$ -MSH bei der allergischen Atemwegsentzündung . 31**2.3.1 Alpha-MSH senkt die Produktion allergenspezifischer IgE, IgG1 und IgG2a  
Antikörper ..... 31

2.3.2 Alpha-MSH reduziert den Influx eosinophiler Granulozyten in der BAL ..... 33

2.3.3 Der Einfluss von  $\alpha$ -MSH auf die Zellzusammensetzung in der BAL..... 34

2.3.4 Alpha-MSH senkt die Konzentrationen inflammatorischer Zytokine in der BAL.. 35

2.3.5 Alpha-MSH steigert die Interleukin-10-Konzentration in der BAL..... 37

2.3.6 FACS-Analyse aktivierter Makrophagen in der BAL..... 38

2.3.7 Alpha-MSH verhindert die peribronchiale entzündliche Infiltration ..... 39

2.3.8 Alpha-MSH verhindert nicht die Atemwegshyperreagibilität ..... 41

**2.4 Ein potentieller Mechanismus von alpha-MSH ..... 43**2.4.1 Alpha-MSH zeigt keine antiinflammatorische Wirkung bei IL-10 *knock-out*  
Mäusen..... 432.4.2 Alpha-MSH verhindert die allergische Atemwegsentzündung bei C57BL/6 wt  
Mäusen..... 44

<b>3 DISKUSSION</b> .....	<b>48</b>
3.1 Der erstmalige Nachweis von $\alpha$ -MSH in der Lunge .....	48
3.2 Niedrige Konzentrationen der allergenspezifischen Immunglobuline bei unverändert hohen gesamt IgE-Werten.....	49
3.3 Kein Influx eosinophiler Granulozyten trotz erhöhtem IL-5 .....	50
3.4 Verhinderung der allergischen Entzündung, nicht aber der Atemwegshyperreagibilität.....	51
3.5 Ein potentieller Wirkmechanismus von $\alpha$ -MSH – via Induktion von IL-10.....	52
<b>4 ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>56</b>
<b>5 METHODEN</b> .....	<b>59</b>
<b>5.1 Behandlungsprotokolle</b> .....	<b>59</b>
5.1.1 Tierhaltung und -pflege .....	59
5.1.2 Wahl der Behandlung.....	60
5.1.3 Studiendesign .....	60
5.1.4 Sensibilisierung .....	62
5.1.5 Applikation der Neuropeptide.....	63
5.1.6 Aerosolische Allergenprovokation.....	64
5.1.7 Bodyplethysmographie.....	64
5.1.8 Gewinnung von Serum.....	66
5.1.9 Broncho-alveoläre Lavage (BAL).....	67
<b>5.2 Zellzählung</b> .....	<b>67</b>
<b>5.3 Cytospin</b> .....	<b>68</b>
<b>5.4 Zytokin-ELISA</b> .....	<b>69</b>
5.4.1 ELISA für IL-4 / IL-5 / IFN- $\gamma$ .....	70
5.4.2 ELISA für IL-10 / IL-13 .....	71
<b>5.5 Immunglobulin-ELISA</b> .....	<b>73</b>
<b>5.6 Radioimmunoassay</b> .....	<b>74</b>
<b>5.7 FACS-Analyse von BAL-Makrophagen</b> .....	<b>75</b>
<b>5.8 Gewebefixierung und Gewebeschnitte</b> .....	<b>77</b>
<b>5.9 Statistische Analyse</b> .....	<b>77</b>
<b>6 MATERIAL UND GERÄTE</b> .....	<b>78</b>
<b>6.1 Tiere</b> .....	<b>78</b>
<b>6.2 Geräte und Hilfsmittel</b> .....	<b>78</b>
<b>6.3 Materialien</b> .....	<b>79</b>
6.3.1 Reagenzien und Chemikalien .....	79
6.3.2 Verbrauchsmaterial .....	80
6.3.3 Antikörper und Neuropeptide .....	81
6.3.4 Lösungen.....	82
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>85</b>
<b>8 ANHANG</b> .....	<b>97</b>

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -MSH	$\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes-Hormon
$\gamma$ -MSH	$\gamma_2$ -Melanozyten-stimulierendes-Hormon
AHR	Atemwegshyperreagibilität
Ach	Acetylcholin
ACTH	Adrenocorticotrophes-Hormon
ÄDA	Ärzteverband Deutscher Allergologen
AK	Antikörper
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
BAL	Broncho-alveoläre Lavage
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Einteilung der Oberflächenmoleküle ( <i>cluster of designation</i> )
DGAI	Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie
DNFB	Dinitrofluorobenzol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EF <sub>50</sub>	Mittlere Expirationsflussrate
ELISA	Enzymgekoppelte immunabsorptions- Analyse ( <i>Enzyme-linked immuno-sorbent assay</i> )
EPO	Eosinophilenperoxidase
FACS	Floureszenzaktivierter Zellsorter ( <i>fluorescent activated cell sorter</i> )
Fc	Kristallisierbarer Teil eines Antikörpers
FKS	Fötales Kalbserum ( <i>fetal calf serum</i> )
i. p.	Intraperitoneal
i. v.	Intravenös
ICAM	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül ( <i>intracellular adhesion molecule</i> )
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LA	Lichtabschluss

---

LU	Labor-Units
MAC	Makrophagenaktivierungskomplex
MBP	<i>Major basic protein</i>
MC	Melanocortin-Rezeptor
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Genkomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
MTP	Mikrotiterplatte
MW	Mittelwert
NIL	Behandlung ohne Wirkstoff
NKA/NKB	Neurokinin-A und -B
NT-3	Norotrophin-3
OVA	Ovalbumin
OX	Oxazon
PBS	Phosphat gepufferte Natriumchloridlösung
PC	Prohormon-Convertase
PEG	Polyethylenglycol
POD	Peroxidase
POMC	Proopiomelanocortin
RIA	Radioimmunoassay
RNS	Ribonukleinsäure
RSV	Respiratorischer Synzytialvirus ( <i>Respiratory Syncytial Virus</i> )
RT	Raumtemperatur
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SP	Substanz P
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TH	T-Helfer (im Rahmen von T-Helfer Zelle)
TNCB	Trinitrochlorobenzol
TNF	Tumornekrosefaktor
TZR	T-Zell-Rezeptor
UV	Ultra-violett
VCAM	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül ( <i>Vascular cell adhesion molecule</i> )
wt	Wildtyp
-/-	<i>knock-out</i>

## **Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

Abb. 1.1	Medizinische Versorgung an Allergien leidender Bundesbürger.....	2
Abb. 1.2	Schematische Darstellung der zentralen Rolle einer TH2-Zelle in der allergischen Atemwegsentzündung.....	7
Abb. 1.3	Neurotrophinvermittelte neuronale und immunologische Plastizität während der allergischen Atemwegsentzündung....	11
Abb. 1.4	Das Konzept der neurogenen Entzündung.....	12
Abb. 2.1	Serum Immunglobulinkonzentrationen 48 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation.....	24
Abb. 2.2	Leukozytenzahlen in der BAL 48 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation.....	25
Abb. 2.3	Zytokinkonzentrationen in der BAL 48 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation.....	26
Abb. 2.4	$\alpha$ -MSH-Konzentrationen in der BAL.....	27
Abb. 2.5	$\alpha$ -MSH-Konzentrationen in der BAL 24 und 48 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation.....	28
Abb. 2.6	Kinetik der $\alpha$ -MSH-Konzentrationen in der BAL nach aerosolischer Allergenprovokation über 16 Tage.....	30
Abb. 2.7	Immunglobulinkonzentrationen im Serum 48 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation.....	32
Abb. 2.8	Eosinophile Granulozyten in der BAL 48 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation.....	33
Abb. 2.9	Leukozytenzahlen in der BAL 48 Stunden nach aerosolischer Allergenparovokation.....	35
Abb. 2.10	Zytokinkonzentrationen in der BAL 48 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation.....	37
Abb. 2.11	IL-10-Konzentrationen in der BAL 48 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation.....	38
Abb. 2.12	FACS-Analyse von BAL-Leukozyten 48 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation.....	39
Abb. 2.13 A	Histologisches Präparat einer Lunge 48 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation. NIL-Gruppe.....	40

---

Abb. 2.13 B	Histologisches Präparat einer Lunge 48 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation. Kontrollgruppe.....	40
Abb. 2.13 C	Histologisches Präparat einer Lunge 48 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation. $\alpha$ -MSH-Gruppe.....	41
Abb. 2.14	Vergleich der Reaktion von C57BL/6 wt und C57BL/6 IL-10 <i>knock-out</i> Mäusen. Leukozytenzahlen 24 Stunden nach aerosolische Allergenprovokation.....	46
Abb. 2.15	Vergleich der Reaktion von C57BL/6 wt. und C57BL/6 IL-10 <i>knock-out</i> Mäusen. Immunglobulinkonzentrationen 24 Stunden nach aerosolische Allergenprovokation.....	47
Abb. 2.16	IL-10-Konzentrationen in der BAL 24 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation. C57BL/6 wt. Mäuse.....	45
Abb. 5.1	Allgemeines Zeitschema des Studienprotokolls.....	61
Abb. 5.2	Der <i>head-out</i> Bodyplethysmograph.....	66
Tabelle 1.1	Häufigkeit atopischer Erkrankungen in Deutschland.....	3
Tabelle 1.2	Asthmaschweregrade - Klassifizierung (Deutsche Atemwegsliga).....	13
Tabelle 1.3	Stufenplan der Asthmatherapie (Deutsche Atemwegsliga).....	13

# **1 Einleitung**

## **1.1 Das Asthma bronchiale**

Beim Asthma bronchiale handelt es sich um eine Erkrankung des atopischen Formenkreises. Definiert wird sie durch eine variable und reversible Atemwegsobstruktion infolge von Entzündung und Atemwegshyperreagibilität (AHR).<sup>1</sup> Immunologisch wird das Asthma bronchiale nach der neuesten Leitlinie der World Allergy Organisation (WAO) und der Europäischen Akademie für Allergologie und klinische Immunologie (EAACI) in das allergische und nicht-allergische Asthma differenziert. Das allergische Asthma wird dabei weiter in eine Immunglobulin E (IgE) vermittelt beziehungsweise eine nicht IgE vermittelte Form unterschieden.<sup>2</sup> Beide Formen des Asthma bronchiale, ob allergisch oder nicht-allergisch bedingt, unterscheiden sich nicht in der klinischen Beschwerdesymptomatik. Die Erkrankung ist durch periodische Anfälle von Husten, Bronchospasmus, Luftnot und vor allem einem expiratorischen Defizit gekennzeichnet. Im Intervall bleibt der Erkrankte zumeist symptomfrei.

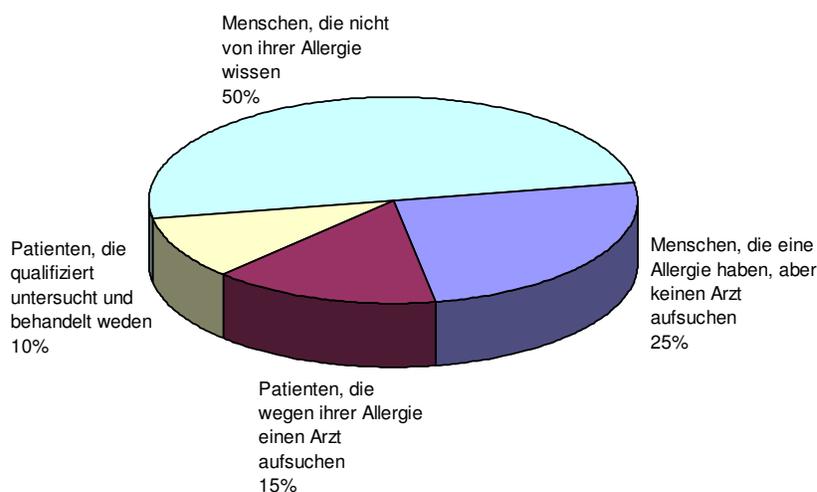
Charakteristisch für den allergischen, IgE vermittelten Typ des Asthma bronchiale ist die allergenspezifische Immunantwort mit Ausbildung von Allergen-spezifischen IgE-Antikörpern und der Nachweis von erhöhtem Gesamt-IgE.<sup>3</sup> Ferner ist dieser Typ durch eine allergische Reaktion vom Soforttyp gegenüber Aeroallergenen im Hauttest gekennzeichnet. Beim nicht allergischen Asthma fehlen allergenspezifische IgE-Antikörper, die Gesamt-IgE-Konzentration im Serum ist normal. Auch im Hauttest lassen sich keine positiven Reaktionen vom Soforttyp gegenüber Aeroallergenen nachweisen. Patienten mit einem nicht allergischen Asthma erkranken oft erst im Erwachsenenalter, dann aber mit zu meist schwerwiegenderer Symptomatik.<sup>4,5</sup> In dieser Promotionsarbeit werden vornehmlich die Belange des allergischen, IgE-vermittelten Asthma bronchiale behandelt, daher wird im Folgenden insbesondere auf diese Form des Asthma bronchiale eingegangen.

### 1.1.1 Epidemiologie des Asthma bronchiale

In den letzten Jahrzehnten sind die Inzidenz und Prävalenz allergischer Erkrankungen, besonders in den Industrienationen, fortwährend angestiegen.<sup>6,7</sup> Zwischen 1980 und 1994 betrug die Zunahme der Asthma-Erkrankungen beispielsweise in den USA 75%. Bei Kindern bis zu vier Jahren war ein Prävalenzanstieg um 160% zu verzeichnen.<sup>8</sup> Die Erstmanifestation des Asthma bronchiale liegt dabei in über 80% der Fälle vor dem 10. Lebensjahr. Zudem gilt im Allgemeinen, je früher sich das Asthma bronchiale manifestiert, desto schwerer ist der Verlauf der Erkrankung.<sup>9,10</sup>

Darüber hinaus werden nach aktuellen Informationen des Ärzteverbandes Deutscher Allergologen (ÄDA) und der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAI) nur 10% der Bundesbürger mit allergischen Erkrankungen qualifiziert versorgt (siehe auch Abb. 1.1). Insgesamt entstehen dem Gesundheitssystem in Deutschland erhebliche Kosten aufgrund Erkrankungen des atopischen Formenkreises,<sup>11</sup> die Entwicklung neuer Therapie- und Präventionsoptionen ist daher nicht nur von medizinischer, sondern auch von großer gesundheitspolitischer Bedeutung.

#### Medizinische Versorgung an Allergien leidender Bundesbürger



**Abb. 1.1:** Relative Häufigkeiten in der Versorgungsstruktur an Allergien leidender Bundesbürger. Quelle: ÄDA und DGAI.

Wesentlich wird dieser Prävalenzanstieg mit veränderten Lebensgewohnheiten und Umweltbedingungen begründet. Im Falle von Kleinkindern werden auch Virusinfektionen, wie etwa durch das *Respiratory Syncytial Virus* (RSV) und das Parainfluenzavirus, mit dem Asthma bronchiale in Verbindung gebracht.<sup>12, 13</sup> Des Weiteren sollen Infektionen mit dem RSV in früher Kindheit eine Ausprägung des Asthma bronchiale zu einem späteren Zeitpunkt begünstigen.<sup>14</sup> Diesem Ergebnis wird allerdings in einer zeitnahen longitudinalen Studie widersprochen.<sup>15</sup>

Tabelle 1.1: Häufigkeit atopischer Erkrankungen in Deutschland

	Relative Häufigkeit	Absolute Bevölkerungszahl (Deutschland)
Gesamtzahl atopischer Sensibilisierungen	30-40%	24-32 Millionen
Rhinitis allergica (Heuschnupfen)	15%	ca. 12 Millionen
Asthma bronchiale	5%	ca. 4 Millionen

Basierend auf Daten der ISAAC-Studie (The International Study of Asthma and Allergies in Childhood)

### 1.1.2 Die Immunologische Entzündung

Das Immunsystem des Menschen schützt den Organismus tagtäglich vor einer Vielzahl an Angriffen von Mikroben. Die Immunantwort muss dabei sorgfältig bezüglich der Unterscheidung zwischen gefährlichen und harmlosen Antigenen reguliert werden. Das Immunsystem steht deshalb unter einer sehr komplexen Regulation. Dies, sowie die hohe Plastizität und die ständige Übung sichern die optimale Funktionsfähigkeit unseres Immunsystems.

Die komplexe Regulation birgt allerdings immer die Gefahr der Fehlregulation. So kommt es beim IgE-vermittelten, allergischen Asthma bronchiale bzw. der allergischen Atemwegsentszündung zu einer Fehlregulation, bei der eine massive Immunantwort auf an sich ungefährliche Umweltantigene (z.B. Pollen) ausgelöst wird. Bei der nicht allergischen Form des Asthma bronchiale, ohne den Nachweis der Sensibilisierung gegenüber Umweltantigenen, könnte möglicherweise eine neuronale Fehlregulation die Ursache für die Erkrankung sein (siehe auch **1.1.4**).

Während der Sensibilisierungsphase gegen solche Antigene werden diese zunächst, nach dem Eindringen in den Körper, von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) aufgenommen. Als eine der wichtigsten APZ für Aeroallergene sind hier die Lungenmakrophagen zu nennen. Nachdem das Antigen von den APZ aufgenommen worden ist, wird es intrazellulär weiterverarbeitet und schließlich als Peptidfragment auf der Oberfläche der APZ in Verbindung mit dem Haupthistokompatibilitäts-Molekül Klasse II (MHC II) präsentiert. CD4 positive T-Helferzellen (TH), die in der Immunpathogenese allergischer Erkrankungen eine zentrale Rolle spielen, sind nun in der Lage, mit ihrem entsprechenden T-Zell-Rezeptor den Peptid-MHC II-Komplex zu erkennen. Diese Aktivierung führt dann zur Freisetzung von Botenstoffen.

Die TH-Zellen werden in wenigstens drei Subpopulationen unterschieden: TH1, TH2 und TH3. Die Unterscheidung wird durch funktionelle Gesichtspunkte und anhand des für die Subpopulation charakteristischen Zytokinprofils getroffen. TH1-Zellen spielen im Wesentlichen eine Rolle bei der zytotoxischen Immunreaktion, Zytolyse virusinfizierter Zellen, Transplantatabstoßung und Abwehr von Tumorzellen. Aber auch bei Entzündungsreaktionen, wie beispielsweise an chronischen Hautläsionen bei der atopischen Dermatitis gezeigt werden konnte, sind TH1-Zellen von wesentlicher Bedeutung.<sup>16</sup> Die von TH1-Zellen hauptsächlich produzierte Zytokine sind Interferon (IFN)- $\gamma$ , Interleukin (IL)-2 und Tumornekrosefaktor (TNF)- $\beta$ .

Im Gegensatz dazu sind die TH2-Zellen, die insbesondere durch die Produktion von IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 und IL-13<sup>17, 18, 19</sup> charakterisiert werden, für die Vermittlung einer Allergie von wesentlicher Bedeutung. IL-4 fördert den Immunglobulinklassen-Wechsel in der aktivierten B-Zelle von IgM zu IgE- und IgG4-Antikörpern. Außerdem führt IL-4 wiederum zur Aktivierung von T-Zellen selbst. Die Effekte des IL-13 gleichen denen des IL-4 (Steigerung der IgE-Antikörper Produktion), jedoch führt IL-13 nicht zur Aktivierung von T-Zellen.<sup>20</sup> Zudem steigert IL-13 die Aufregulierung von Adhäsionsmolekülen wie dem *Vascular cell adhesion molecule* (VCAM), so dass eine Invasion von Leukozyten, insbesondere den Eosinophilen, erleichtert wird. IL-5 gehört zu den wichtigen Zytokinen für allergische

Entzündungsereignisse, da es chemotaktische und aktivierende Wirkungen auf eosinophile Granulozyten hat und deren Apoptose unterdrückt.<sup>21, 22, 23</sup>

TH3-Zellen fungieren bei der Entwicklung immunologischer Toleranz. Ihr Leitzytokin ist der *transforming growth factor* (TGF)- $\beta$ .<sup>24, 25</sup> Warum sich eine naive TH-Zelle nach Antigenpräsentation letztlich in speziell eine TH1-, TH2- oder TH3-Zelle umwandelt, ist nicht eindeutig geklärt. Mit entscheidend dafür ist aber sicherlich das zum Zeitpunkt der Antigenpräsentation vorliegende Mikromilieu.

Bei der ersten Invasion von Allergenen wird zunächst über die Antigenpräsentation die T-Zelle, die das lokale Entzündungsgeschehen „dirigiert“, aktiviert. Durch die von T-Zellen (TH2) freigesetzten Botenstoffe wie IL-4 und IL-13 wandeln sich B-Zellen in sogenannte Plasmazellen um und produzieren nun allergenspezifische IgE-Antikörper. Die Sensibilisierung gegenüber dem Antigen ist damit erfolgreich abgeschlossen. Bei erneuter Allergenexposition kommt es zur Bindung der von B-Zellen produzierten IgE-Antikörper an hochspezifische IgE-Rezeptoren (Fc $\epsilon$ -RI) auf Mastzellen, die im Rahmen der „Kreuzvernetzung“ dieser IgE-Moleküle degranulieren. Es kommt zur Ausschüttung von Histamin, Bradykinin und Leukotrienen, die zu einer Vasodilatation und Bronchokonstriktion führen und sich klinisch in der Asthmasymptomatik äußern.

Cirka fünf Stunden nach dieser Frühphase, erreicht die Spätphase der allergischen Entzündungsreaktion ihr Maximum. Sie ist durch die Einwanderung von Leukozyten an den Ort des Geschehens charakterisiert. Im Blut zirkulierende Leukozyten sind mit Hilfe von speziellen Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen in der Lage, ins Gewebe zu migrieren. Die wichtigsten Vertreter dieser Adhäsionsmoleküle sind die Selektine. Im einzelnen P-Selektin, E-Selektin, des Weiteren das *intracellular adhesion molecule* (ICAM)-1 und VCAM-1. Eine Allergenprovokation kann innerhalb weniger Minuten eine Hochregulation dieser Moleküle auslösen, was dann zur Einwanderung von aktivierten T-Zellen, eosinophilen Granulozyten und Mastzellen ins betroffene Gewebe führt.

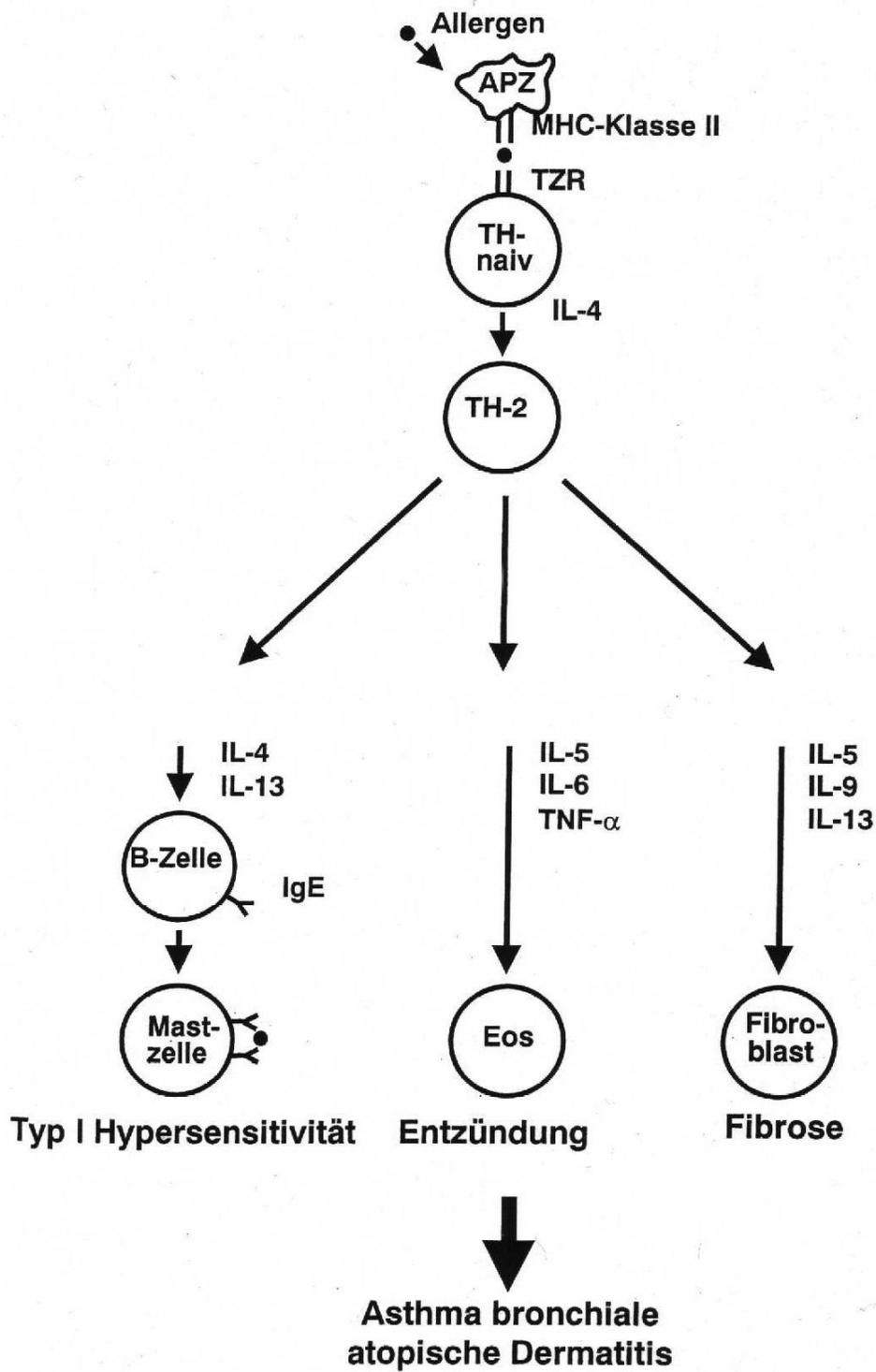
Dabei tragen gerade die eosinophilen Granulozyten mit dem Freisetzen eines Arsenal an toxischen Granulaproteinen, aber auch die von aktivierten

TH2-Zellen produzierten Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13, wesentlich zur Entzündung bei.

Das peribronchiale Zellinfiltrat, welches sich bei der allergischen Atemwegsentzündung ausbildet, besteht somit zu großen Teilen aus eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten. Eosinophile Granulozyten können daher mit zu den wichtigsten zellulären Komponenten der allergischen Entzündung gezählt werden. Von ihnen produzierte zytotoxische Granulaproteine, wie das *Major Basic Protein* (MBP), *Eosinophil Peroxidase* (EPO), *Eosinophil Derived Neurotoxin* (EDN) und *Eosinophilic Cationic Protein* (ECP), tragen direkt zur Epithelzerstörung bei.<sup>26</sup> Außerdem kann MBP die Innervation der Bronchialmuskulatur beeinflussen, da es einen Antagonisten am inhibitorischen M2-Muscarin-Rezeptor an parasymphatischen Nervenendigungen darstellt. Dieser M2-Rezeptor würde normalerweise bei Exzitation durch Achetylcholin (Ach) einen negativen Feedbackmechanismus auslösen, um die weitere Ach-Ausschüttung zu drosseln. Ist dieser Rezeptor blockiert und somit die Ach-Ausschüttung überproportional hoch, werden die von MBP unbeeinflussten M3-Rezeptoren stärker erregt, was letztlich zur AHR und massiven Bronchokonstriktion führen kann.<sup>27</sup>

Abschließend zusammengefasst ist das maßgebliche Charakteristikum der allergischen Entzündung eine TH2-Antwort des Immunsystems auf an sich harmlose Umweltantigene. Ihre Leitzytokine sind IL-4, IL-5 und IL-13. Es kommt zur Einwanderung eosinophiler Granulozyten, so wie einer erhöhten Produktion von allergen-spezifischen IgE Antikörpern. Die akute Symptomatik wird hauptsächlich durch die Mastzelldegranulation ausgelöst. Die Spätphase der Entzündungsreaktion ist durch die zelluläre Infiltration des entzündlichen Gewebes gekennzeichnet.

Eine schematische Übersicht über die zentrale Rolle der TH2-Zelle in der allergischen Sensibilisierung zeigt die Abbildung 1.2



**Abb. 1.2:** Schematische Darstellung der zentralen Rolle einer TH2-Zelle in der allergischen Sensibilisierung (nach U. Herz). APZ: antigenpräsentierende Zelle, MHC Klasse II: Haupthistokompatibilitäts-Molekül Klasse II, TZR: T-Zell-Rezeptor, IL: Interleukin, TH: T-Helferzelle, Eos: eosinophile Granulozyten

### 1.1.3 Umwelteinflüsse und Genetik

Da es äußerst schwierig ist, einzelne Umweltfaktoren bzw. Lebensgewohnheiten in Kausalität zu dem beobachteten Anstieg von Allergien zu bringen, spricht man diesbezüglich vom Verlust anti-allergischer Faktoren bzw. dem Erwerb von pro-allergischen Faktoren. Als Verlust von anti-allergischen Faktoren wären beispielsweise der Rückgang der Familiengröße, die zunehmende Verstädterung, eine herabgesetzte Stilldauer, die Verfügbarkeit ungesättigter Fettsäuren und eine veränderte Darmbesiedlung, zu nennen. Als allergiefördernde Einflüsse können neuartige Baumaterialien, Klimatisierung der Innenräume, eine längere Aufenthaltsdauer in Wohnräumen bei steigender Allergenbelastung (großflächige Teppichböden, Haustiere) und ähnliches genannt werden. Außerdem sind im Zuge der Globalisierung der Märkte auch immer exotischere Lebensmittel, die eine allergene Potenz innehaben (im besonderen Früchte), leicht zugänglich und für jedermann erschwinglich. Ein Anstieg der Konzentrationen an Inhalationsnoxen in der Atemluft wird ebenfalls als allergiefördernd betrachtet.<sup>28</sup> Des Weiteren spielen sozioökonomische Faktoren bei der Ausprägung des Asthma bronchiale eine Rolle. So leben gerade in Großstädten viele Menschen an der Armutsgrenze. Gerade diese Bevölkerungsgruppe und besonders ihre Kinder scheinen stärker betroffen zu sein. In den USA tritt Asthma bronchiale überproportional häufig bei Kindern auf, die in städtischen Umgebungen und solchen, die in Armut leben. Kinder aus sozioökonomisch benachteiligten Familien haben nicht nur eine höhere Prävalenz, sondern auch eine größere Morbidität und höhere Mortalität, an Asthma bronchiale.<sup>27</sup> In neueren Studien zeichnete sich zudem immer deutlicher ab, dass die Lebensumstände unter denen ein Mensch aufwächst, das Risiko, Erkrankungen des atopischen Formenkreises auszubilden beeinflusst. So zeigte der Vergleich von Kindern, die in ländlichen Gegenden Deutschlands, Österreichs und der Schweiz aus Familien mit landwirtschaftlichen Betrieben stammten, zu solchen, die aus Familien ohne Landwirtschaft stammten, dass erstere signifikant seltener an Atopien litten.<sup>29</sup> Dies wurde in Zusammenhang mit signifikant höheren Konzentrationen an bakteriellen Endotoxinen beispielsweise in den Matratzen der Kinder aus bäuerlichen Betrieben, im Vergleich zu solchen aus

nicht bäuerlichen Betrieben gebracht. Die Konzentrationen an bakteriellen Endotoxinen waren hierbei umgekehrt proportional zu den Prävalenzen atopischer Erkrankungen.<sup>29</sup> Es gibt des Weiteren Hinweise darauf, dass bakterielle Infekte in der frühen Kindheit die TH1/TH2-Balance des Immunsystems zu Gunsten der TH1-Antwort beeinflussen, da diese Infekte die TH1-Antwort stimulieren bzw. die TH2-Antwort inhibieren.<sup>30, 31</sup> Es bleibt aber zu bemerken, dass nach Ausbruch einer atopischen Erkrankung, wie beispielsweise des Asthma bronchiales oder der atopischen Dermatitis, diese durch eine Infektionskrankheit verschlimmert werden können, so dass ein bidirektionaler Effekt von Infektionskrankheiten auf die Entwicklung von atopischen Erkrankungen besteht.<sup>30</sup>

Neben Umwelteinflüssen spielt aber auch eine genetische Disposition bei der Ausbildung allergischer Erkrankungen eine Rolle. Kinder von Eltern, die an einer Allergie leiden, haben ein erheblich höheres Risiko, selbst an Allergien zu erkranken, als die Allgemeinbevölkerung. Darüber hinaus scheint die Konzentration des Gesamt-IgE-Spiegels durch genetische Faktoren beeinflusst zu werden.<sup>32, 33</sup> Dennoch kann man nicht von einem einzelnen Allergie-Gen sprechen, es liegt vielmehr ein multifaktorielles Vererbungsmuster vor. In neueren Studien wurde jedoch der Einfluss einzelner Gene auf die Ausbildung von Allergien weiter differenziert. So konnte jüngst gezeigt werden, dass einzelne Nukleotid-Polymorphismen im GATA-3-Gen mit der phenotypischen Ausprägung von Asthma bronchiale assoziiert sind.<sup>34</sup> Dieses Gen kodiert unter anderem für Proteine, die für die TH1/TH2-Differenzierung von T-Helferzellen bedeutend sind. Trotzdem scheinen insgesamt Umwelteinflüsse auf die Manifestation allergischer Erkrankungen einen größeren Einfluss zu haben. Dies wird von der niedrigen spontanen Mutationsrate des menschlichen Genoms, welche keinesfalls zu dem rapiden Prävalenzanstieg allergischer Erkrankungen der letzten Jahre und Jahrzehnte parallel gesetzt werden kann, unterstrichen. Eine Studie zu den unterschiedlichen Prävalenzen allergischer Erkrankungen in West- und Ostdeutschland zum Zeitpunkt der Wiedervereinigung kommt ebenfalls zu dem Schluss, dass Umwelteinflüsse bei der Ausbildung allergischer Erkrankungen überwiegen.<sup>35</sup> Bei weiterführenden Beobachtungen wurde dann gezeigt, dass es nach der Wiedervereinigung zu einem signifikanten

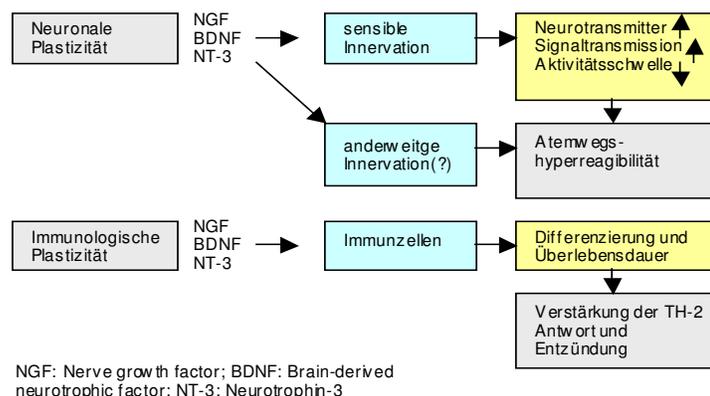
Prävalenzanstieg von atopischen Ekzem und Rhinitis allergica in Ostdeutschland kam. Bezüglich des Asthma bronchiale wurde kein signifikanter Prävalenzanstieg festgestellt. Als Erklärung hierfür wurde angeführt, dass die untersuchten Kinder ca. 3 Jahre vor der Wiedervereinigung geboren wurden. Einflüsse in frühester Kindheit schienen daher für das Risiko später an Asthma bronchiale zu erkranken entscheidend zu sein.<sup>36</sup>

Die deutliche Zunahme an atopischen Erkrankungen beruht demnach auf dem Zusammenspiel mehrerer Faktoren. Dennoch bleibt festzuhalten, dass der steigende Zivilisationsstandard, den Inzidenzanstieg von Allergien begünstigen kann. Erkrankungen des atopischen Formenkreises gehören deshalb heute zu den großen Volkskrankheiten der Industrienationen.

#### **1.1.4 Neuronale Fehlregulation beim Asthma bronchiale**

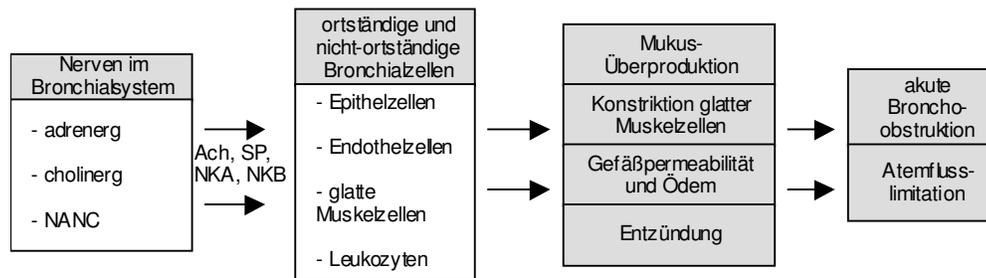
Bei der Pathophysiologie des Asthma bronchiale hat, neben der oben beschriebenen allergischen Entzündungsreaktion, die veränderte Innervation von glatten Muskelzellen im Bronchialtrakt eine besondere Bedeutung. Die glatte Atemwegsmuskulatur steht unter nervaler Kontrolle des autonomen Nervensystems (Sympathikus/Parasympathikus), sowie peptiderger Nervenfasern. Heutige Standard-Therapiekonzepte versuchen dabei besonders auf das autonome Nervensystem Einfluss zu nehmen (siehe auch **1.1.5**). In der Pathophysiologie des Asthma bronchiale kommt allerdings dem sensiblen, nichtadrenergen-nichtcholinergen (NANC) System eine zentrale Rolle zu.<sup>37</sup> Durch Reizung sensibler Neurone in der Atemwegsmukosa, sei es beispielsweise durch chemische, thermische oder mechanische Noxen, aber auch durch körpereigene Mediatoren, können diese durch Freisetzung von Neuropeptiden (wie etwa Substanz P) entzündungsfördernd wirken. In einem Mausmodell konnte die verstärkte Substanz P Produktion während der Atemwegsentzündung nachgewiesen werden.<sup>38</sup> Substanz P führt zu Bronchokonstriktion, vermehrten Produktion von Bronchialschleim, Dilatation und Permeabilisierung lokaler Blutgefäße, sowie Einwanderung von Entzündungszellen.<sup>37</sup> Durch den so genannten Axonreflex kann sich diese Reaktion noch weiter auf umliegendes Gewebe ausbreiten. Des Weiteren

können durch Axonkollateralen zwischen sensiblen und parasympathischen Neuronen lokale bronchokonstriktive Reflexe, sowie durch sensible Afferenzen zum Hirnstamm zentrale Reflexe ausgelöst werden.<sup>39</sup> Aber auch während des Entzündungsprozesses eingewanderte aktivierte Immunzellen können, über von ihnen produzierte Neurotrophine, zu einer qualitativen und quantitativen Veränderung von Nervenfunktionen führen.<sup>40</sup> Neurotrophine, wie *nerve growth factor* (NGF) und *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), stellen eine Verbindung zwischen Dysfunktionen des Immun- und Nervensystems in der Pathophysiologie des Asthma bronchiale dar.<sup>40</sup> Die allergische Atemwegsentzündung wird demnach nicht nur durch Neurotrophine mitunterhalten, diese führen auch zu einer Modulation des lokalen Innervationsmusters und immunologischer Plastizität, was schließlich zu einer erhöhten Atemwegshyperreagibilität und zu einer verstärkten TH-2-Immunantwort im Bronchialsystem führt (siehe auch Abb. 1.3 und 1.4).<sup>41</sup> Weiter unterstrichen wird die Bedeutung der neuronalen Fehlregulation während der allergischen Entzündung noch dadurch, dass nach chemischer Denervierung peptiderger Neurone mittels Capsaicin, Tiere nach Allergenexposition keine Hyperreagibilität mehr zeigen.<sup>42, 43</sup> Die Symptomatik des Asthmatikers wird folglich durch die Wirkungen der im Anfall vermehrt freigesetzten Neuropeptide und auch die einiger Neurotrophine, weiter intensiviert.



**Abb. 1.3:** Neurotrophinvermittelte neuronale und immunologische Plastizität während der allergischen Atemwegsentzündung. Nach W. Nockher und H. Renz.

## Die neurogene Entzündung



**Abb. 1.4:** Das Konzept der neurogenen Entzündung. Ortständige und nicht-ortständige Bronchialzellen exprimieren Rezeptoren für Acetylcholin (Ach), Substanz P (SP) sowie Neurokinin-A und -B (NKA, NKB). Deren verstärkte Stimulation führt zu Mucus-Überproduktion, Muskelkonstriktion, Erhöhung der Gefäßpermeabilität und Entzündungsreaktion, was letztlich in akuter Bronchialobstruktion und Einschränkung des Atemflusses gipfelt. Nach W. Nockher und H. Renz.

### 1.1.5 Therapie und Prognose des Asthma bronchiale

In der Therapie des Asthma bronchiale werden zum einen Basistherapeutika zur Dauermedikation (*Controller*) und zum anderen kurz wirksame Bedarfsmedikamente (*Reliever*) eingesetzt. Die Dauermedikation hat dabei weitestgehend zum Ziel, die asthmatische Entzündungsreaktion zu unterdrücken. Außerdem werden langwirksame  $\beta_2$ -Sympathomimetika, sowie Theophyllin zur Basistherapie eingesetzt. Als Bedarfsmedikation werden kurz wirksame  $\beta_2$ -Sympathomimetika per Inhalation, zur Bronchodilatation und Verringerung der Dyspnoesymptomatik während eines akuten Anfalls, aber auch prophylaktisch vor beispielsweise größeren körperlichen Anstrengungen, herangezogen.

Bei der Langzeittherapie sollte heutzutage nach den Empfehlungen der Deutschen Atemwegsliga vorgegangen werden. Diese sieht eine Behandlung anhand eines Stufenplanes vor, damit die Behandlung dem augenblicklichen Schweregrad der Erkrankung optimal angepasst werden kann und so Effektivität und Nebenwirkungen im möglichst günstigen Verhältnis zueinander stehen.<sup>1</sup>

Grundsätzlich sollten begleitend zur pharmakologischen Therapie von allen Betroffenen gewisse präventive Maßnahmen ergriffen werden. Zu nennen wäre der Verzicht auf Tabakrauchen und vor allem Allergenkarenz soweit möglich. Ebenfalls sollten, wenn es medizinisch vertretbar ist, Betablocker, die die Symptomatik des Asthma bronchiales verschlechtern können, vermieden werden.

Tabelle 1.2: Asthmaschweregrade – Klassifizierung (Deutsche Atemwegsliga)

Stufe	Symptomausprägung				FEV1 bzw. PEF % Sollwert
			Tag	Nacht	
1	intermittierend		≤ 2x/Woche	≤ 2x/Monat	≥ 80 %
2	persistierend	leicht	< 1x/täglich	> 2x/Monat	≥ 80 %
3	persistierend	mittelgradig	Täglich	> 1x/Woche	60 - 80 %
4	persistierend	schwer	Ständig	Häufig	≤ 60 %

Tabelle 1.3: Stufenplan der Asthmathherapie (Deutsche Atemwegsliga)

Stufe	Bedarfsmedikation	Dauermedikation
1	kurz wirksame $\beta_2$ -Sympathikomimetika oder Anticholinergika	Keine
2	wie Stufe 1	inhalativ Glukokortikoide, niedrig dosiert <b>Alternativ:</b> Chromoglizinsäure (DNCG), Nedocromil, evtl. Antileukotriene
3	wie Stufe 1	inhalativ Glukokortikoide, mittlere Dosis oder inhalativ Glukokortikoide, niedrig dosiert <b>plus</b> lang wirksames $\beta_2$ -Sympathikomimetikum <b>Alternativ:</b> inhalativ Glukokortikoide, mittlere Dosis <b>plus</b> Theophyllin oder Antileukotriene
4	wie Stufe 1	wie Stufe 3, jedoch inhalativ Glukokortikoide, hoch dosiert <b>plus</b> oral Glukokortikoide

Obwohl das Therapiemanagement immer ausgefeilter wird und mehrere Pharmaka zur Verfügung stehen, ist es immer noch nicht möglich, das Asthma bronchiale zu heilen. Die Therapie zielt lediglich auf die Prävention von Asthmaanfällen, so wie deren schnelle Durchbrechung und Linderung der Symptomatik. Patienten mit schwerer Symptomatik kann oft nur durch entsprechend hohe Dosen an Glukokortikoiden geholfen werden. Sie sind eine der Hauptstützen in der antiinflammatorischen Therapie des schweren

Asthma bronchiale. Ihre Wirkung entfalten sie über die Bindung an den intrazellulären Glukokortikoidrezeptor und die dadurch ausgelöste Inhibition von Transkriptionsfaktoren, die normalerweise bei Entzündungsreaktionen aktiviert werden.<sup>44</sup> Bei hochdosierter Langzeittherapie können allerdings Nebenwirkungen der Glukokortikosteroide auftreten, da diese ihre Effekte an einer Vielzahl von Zellen ausbilden. So kann es durch die Applikation von Steroiden zu Hyperglykämie, Katarakt, Osteoporose, Suppression der Hypothalamisch-hypophysär-adrenalen Achse, Hautatrophie und Wachstumsretardierung bei Kindern kommen.<sup>45, 46</sup> Bei der Anwendung inhalativer Glukokortikoide sollte darüber hinaus darauf geachtet werden, dass die Applikationen jeweils vor dem Essen erfolgen und anschließend Mund- und Rachenraum ausgespült werden. Auch helfen großvolumige Inhalationskammern (*Spacer*) Nebenwirkungen, wie etwa Mundsoor oder Heiserkeit zu reduzieren. Lang wirksame  $\beta_2$ -Sympathomimetika sowie Theophyllin kommen als antiobstruktive Medikamente ab der Schweregradstufe 3 zum Einsatz. Mastzellstabilisatoren wie Cromoglicinsäure oder Nedocromil sind bei leicht persistierendem Asthma bronchiale (Schweregradstufe 2) als Dauertherapeutika eine Alternative zu inhalativen Glukokortikoiden; wenngleich diese in der Regel überwiegend im Kindesalter eingesetzt werden. Darüber hinaus können Antileukotriene bei Asthma der Stufe 2 und 3 eingesetzt werden. Diese Medikamente hemmen proinflammatorische Mediatoren aus eosinophilen Granulozyten und Mastzellen. Die Hemmung wird durch einen Antagonismus an Leukotrienrezeptoren der glatten Muskulatur, Schleimdrüsen und Gefäßepithelien erzielt. Dadurch kann eine Abschwächung der bronchialen Hyperreagibilität und der Bronchokonstriktion bewirkt werden. Als Nebenwirkungen der Antileukotriene werden unter anderem Kopfschmerz, Fieber, Diarrhoe, Nausea und Sinusitis genannt. Um die Wirksamkeit der gewählten Therapie und den Verlauf der Erkrankung einschätzen zu können, müssen die Patienten regelmäßigen klinischen Kontrollen unterliegen. Vor einer Dosiserhöhung oder Umsetzen der aktuellen Medikation, sollte aber auch eine falsche Applikationstechnik und andere äußere Einflüsse auf die Wirksamkeit der Medikation in Betracht gezogen werden.

Einige Patienten sprechen auf die bestehenden Therapiekonzepte aber nur unbefriedigend an. Die Erforschung neuer Therapien und die Verbesserung bestehender Strategien sind daher unverzichtbar. Einen neuen Therapieansatz stellt beispielsweise die Neutralisation von zirkulierenden IgE-Antikörpern durch anti-IgE-Antikörper dar.<sup>47</sup> Auch wenn diese Art der Therapie sicher noch nicht für den breiten Einsatz möglich ist, ist die Indikation für Patienten mit schwerem Asthma bronchiale durchaus denkbar.<sup>48</sup> So muss aufgrund der steigenden Prävalenzen insbesondere des Asthma bronchiales weitere Forschung auf diesem Gebiet betrieben werden, denn nur durch ein besseres Verständnis der Grundlagen des Asthma bronchiales und durch die Etablierung weiterer Therapieprinzipien kann die Behandlung dieser Volkskrankheit optimiert werden.

### **1.1.6 Das Mausmodell für allergische Erkrankungen**

Das Immunsystem der Maus ist heute gut charakterisiert. Einige funktionelle Interaktionen und Regelmechanismen des murinen Immunsystems ähneln dem des menschlichen Immunsystems so, dass das Mausmodell als Modellsystem für allergische Entzündungen gut verwendbar ist.

Dennoch kann keinesfalls von einer absoluten Kongruenz gesprochen werden, da einige Immunglobulin-Subtypen, so wie manche Mediatoren, sich von den entsprechenden Komponenten des menschlichen Immunsystems unterscheiden. So wird beispielsweise die Soforttyp-Überempfindlichkeitsreaktion (TYP 1) beim Menschen über IgE-Antikörper vermittelt, wohingegen die Soforttyp Reaktionen bei der Maus über IgE- und IgG1-Antikörper vermittelt wird. Trotzdem kann eine weitgehende Ähnlichkeit bezüglich der wesentlichen immunologischen Mechanismen bei Maus und Mensch vorausgesetzt werden.<sup>49, 50</sup>

Unter den diversen Maus-Stämmen eignet sich für die Untersuchung allergischer Entzündungen der Stamm BALB/c sehr gut, da BALB/c-Mäuse auf viele Allergene mit einer ausgeprägten allergischen Immunantwort reagieren. Die BALB/c Maus wird hier deshalb als Standard-Modellmaus eingesetzt. Als Standard-Modellallergen wird Ovalbumin (OVA) verwendet. Ferner werden in dieser Arbeit C57BL/6 Mäuse und L-10 *knock-out* Mäuse,

die auf dem genetischen Hintergrund von C57BL/6 Mäusen gezüchtet sind, eingesetzt. Die C57BL/6-Maus hat zwar eine weniger stark ausgeprägte allergische Entzündungsreaktion auf Ovalbumin als die BALB/c Maus, dennoch werden auch von diesen Mäusen klassische allergische Immunantworten ausgebildet.<sup>51</sup>

Bereits zuvor konnte gezeigt werden, dass Mäuse auf eine Sensibilisierung und Provokation durch OVA mit erhöhten Serum IgE-Spiegeln reagieren. Ebenfalls beschrieben wurde die Ausprägung einer Asthma bronchiale ähnlichen Symptomatik mit AHR und akuter Bronchokonstriktion.<sup>52, 53, 54</sup>

Das bereits gut etablierte Mausmodell für die allergische Atemwegesentzündung wird daher auch in dieser Promotionsarbeit eingesetzt, um die Effekte  $\alpha$ -MSHs im Hinblick auf die allergische Atemwegesentzündung *in vivo* zu untersuchen.

## 1.2 Das Neuropeptid $\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon

### 1.2.1 Der Ursprung des Neuropeptids $\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon (MSH)

Das alpha-Melanozyten-stimulierende-Hormon ( $\alpha$ -MSH) ist ein endogenes neuro-immunomodulatorisches Peptid, das aus dem Hormon Proopiomelanocortin (POMC) entsteht. Ursprünglich galt die Hypophyse als der Hauptsyntheseort des POMC. Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, dass POMC und daraus hervorgehende Peptide bzw. Hormone in einer Vielzahl von nicht hypophysären Geweben produziert werden. Ausfindig gemacht werden konnten POMC-Abkömmlinge außer in der Hypophyse unter anderem in immunkompetenten Zellen wie Lymphozyten, Monozyten und Langerhans-Zellen, sowie in Keratinozyten, Epithelzellen und einer Reihe weiterer Organe.<sup>55, 56, 57</sup> POMC wird durch spezifische proteolytische Enzyme, wie die Prohormon-Convertasen (PC), in mehrere biologisch aktive Peptide gespalten. Aus POMC entstehen so  $\beta$ -Lipotropin, adrenocorticotropes Hormon (ACTH),  $\beta$ -Endorphin und die Melanotropine  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -MSH. PC-1 spaltet dabei POMC hauptsächlich in ACTH und  $\beta$ -Lipotropin, PC-2 hingegen ist maßgeblich für die Bildung von  $\beta$ -Endorphin und  $\alpha$ -MSH verantwortlich. Die Spaltung von POMC erfolgt hierbei gewebe- und zellspezifisch.<sup>55 - 61</sup>

### 1.2.2 Primäre Funktionen des $\alpha$ -Melanozyten-stimulierendem Hormons

$\alpha$ -MSH ist ein Neuropeptid, das die Melanogenese in pigmentierten Zellen kontrolliert. Zusätzlich hat  $\alpha$ -MSH potente immunmodulatorische und immunsuppressive Funktionen, die kürzlich insbesondere bei kutanen Entzündungsreaktionen klar beschrieben werden konnten.<sup>62, 63, 64</sup>

Seine Effekte vermittelt  $\alpha$ -MSH über spezifische Melanocortin-Rezeptoren (MC), von denen bislang fünf identifiziert worden sind (MC-1 bis MC-5). Die Ausprägung in einzelnen Geweben und die Affinität zu den POMC-Peptiden ist bei jedem dieser Rezeptoren jedoch unterschiedlich.<sup>65, 66, 67</sup> MC-1 gilt

hierbei als hochspezifischer Rezeptor für  $\alpha$ -MSH.<sup>50</sup> Exprimiert wird MC-1 vor allem auf Keratinozyten, dendritischen Zellen, Makrophagen, Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen.<sup>62, 65, 66, 68, 69, 70</sup>

Die MC-Rezeptoren gehören zu der Gruppe von heterodimeren Guanin-nucleotidbindenden Proteinen (G-Protein Rezeptortyp). Sie alle sind durch sieben transmembrane Domänen gekennzeichnet. Nach Bindung des spezifischen Liganden erfolgt die Signaltransduktion anhand der Aktivierung der Adenylatzyklase, was zu einer Steigerung der intrazellulären cAMP Konzentration führt.<sup>71</sup>

Eine der Hauptfunktionen von  $\alpha$ -MSH ist die Kontrolle der Melanogenese in der Haut. Ferner führt durch UV-Strahlen verursachter DNS-Schaden nicht nur zur verstärkten Expression von Tyrosinase-mRNS, sondern auch zur gesteigerten Melanogenese durch  $\alpha$ -MSH Stimulation und zur erhöhten  $\alpha$ -MSH-Bindung an die MC-Rezeptoren.<sup>72</sup> Auch Zellen maligner Melanome werden durch  $\alpha$ -MSH zur verstärkten Melanogenese, dendritischer Formationsbildung und Anhaftung an Laminin angeregt. Dabei werden die Melanomzellen je nach Kulturbedingungen und Zelllinie entweder zur Proliferation angeregt oder deren Proliferation gehemmt.<sup>73, 74</sup> Ebenfalls seit längerer Zeit bekannt ist, dass  $\alpha$ -MSH lipolytische Eigenschaften aufweist. Diese werden zumal unterstrichen, seit die Expression von MC-2 und MC-5 Rezeptoren auf Adipozyten gezeigt werden konnte.<sup>75</sup> Darüber hinaus exprimieren menschliche Fibroblasten den MC-1 Rezeptor.<sup>69</sup> Durch eine Stimulation der Fibroblasten mit  $\alpha$ -MSH, werden diese zur erhöhten Kollagenase Produktion veranlasst.<sup>76</sup>

Neuere Studien belegten des Weiteren starke Einflüsse von  $\alpha$ -MSH auf das Immunsystem. So konnten antipyretische, antimikrobielle, antiinflammatorische und immunmodulatorische Eigenschaften von  $\alpha$ -MSH nachgewiesen werden.<sup>77, 78, 79</sup> Eine Reihe von Studien hat gezeigt, dass  $\alpha$ -MSH seine antiinflammatorischen Eigenschaften maßgeblich über die Inhibition immunregulatorischer, proinflammatorischer Zytokine entfaltet. So wird beispielsweise die Produktion an IL-1, IL-2 und IFN- $\gamma$  gehemmt.<sup>78</sup> Die systemische Applikation von  $\alpha$ -MSH führte des Weiteren zur Abschwächung von IL-1 bezogenem Fieber und Leukozytose, so wie zu einer verringerten Produktion von Akutphase-Proteinen.<sup>80, 81</sup>

Im Gegensatz dazu wird durch  $\alpha$ -MSH die Synthese von Faktoren gesteigert, welche die Immunantwort herunterregulieren.<sup>78</sup> Im Wesentlichen belegt ist dies für IL-10, das von peripheren Blut-Monozyten nach Stimulation mit  $\alpha$ -MSH verstärkt ausgeschüttet wird.<sup>82</sup> Das immunsupprimierende Potenzial von  $\alpha$ -MSH ist maßgeblich über die Regulation von Monozyten- und Makrophagenfunktion vermittelt, wobei der Induktion des Zytokins IL-10 kommt eine tragende Rolle zukommt.<sup>62</sup> Überdies gibt es Hinweise darauf, dass die antiinflammatorischen und immunmodulatorischen Eigenschaften von  $\alpha$ -MSH über das C-terminale Ende des Peptids vermittelt werden;<sup>82</sup>  $\alpha$ -MSH greift ebenfalls in die Regulation der Immunglobulinproduktion ein. In physiologischen Konzentrationen fördert es interessanterweise die IL-4- und CD40-vermittelte IgE-Synthese von B-Zellen *in vitro*. Dieser Effekt konnte allerdings nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von Monozyten in der Kultur beobachtet werden. Im Gegensatz dazu führen höhere, pharmakologische Konzentrationen von  $\alpha$ -MSH zu einer starken Reduktion der IgE-Synthese.<sup>83</sup> Darüber hinaus wird die Expression co-stimulatorischer Moleküle wie CD40 und CD86 (B7-2) durch  $\alpha$ -MSH herunterreguliert.<sup>70</sup>

### **1.2.3 Die immunmodulatorischen Effekte des $\alpha$ -Melanozyten-stimulierenden Hormons *in vivo***

Die Haut gehört zu den nicht-hypophysären Organen, in denen  $\alpha$ -MSH exprimiert und synthetisiert wird. Epidermale Zellen, wie Keratinozyten und Melanozyten, aber auch dermale Zellen wie Fibroblasten und Endothelzellen, reagieren auf eine Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen oder nach Stimulation durch UV-Licht, mit einer gesteigerten  $\alpha$ -MSH Synthese bzw. Ausschüttung.<sup>62</sup> Erhöhte  $\alpha$ -MSH Konzentrationen sind bei diversen Hauterkrankungen wie beispielsweise der Psoriasis vulgaris und allergischen Ekzemen beobachtet worden.<sup>62, 84</sup>

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass sowohl die Sensibilisierung, als auch die Ausbildung einer kutanen Immunantwort auf starke Kontaktallergene durch eine epikutane Behandlung mit  $\alpha$ -MSH unterdrückt werden kann.<sup>85</sup> Als potente Kontaktallergene wurden hierbei Dinitrofluorobenzol (DNFB) und Oxazon (OX) verwendet.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ -MSH eine haptenspezifische Toleranz induziert.<sup>86</sup> In einem Mausmodell führte die intravenöse Applikation von  $\alpha$ -MSH zwei Stunden vor der Sensibilisierung mit dem Hapten Trinitrochlorobenzol (TNCB) zur Inhibition eines allergischen Kontaktekzems. Bei erneuter Sensibilisierung/Provokation mit TNCB blieb anschließend ein Kontaktekzem auch ohne vorherige  $\alpha$ -MSH Gabe aus. Wurden dagegen dieselben Tiere mit einem anderen Hapten, wie Dinitrofluorobenzol, provoziert, konnte wieder ein Kontaktekzem nachgewiesen werden. Die Toleranzentwicklung durch  $\alpha$ -MSH ist also haptenspezifisch.<sup>86</sup> Diese Toleranzentwicklung konnte ferner durch die Applikation von IL-10-Antikörpern zum Zeitpunkt der  $\alpha$ -MSH Gabe verhindert werden.<sup>86</sup> Das schon zuvor beschriebene Potenzial von  $\alpha$ -MSH, die Ausschüttung des überwiegend antiinflammatorischen Zytokins IL-10 zu induzieren, ist demnach auch bei der Modulation immunologischer Belange der Haut von immenser Bedeutung.

### 1.3 Zielsetzung der vorgelegten Arbeit

Allergische Erkrankungen, wie das Asthma bronchiale, Heuschnupfen oder die atopische Dermatitis sind in allen Alterstufen weit verbreitet. Längst haben sich die atopischen Erkrankungen zu einer Volkskrankheit mit steigenden Prävalenzen und Inzidenzen entwickelt. Da diese Erkrankungen meist mit einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität einhergehen, besteht ein großer Bedarf an der Aufklärung ihrer immunpathologischen Mechanismen, sowie der Entwicklung neuer Therapiestrategien.

Die Regulation des Immunsystems ist komplex, viele Mediatoren nehmen Einfluss auf die Immunantwort. Nur wenige Studien haben sich bisher mit der Einflussnahme von Neuropeptiden bei entzündlichen Erkrankungen auseinandergesetzt. Eines dieser Neuropeptide ist das  $\alpha$ -MSH, dessen Toleranz-entwickelnde Eigenschaften in einem Hautmodell bei Entzündungsreaktionen gut gezeigt werden konnte.

Die Lunge ist ein weiteres wichtiges Organ, das im Rahmen des Asthma bronchiales von einer schwerwiegenden Entzündung betroffen sein kann. Bisher gibt es jedoch nur wenige antiinflammatorische Substanzen, wie beispielsweise Glukokortikoide, die zur Therapie eines Asthma bronchiale eingesetzt werden können.

Die vorgelegte Dissertation hat zum Ziel, die Einflüsse des Neuropeptids  $\alpha$ -MSH auf die allergische Atemwegsentzündung zu untersuchen. Vertreten wird die Hypothese, dass  $\alpha$ -MSH die allergische Atemwegsentzündung *in vivo* verhindert.

Zur Aufklärung dieses Sachverhaltes wurde ein neues Studienprotokoll zur Applikation von  $\alpha$ -MSH in Anlehnung an das bereits gut etablierte Mausmodell für allergische Atemwegserkrankungen *in vivo* entwickelt (siehe auch **5.1**).<sup>49, 54</sup> Die Atemwegshyperreagibilität wurde in diesem Modell mittels non-invasiver head-out Bodyplethysmographie analysiert. Ferner wurde die Zellzusammensetzung der broncho-alveolären Lavage (BAL) mit Hilfe der mikroskopischen Zellanalyse untersucht. Zur Darstellung des peribronchialen Infiltrates wurden von Lungen Kryoschnittpräparate angefertigt. Aus der BAL wurde zudem die Analyse von relevanten Zytokinen mit Hilfe von ELISA-Untersuchungen vorgenommen. Darüber hinaus erfolgte die Bestimmung von Immunglobulinen aus dem peripheren Blut mittels

ELISA. Zur Bestimmung der  $\alpha$ -MSH Konzentrationen in der BAL wurde ein Radioimmunoassay durchgeführt. Hinzu kam die FACS Analyse von BAL-Makrophagen zur Untersuchung der MC-1 Rezeptorexpression.

Die Untersuchungen wurden an BALB/c Mäusen, C57BL/6 Wildtyp und homozygoten IL-10 knock-out C57BL/6 Mäusen vorgenommen.

## **2 Ergebnisse**

### **2.1 Die allergische Atemwegsentzündung**

Im Folgenden werden immunologische Veränderungen dargestellt, die nach Durchführung eines OVA-Sensibilisierungsprotokolls (siehe **5.1.3**) an BALB/c Mäusen, zu beobachten sind. Die Ergebnisse werden zum einen hier vorgestellt, um die Funktionalität des angewandten Mausmodells zu zeigen. Des Weiteren soll verdeutlicht werden, welche Veränderungen nach einer aerosolischen Allergenprovokation an zwei aufeinanderfolgenden Tagen auftreten.

#### **2.1.1 Serum-Immunglobulinproduktion**

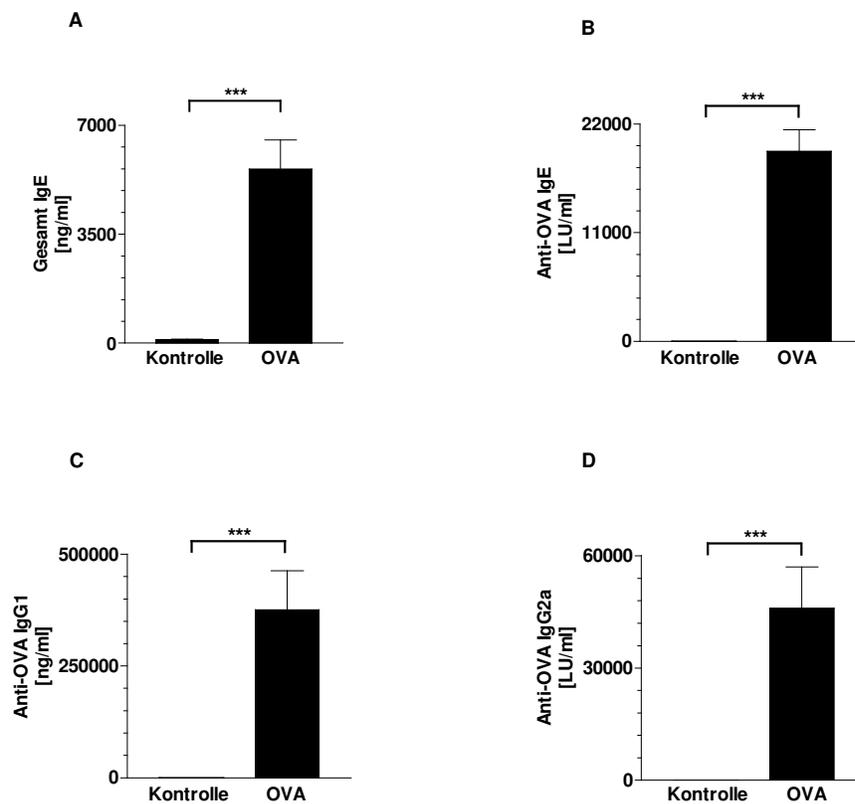
Die in Abbildung 2.1 dargestellten Immunglobuline waren alle im Serum mit OVA sensibilisierter Tiere, im Vergleich zur Kontrollgruppe, hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) erhöht.

Die signifikant erhöhten Konzentrationen waren sowohl bei den spezifischen anti-OVA Immunglobulinen (anti-OVA IgG1, anti-OVA IgG2a und anti-OVA IgE), als auch beim Gesamt-IgE zu verzeichnen. Die serologischen Befunde der mit OVA sensibilisierten Tiere weisen deutlich auf eine allergische Immunantwort hin, so dass das durchgeführte Studienprotokoll als wirksam und erfolgreich anzusehen ist.

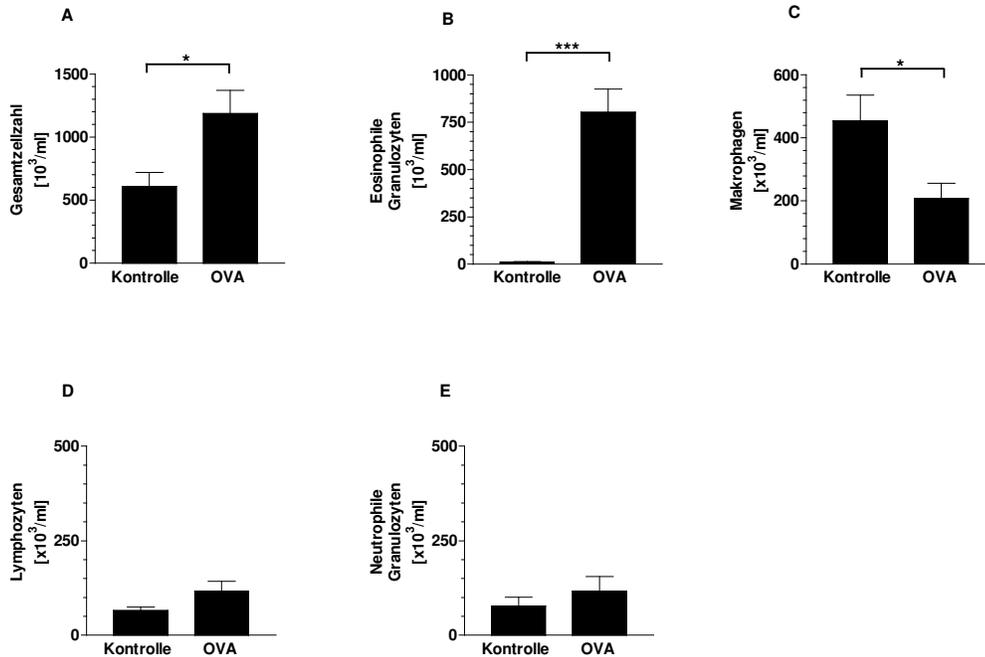
#### **2.1.2 Zellzusammensetzung der BAL**

Bei den mit OVA sensibilisierten Tieren ließ sich durch das gewählte Behandlungsschema eine allergische Atemwegsentzündung hervorrufen. Die Gesamtzellzahl in der BAL (Abb. 2.2 A) war gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Ebenfalls signifikant erhöht waren die, für die allergische Entzündungsreaktion charakteristischen eosinophilen Granulozyten (Abb. 2.2 B). Abbildung 2.2 C zeigt die reduzierte Zellzahl von Makrophagen in der

OVA-Gruppe. Dies ist als Verdrängungseffekt der normalen Alveolar-Makrophagen-Population durch den Einstrom eosinophiler Granulozyten anzusehen. Bei Betrachtung der Lymphozytenzahl und der Zahl der neutrophilen Granulozyten in der BAL ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und OVA-Gruppe (Abb. 2.2 D und E). Insgesamt wurde die in der OVA-Gruppe erwünschte allergische Atemwegsentzündung mit Erfolg induziert.



**Abb. 2.1:** Serum-Immunglobulinkonzentrationen 48 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation. Nachgewiesen mit ELISA-Technik. BALB/c Mäuse. Kontrolle (PBS/OVA); OVA (OVA/OVA). MW  $\pm$  SEM; n=10 - 12; \*\*\*p<0,001



**Abb. 2.2:** Leukozytenzahlen in der BAL 48 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation, mit Quick-Diff gefärbt und doppelblind mikroskopisch differenziert. BALB/c Mäuse. Kontrolle: (PBS/OVA); OVA: (OVA/OVA). MW  $\pm$  SEM; n=12; \*p<0,05; \*\*\*p<0,001

### 2.1.3 Zytokinkonzentrationen in der BAL

Tiere, die mit OVA sensibilisiert wurden, wiesen, nachdem sie eine OVA Aerosol-Vernebelung erhalten hatten, erhöhte Werte an inflammatorischen Zytokinen in der BAL auf. Die Konzentrationen des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 fiel hingegen ab.

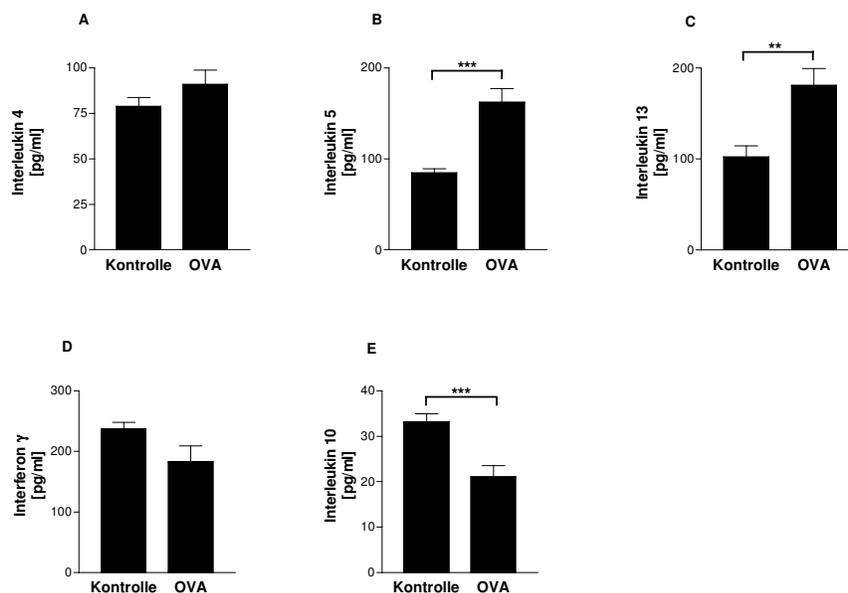
In der umseitig stehenden Abbildung 2.3 sind die Konzentrationen einer Auswahl an Zytokinen aus der BAL im Vergleich zwischen Kontroll- und OVA Gruppe dargestellt.

Die IL-4 Konzentrationen (Abb. 2.3 A) wurden durch das durchgeführte Versuchsprotokoll tendenziell erhöht. Ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und OVA-Gruppe wurde allerdings nicht nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnten signifikant erhöhte IL-5-Konzentration ( $p < 0,001$ ) in der OVA-Gruppe gezeigt werden (Abb. 2.3 B). Das Gleiche galt auch für IL-13 (Abb. 2.3 C): Die Tiere der OVA-Gruppe hatten nach der aerosolischen

Allergenprovokation signifikant höhere IL-13 Konzentrationen in der BAL als die der Kontrollgruppe ( $p < 0,01$ ). Bei Betrachtung des Interferon (IFN)- $\gamma$  (Abb. 2.3 D), wurde eine niedrigere Konzentration in der OVA-Gruppe nachgewiesen, die im Vergleich zur Kontrollgruppe allerdings nicht statistisch signifikant war ( $p = 0,0735$ ).

Indes deutlicher zeigte sich eine Erniedrigung der IL-10-Konzentrationen bei den Tieren der OVA-Gruppe, welche in Abbildung 2.3 E dargestellt sind. Das überwiegend antiinflammatorische Zytokin IL-10 war in der BAL sensibilisierter Tiere, im Vergleich mit den Konzentrationen der Kontrollgruppe, signifikant erniedrigt ( $p < 0,001$ ).

Die Zytokinkonzentrationen in der BAL sensibilisierter und anschließend Allergen-provozierter Tiere wiesen demnach, bezüglich der hier dargestellten Auswahl, alle charakteristischen Veränderungen einer allergischen Atemwegsentzündung auf. Die Effektivität des in dieser Promotionsarbeit verwendeten Sensibilisierungsschemas für allergische Atemwegsentzündungen, konnte somit auch auf der Zytokin-Ebene erfolgreich dargestellt werden.

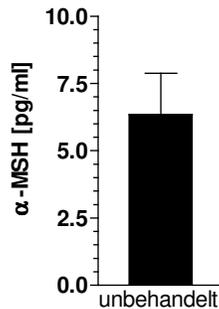


**Abb. 2.3:** Zytokinkonzentrationen in der BAL 48 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation. Gemessen mit ELISA-Technik. BALB/c Mäuse. Kontrolle: (PBS/OVA); OVA: (OVA/OVA). MW  $\pm$  SEM; n=8 - 12; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

## 2.2 Alpha-MSH in der Lunge

Im Folgenden werden der qualitative Nachweis von  $\alpha$ -MSH in der BAL, sowie der Vergleich der  $\alpha$ -MSH-Konzentrationen zwischen sensibilisierten und nicht sensibilisierten Tieren vorgestellt. Des Weiteren wurde der Verlauf der  $\alpha$ -MSH-Konzentrationen über 16 Tage verfolgt. Die  $\alpha$ -MSH-Kinetik ist ebenfalls nachstehend beschrieben.

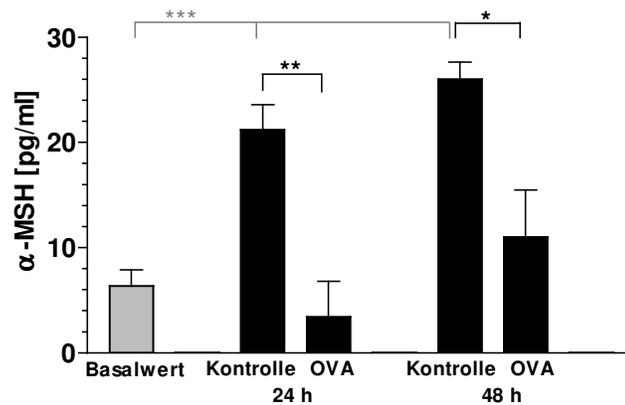
### 2.2.1 Alpha-MSH ist in der BAL nachweisbar



**Abb. 2.4:**  $\alpha$ -MSH Konzentrationen in der BAL. Gemessen mit RIA. BALB/c Mäuse, unbehandelt. MW  $\pm$  SEM; n=7

Um zu zeigen, ob  $\alpha$ -MSH auch in der BAL von gesunden Tieren nachweisbar ist, wurde die BAL unbehandelter BALB/c Mäuse mittels RIA auf  $\alpha$ -MSH untersucht. In der BAL dieser gesunden BALB/c Mäuse war eine Konzentration von  $\alpha$ -MSH mit 6,5 pg/ml im Mittelwert nachweisbar. (siehe Abb. 2.4).

## 2.2.2 Alpha-MSH ist in der BAL allergensierter Tiere erniedrigt



**Abb. 2.5:** α-MSH Konzentrationen in der BAL, 24 und 48 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation. Gemessen mit RIA. BALB/c Mäuse: Basalwert: Unbehandelte Tiere; Kontrolle: (PBS/OVA); OVA: (OVA/OVA). MW ± SEM; n=5; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

BALB/c-Mäuse, die mit OVA sensibilisiert waren und eine OVA-Allergenvernebelung erhielten, wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduzierte Konzentrationen an α-MSH in der BAL auf (p<0,01 nach 24 Stunden, p<0,05 nach 48 Stunden); wie es in der Abbildung 2.5 dargestellt ist.

Die nicht gegen OVA sensibilisierte Kontrollgruppe zeigte als Reaktion auf das OVA-Aerosol signifikant gesteigerte α-MSH Konzentrationen, in Bezug auf die Messungen an nicht provozierten Tieren (Basalwert; p<0,001). Diese Steigerung war sowohl 24 Stunden, als auch 48 Stunden nach der aerosolischen Allergenprovokation signifikant.

Während der Hauptphase der hervorgerufenen allergischen Atemwegsentzündung, die erfahrungsgemäß in den ersten zwei Tagen nach einer aerosolischen Allergenprovokation auftritt, war durchweg eine signifikante Erniedrigung der α-MSH-Konzentrationen in der BAL der gegen OVA sensibilisierten Tiere, im Vergleich zu Kontrolltieren, nachweisbar.

### 2.2.3 Alpha-MSH Kinetik

Um den Verlauf der  $\alpha$ -MSH-Konzentrationen in der BAL nach einem Sensibilisierungsprotokoll darzustellen, wurden diese an den Tagen 1, 2, 4, 8 und 16 nach der aerosolischen Allergenprovokation gemessen. Die Kinetik der  $\alpha$ -MSH Konzentrationen in der BAL ist in der nachstehenden Abbildung 2.6 dargestellt.

An den Tagen 1 und 2 nach der Allergenprovokation war in der BAL der nicht sensibilisierten Kontrolltiere ein massiver Anstieg der  $\alpha$ -MSH-Konzentrationen, verglichen mit den gänzlich unbehandelten Tieren (Basalwert), zu messen ( $p < 0,001$ ). Im Gegensatz dazu waren die  $\alpha$ -MSH-Konzentrationen der gegen OVA sensibilisierten Tiere an den ersten beiden Tagen nach der Allergenprovokation, im Vergleich zur Kontrollgruppe, signifikant reduziert ( $p < 0,01$  nach Tag 1,  $p < 0,05$  nach Tag 2); siehe dazu auch Abschnitt **2.2.2**.

Am vierten Tag nach der Allergenprovokation sanken die  $\alpha$ -MSH-Konzentrationen in der BAL der Kontrolltiere wieder auf in etwa das Niveau des Basalwertes. An Tag 4 zeigte sich daher kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den  $\alpha$ -MSH-Konzentrationen der OVA-Gruppe und der Kontrollgruppe.

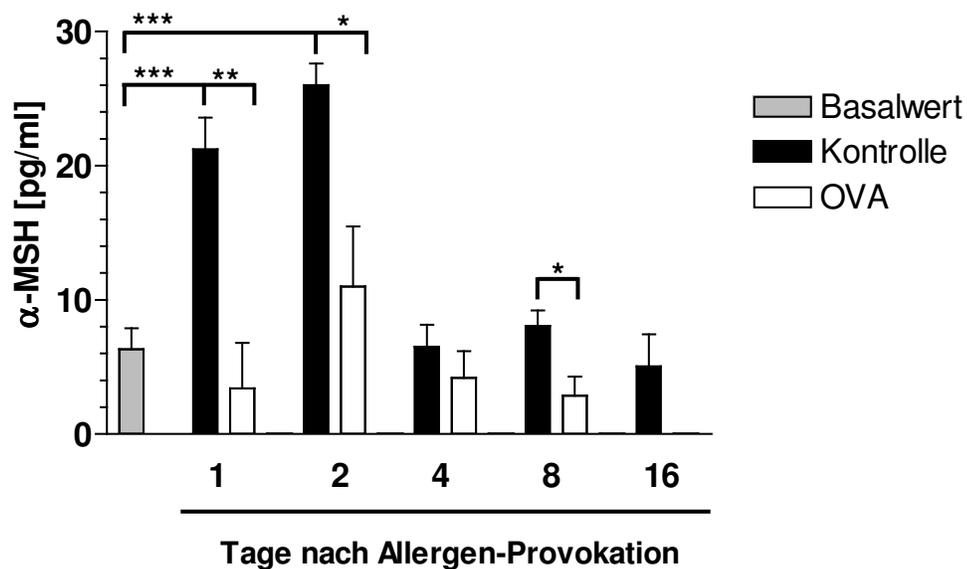
Auch am Tag 8 lagen die  $\alpha$ -MSH Konzentrationen der Kontrolltiere in der Größenordnung des Basalwertes. Die Konzentrationen in der OVA-Gruppe sanken bis unter den Basalwert, so dass acht Tage nach der aerosolischen Allergenprovokation erneut eine signifikante Erniedrigung der  $\alpha$ -MSH-Konzentrationen in der OVA-Gruppe, zur Kontrollgruppe, festzustellen war ( $p < 0,05$ ).

Genau wie an den Tagen 4 und 8, bestand auch am 16. Tag nach der Allergenprovokation kein statistischer Unterschied zwischen dem Basalwert und den  $\alpha$ -MSH-Konzentrationen in der BAL der Kontrolltiere. Bei den gegen OVA sensibilisierten Tieren indessen waren die  $\alpha$ -MSH-Konzentrationen am Tag 16 unter die Nachweisgrenze gefallen.

Das Niveau der  $\alpha$ -MSH-Konzentrationen in der BAL der Kontrolltiere war also nach anfänglichen massiven Erhöhungen an den ersten beiden Tagen nach der Allergenprovokation, ab dem vierten Tag wieder auf das Niveau des  $\alpha$ -MSH Basalwertes gefallen. Die gegen OVA sensibilisierten Tiere zeigten zu

jedem Zeitpunkt eine niedrigere Konzentration von  $\alpha$ -MSH in der BAL, im Vergleich mit den Kontrollen. Der Basalwert wurde nur am zweiten Tag und auch nur im statistisch nicht signifikanten Maße von mit OVA sensibilisierten Tieren überschritten. Nach dem zweiten Tag fielen die  $\alpha$ -MSH Konzentrationen der OVA sensibilisierten Tiere deutlich ab und waren am 16. Tage nach der Allergenprovokation nicht mehr messbar.

Nicht sensibilisierte Tiere reagieren hiernach auf eine aerosolische Allergenprovokation mit einer Erhöhung ihrer  $\alpha$ -MSH Konzentrationen in der BAL, die nach ungefähr vier Tagen wieder auf Normalwerte absinkt. Die gegen OVA sensibilisierten Tiere dagegen zeigen erniedrigte  $\alpha$ -MSH Konzentrationen, im Vergleich zu den Kontrollen.



**Abb. 2.6:** Verlauf der  $\alpha$ -MSH Konzentrationen in der BAL nach aerosolischer Allergenprovokation über 16 Tage. Gemessen mit RIA. BALB/c Mäuse. Grauer Balken: Unbehandelte Tiere (Basalwert). Schwarze Balken: Kontrolle (PBS/OVA); weiße Balken: OVA (OVA/OVA) [i. p./Aerosol]. MW  $\pm$  SEM; n=5; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

## **2.3 Die funktionelle Rolle von $\alpha$ -MSH bei der allergischen Atemwegsentzündung**

Die funktionelle Rolle von  $\alpha$ -MSH bezüglich der allergischen Atemwegsentzündung soll in dieser Promotionsarbeit untersucht werden. Um diesen Sachverhalt aufzuklären und die Hypothese,  $\alpha$ -MSH verhindere die allergische Atemwegsentzündung zu untersuchen, wurde das Modell für die allergische Atemwegsentzündung modifiziert. Versuchsgruppen, in denen eine i. v. Applikation der Neuropeptide  $\alpha$ -MSH und  $\gamma_2$ -MSH vorgenommen wurde, sind hinzugefügt worden (siehe **5.1.2** und **5.1.3**). Es wurden die für die allergische Atemwegsentzündung maßgeblichen Parameter bestimmt. Diese werden in den folgenden Unterpunkten im direkten Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen (siehe **5.1.3**) zueinander dargestellt. Alle zu analysierenden Proben wurden 48 Stunden nach der letzten aerosolischen Allergenprovokation abgenommen. Die Daten der bodyplethysmographischen Untersuchungen wurden 24 Stunden nach der letzten Allergenprovokation erhoben.

### **2.3.1 Alpha-MSH senkt die Produktion allergenspezifischer IgE, IgG1 und IgG2a Antikörper**

Die Konzentrationen der, als Allergieparameter geltenden Immunglobuline im Serum wurden mittels ELISA Technik bestimmt (siehe **5.5**). Die exakten Sensibilisierungs- und Behandlungsschemata der einzelnen Gruppen sind unter **5.1** aufgeführt.

Die Gesamt-IgE-Konzentrationen waren, im Vergleich zur Kontrollgruppe, bei allen mit OVA sensibilisierten Tieren signifikant erhöht. Durch die Applikation von  $\alpha$ -MSH konnte keine signifikante Senkung der Gesamt-IgE-Konzentrationen nachgewiesen werden (siehe Abb. 2.7 A).

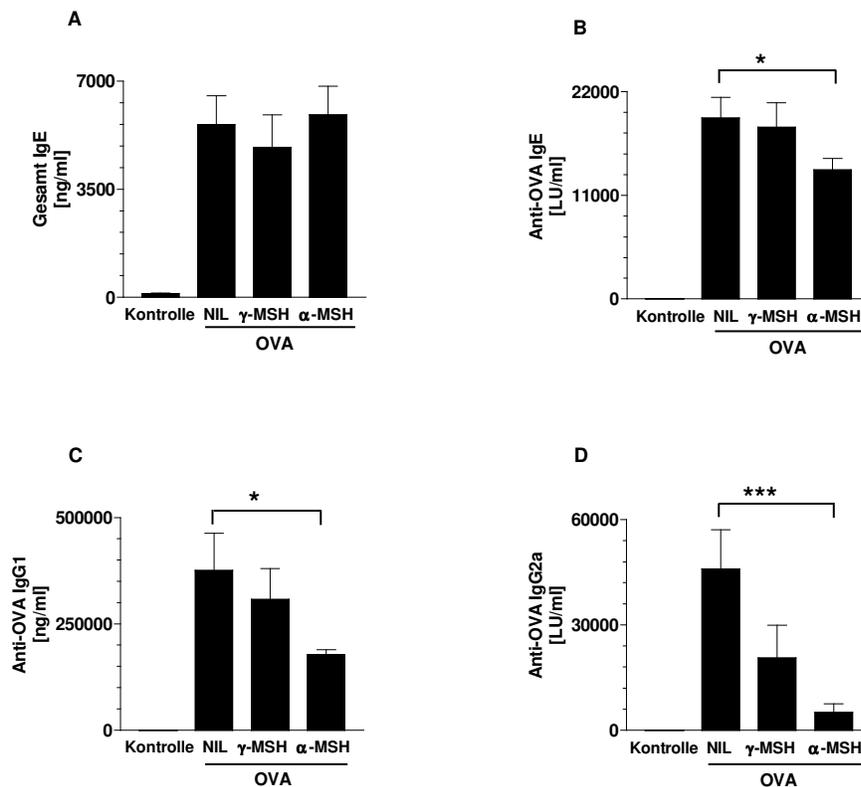
Bei der Analyse der allergenspezifischen Immunglobuline (Abb. 2.7 B – D) ließen sich jedoch signifikant erniedrigte Konzentrationen der jeweiligen Immunglobuline im Serum, nach  $\alpha$ -MSH Gabe, nachweisen:

Abbildung 2.7 B zeigt die Serumkonzentrationen von anti-OVA IgE. Hier wird die signifikante Erniedrigung der anti-OVA IgE-Serumkonzentrationen in der  $\alpha$ -MSH-Gruppe gegenüber der NIL-Gruppe deutlich ( $p < 0,05$ ).

Entsprechendes gilt für die unter Abbildung 2.7 C beschriebenen anti-OVA IgG1 Werte.

In Abbildung 2.7 D sind die Serumkonzentrationen für anti-OVA IgG2a dargestellt. Auch für dieses Immunglobulin lassen sich die antiinflammatorischen Eigenschaften  $\alpha$ -MSHs aufzeigen. Die Erniedrigung der anti-OVA IgG2a-Serumkonzentrationen erreichte verglichen mit der NIL Gruppe sogar ein Signifikanzniveau von  $p < 0,001$ .

Die Applikation von  $\gamma_2$ -MSH hatte keine Auswirkungen auf die Produktion der hier behandelten Immunglobuline.



**Abb. 2.7:** Immunglobulinkonzentrationen im Serum 48 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation. Nachgewiesen mit ELISA Technik. BALB/c Mäuse. Kontrolle: (PBS/OVA); NIL: (OVA/OVA);  $\gamma$ -MSH: ( $\gamma_2$ -MSH/OVA/OVA);  $\alpha$ -MSH: ( $\alpha$ -MSH/OVA/OVA). MW  $\pm$  SEM; n=10 - 12; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

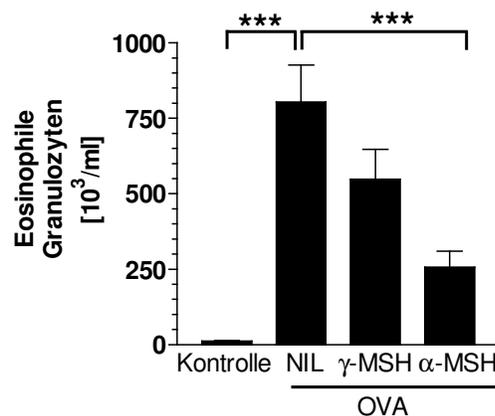
### 2.3.2 Alpha-MSH reduziert den Influx eosinophiler Granulozyten in der BAL

Nachdem BALB/c Mäuse mit OVA sensibilisiert und diese anschließend aerosolisch mit OVA provoziert worden waren, zeigten diese Tiere einen massiven Influx eosinophiler Granulozyten in der BAL. Hier wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe ein Signifikanzniveau von  $p < 0,001$  erreicht (siehe 2.1.2). Die Applikation von  $\alpha$ -MSH verringert diesen Influx eosinophiler Granulozyten signifikant.

In der nachstehenden Abbildung 2.8 sind die Quantitäten eosinophiler Granulozyten in der BAL der einzelnen Versuchsgruppen dargelegt: Tiere, die gegen OVA sensibilisiert wurden (NIL-Gruppe), zeigten nach der Allergenprovokation den erwarteten Influx eosinophiler Granulozyten; die lediglich mit PBS behandelte Kontrollgruppe wies keine erhöhten Zahlen der eosinophilen Granulozyten in der BAL auf ( $p < 0,001$ ).

Die Tiere, die zusätzlich zum Sensibilisierungsprotokoll mit  $\alpha$ -MSH behandelt worden waren, hatten indes im signifikanten Maße weniger eosinophile Granulozyten in der BAL, als die Tiere der NIL Gruppe ( $p < 0,001$ ).

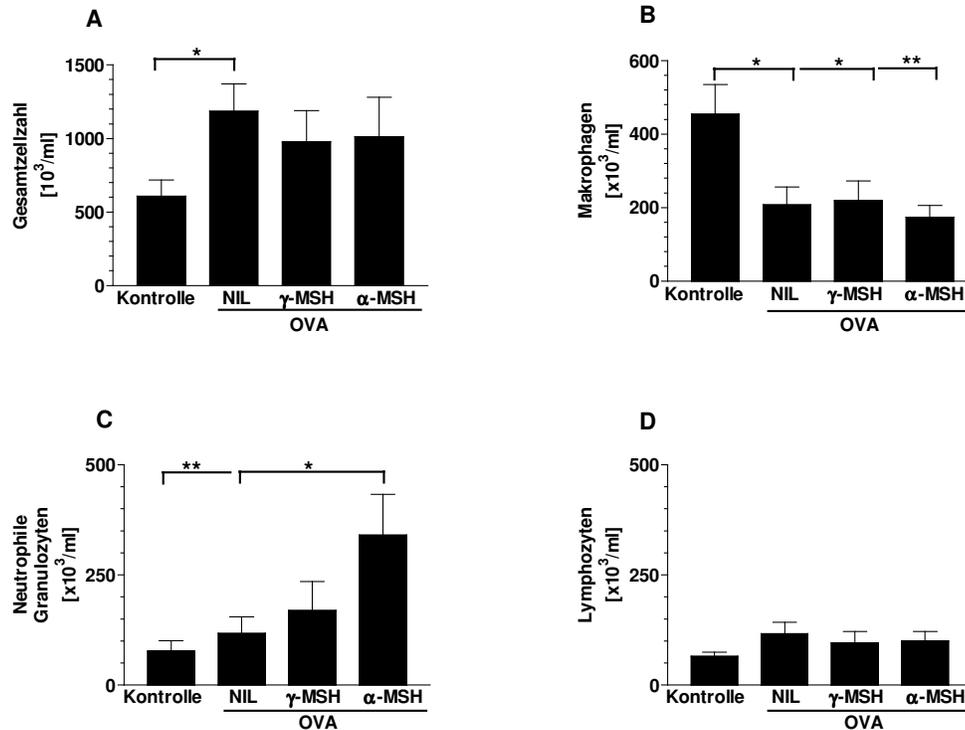
Das bei diesem Versuch verwendete Kontrollneuropeptid  $\gamma_2$ -MSH zeigte, im Hinblick auf die Eosinophilenzahlen, keinen statistisch signifikanten Unterschied verglichen mit der NIL-Gruppe.



**Abb. 2.8:** Eosinophile Granulozyten in der BAL 48 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation. Mit Quick-Diff gefärbt und doppelblind mikroskopisch ausgezählt. BALB/c Mäuse. Kontrolle: (PBS/OVA); NIL: (OVA/OVA);  $\gamma$ -MSH: ( $\gamma_2$ -MSH/OVA/OVA);  $\alpha$ -MSH: ( $\alpha$ -MSH/OVA/OVA). MW  $\pm$  SEM; n=12; \*\*\* $p < 0,001$ .

### 2.3.3 Der Einfluss von $\alpha$ -MSH auf die Zellzusammensetzung in der BAL

Wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben kommt es bei  $\alpha$ -MSH behandelten Tieren zu einer signifikanten Reduktion des eosinophilen Granulozyten Influxes nach einer aerosolischen Allergenprovokation. Aber auch auf Verteilung weiterer Leukozyten in der BAL nimmt die zusätzliche Applikation von  $\alpha$ -MSH zu einem Sensibilisierungsprotokoll (wie bereits zuvor beschrieben) Einfluss. Die unten stehende Abbildung 2.9 beschreibt die Quantitäten verschiedener Leukozyten sowie der Gesamtzellzahl in der BAL. Abbildung 2.9 A zeigt die Gesamtzellzahl in der BAL: Tiere, die ein Sensibilisierungsprotokoll durchlaufen haben und anschließend aerosolische allergenprovoziert worden sind, weisen eine signifikant höhere Zellzahl in der BAL auf als die Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ). Bei Tieren, die zusätzlich mit  $\alpha$ -MSH oder  $\gamma$ -MSH behandelt worden sind, lässt sich zwar ebenfalls ein Anstieg der Gesamtzellzahl nachweisen, statistische Signifikanzen zur Kontrollgruppe, aber auch zur NIL-Gruppe, ergeben sich jedoch nicht. Die Quantitäten der BAL-Makrophagen sind in Abbildung 2.9 B verdeutlicht. Die Tiere der Kontrollgruppe zeigten nachweislich signifikant höhere Zahlen an BAL-Makrophagen im Vergleich zu allen gegen OVA sensibilisierten Versuchsgruppen. Das Signifikanzniveau lag dabei zwischen  $p < 0,05$  (NIL-Gruppe und  $\gamma$ -MSH-Gruppe) und  $p < 0,01$  ( $\alpha$ -MSH-Gruppe). Bei der Betrachtung der neutrophilen Granulozyten (Abbildung 2.9 C) fällt ein deutlicher Influx in der  $\alpha$ -MSH-Gruppe auf. Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten ist in der  $\alpha$ -MSH-Gruppe im Vergleich zur NIL-Gruppe signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ); ebenso besteht verglichen mit der Kontrollgruppe eine statistisch signifikante Erhöhung ( $p < 0,01$ ). Zwischen Kontroll-, NIL- und  $\gamma$ -MSH-Gruppe waren keine signifikanten Unterschiede nachweisbar. Bei der Analyse der Lymphozytenzahlen (Abbildung 2.9 D) hingegen, konnten zwischen keiner der Versuchsgruppen ein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.



**Abb. 2.9:** Leukozytenzahlen in der BAL 48 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation. Mit Quick-Diff gefärbt und doppelblind mikroskopisch ausgezählt. BALB/c Mäuse. Kontrolle: (PBS/OVA); NIL: (OVA/OVA);  $\gamma$ -MSH: ( $\gamma$ -MSH/OVA/OVA);  $\alpha$ -MSH: ( $\alpha$ -MSH/OVA/OVA). MW  $\pm$  SEM; n=8 - 12; \*p<0,05; \*\*p<0,01.

### 2.3.4 Alpha-MSH senkt die Konzentrationen inflammatorischer Zytokine in der BAL

Als weitere Parameter für die allergische Atemwegsentzündung wurden bei den Versuchstieren die Konzentrationen einer Auswahl von inflammatorischen Zytokinen, wie IL-4, IL-5, IL-13 und IFN- $\gamma$ , in der BAL bestimmt. Die folgende Abbildung 2.10 zeigt eine Übersicht der Zytokinkonzentrationen in der BAL der einzelnen Versuchsgruppen:

Die Abbildung 2.10 A beschreibt die IL-4-Konzentrationen in der BAL. Es waren in der  $\alpha$ -MSH-Gruppe signifikant niedrigere IL-4 Konzentrationen zu messen als bei den Tieren der NIL- und  $\gamma$ -MSH-Gruppe ( $p$ <0,05). Allerdings bleibt zu bemerken, dass zwischen der Kontrollgruppe und der mit OVA sensibilisierten NIL-Gruppe, die hier erwarteten Unterschiede in der IL-4-Konzentration nicht nachzuweisen waren. Die zu erkennenden Unterschiede

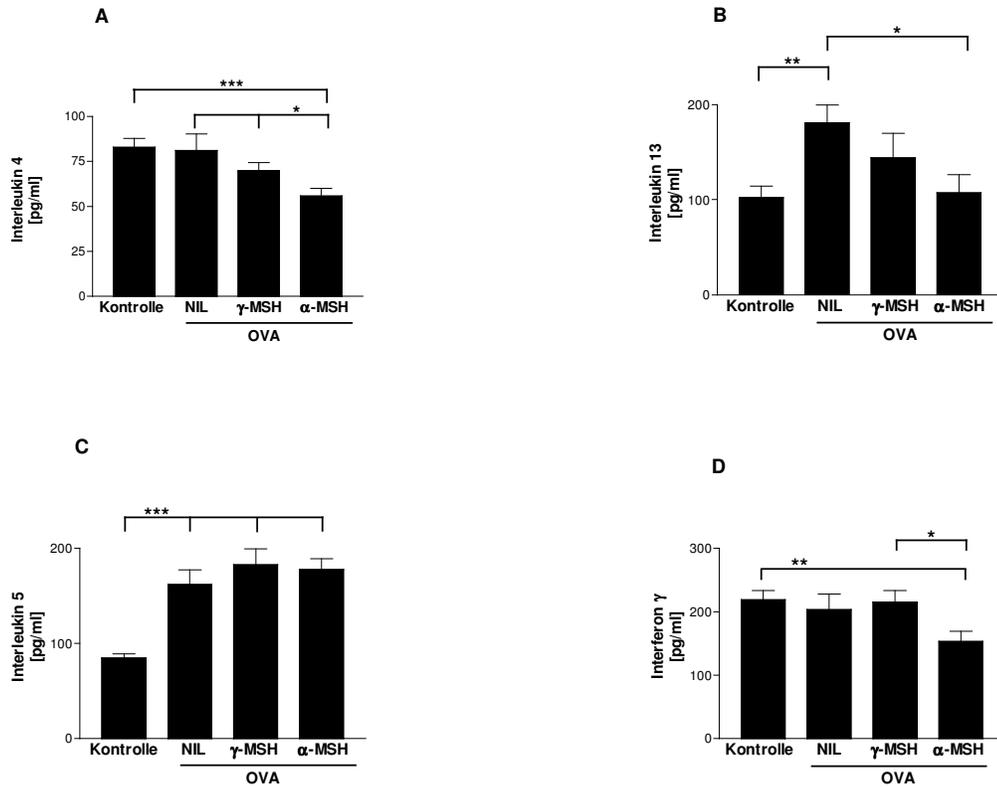
der IL-4-Konzentrationen zwischen Kontroll- und  $\alpha$ -MSH-Gruppe hingegen waren statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ).

Die Zytokinkonzentrationen für IL-13 sind in Abbildung 2.10 B dargestellt. Auch hier waren die Konzentrationen in der BAL bei den Tieren der  $\alpha$ -MSH-Gruppe signifikant niedriger als bei Tieren der NIL-Gruppe ( $p < 0,05$ ). Der erwartungsgemäße Anstieg des IL-13 in der NIL- gegenüber der Kontrollgruppe erwies sich als ebenfalls signifikant ( $p < 0,01$ ).

In Abbildung 2.10 C sind die BAL-Konzentrationen für IL-5 gezeigt. Alle mit OVA sensibilisierten Tiere wiesen eine signifikante Erhöhung der IL-5-Konzentrationen verglichen mit der Kontrollgruppe auf ( $p < 0,001$ ). Eine Senkung der Konzentration dieses inflammatorischen Zytokins, konnte durch die zusätzliche Applikation von  $\alpha$ -MSH im Vergleich zur NIL-Gruppe nicht erreicht werden.

Bei Betrachtung der IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (Abb. 2.10 D) fiel ein signifikanter Abfall in der  $\alpha$ -MSH-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe auf ( $p < 0,01$ ). Bei den Tieren der Kontrollgruppe wurden diskret erhöhte Konzentrationen von IFN- $\gamma$ , verglichen mit der NIL-Gruppe, nachgewiesen (statistisch nicht signifikant). In der  $\gamma$ -MSH-Gruppe hingegen wurden signifikant höhere IFN- $\gamma$ -Konzentrationen als die in der  $\alpha$ -MSH-Gruppe gemessen ( $p < 0,05$ ).

Eine Senkung inflammatorischer Zytokine in der BAL, durch die zusätzliche Injektion von  $\alpha$ -MSH, konnte somit für IL-4 und IL-13 gezeigt werden. Die IL-5-Konzentrationen indessen blieben unbeeinflusst. Ferner bewirkte  $\alpha$ -MSH einen Abfall der IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in der BAL. Durch die Applikation von  $\gamma_2$ -MSH konnten solche Effekte nicht nachgewiesen werden. In der NIL- und  $\gamma$ -MSH-Gruppen wurden durchweg ähnlich hohe Konzentrationen an proinflammatorischen Zytokinen gemessen, statistisch signifikante Unterschiede zwischen diesen beiden Versuchsgruppen bestanden in keinem Fall.



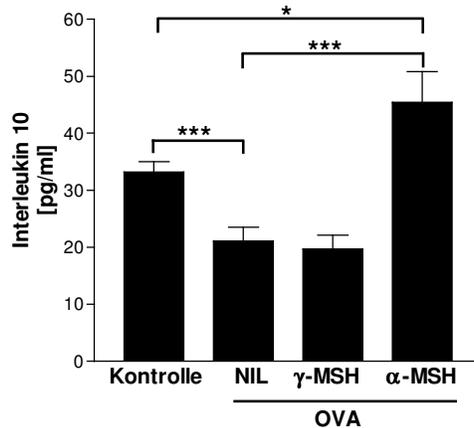
**Abb. 2.10:** Zytokinkonzentrationen in der BAL 48 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation. Gemessen mit ELISA Technik. BALB/c Mäuse. Kontrolle: (PBS/OVA); NIL: (OVA/OVA); γ-MSH: (γ<sub>2</sub>-MSH/OVA/OVA); α-MSH: (α-MSH/OVA/OVA). MW ± SEM; n=10 - 12; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

### 2.3.5 Alpha-MSH steigert die Interleukin-10-Konzentration in der BAL

Die IL-10-Konzentrationen in der BAL waren in der mit α-MSH behandelten Gruppe, im Vergleich zu den Tieren der NIL-Gruppe, signifikant gesteigert (p<0,001; siehe Abb. 2.11).

Der Anstieg der IL-10-Konzentrationen in der α-MSH-Gruppe war darüber hinaus sogar signifikant höher als in der Kontrollgruppe (p<0,05). Im Vergleich zwischen NIL- und Kontrollgruppe, zeigten die Tiere der NIL-Gruppe demgegenüber eine signifikante Reduktion der IL-10-Konzentrationen, nach aerosolischer Allergenprovokation (p<0,001).

Zwischen NIL- und  $\gamma$ -MSH-Gruppe bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede.



**Abb. 2.11:** Interleukin-10-Konzentrationen in der BAL 48 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation. Gemessen mit ELISA Technik. BALB/c Mäuse. Kontrolle: (PBS/OVA); NIL: (OVA/OVA);  $\gamma$ -MSH: ( $\gamma_2$ -MSH/OVA/OVA);  $\alpha$ -MSH: ( $\alpha$ -MSH/OVA/OVA). MW  $\pm$  SEM; n=8 - 12; \*p<0,05; \*\*\*p<0,001.

### 2.3.6 FACS-Analyse aktivierter Makrophagen in der BAL

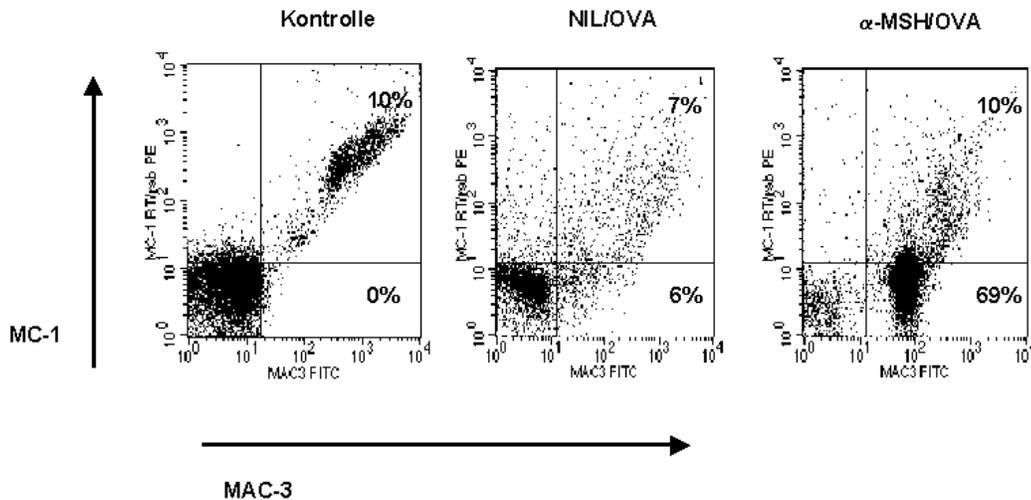
Die Abbildung 2.12 zeigt eine FACS-Analyse von Leukozyten in der BAL. Die Zellpopulation im rechten oberen Quadranten reflektiert die Anzahl von aktivierten Makrophagen (MAC-3 positiv), die den  $\alpha$ -MSH-spezifischen Rezeptor MC-1 exprimieren. Im unteren rechten Quadranten sind Makrophagen repräsentiert, die zwar aktiviert, also MAC-3 positiv sind, jedoch den MC-1-Rezeptor nicht exprimieren.

Bei Tieren der Kontrollgruppe ließen sich insgesamt 10% aktivierte Makrophagen feststellen, die gleichzeitig den MC-1-Rezeptor exprimieren.

In der NIL/OVA-Gruppe fanden sich insgesamt 13% aktivierte Makrophagen. Sieben Prozent dieser Makrophagen zeigten sich aktiviert und exprimierten zusätzlich den MC-1-Rezeptor.

Bei den Tieren der  $\alpha$ -MSH/OVA-Gruppe führte die Behandlung mit  $\alpha$ -MSH zu einer deutlichen Hochregulation des Makrophagen-Aktivierungsmarkers

MAC-3, der auf 79% der Makrophagen exprimiert wurde. Eine Fraktion von 10% der aktivierten Makrophagen der  $\alpha$ -MSH/OVA-Gruppe wies zu dem den MC-1-Rezeptor auf.

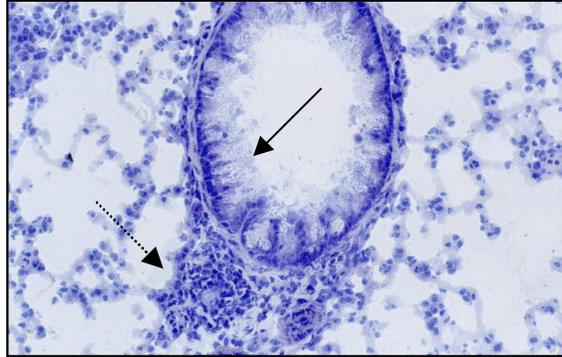


**Abb. 2.12:** FACS-Analyse von Leukozyten in der BAL 48 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation. Zellpool aus jeweils fünf BAL der einzelnen Gruppen. Zellmarkierung MAC-3 detektiert aktivierte Makrophagen, Zellmarkierung MC-1 detektiert den Melanocortin-Rezeptor-1 (MC-1). BALB/c Mäuse. Kontrolle: (PBS/OVA); NIL/OVA: (OVA/OVA) [Ig./Aerosol],  $\alpha$ -MSH/OVA: ( $\alpha$ -MSH/OVA/OVA) [i. v./i. p./Aerosol]. Darstellung aus zwei repräsentativen Versuchen.

### 2.3.7 Alpha-MSH verhindert die peribronchiale entzündliche Infiltration

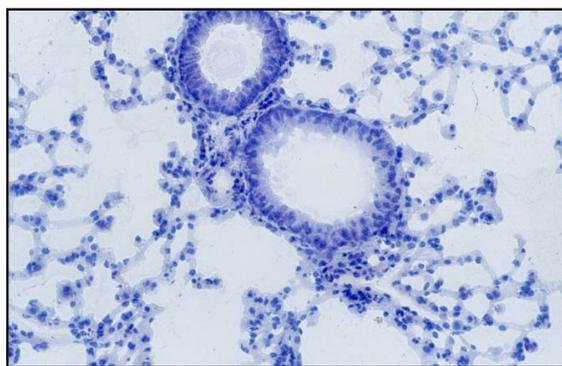
Um einen histologischen Nachweis der allergischen Atemwegsentzündung zu führen, wurden Schnittpräparate aus tiefgefrorenen Lungen der Versuchstiere angefertigt.

Die Lungen der Tiere in der NIL-Gruppe wiesen ein peribronchiales und perivaskuläres Infiltrat an Entzündungszellen auf. Des Weiteren waren am Bronchialepithel Zeichen der Metaplasie und eine Mukus-Überproduktion zu erkennen (siehe schwarze Pfeile, Abb. 2.13 A).



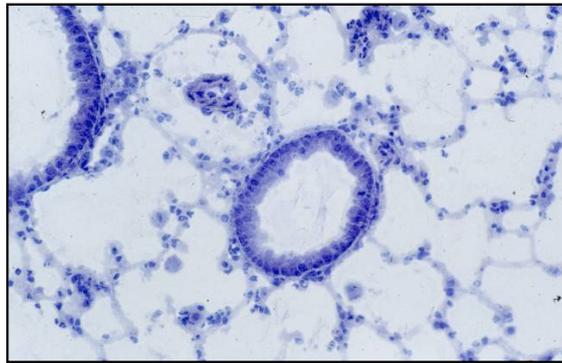
**Abb. 2.13 A:** Histologisches Präparat einer Lunge 48 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation. Kryoschnittpräparat. BALB/c-Maus der NIL-Gruppe: (OVA/OVA) [i. p./Aerosol]. Durchgezogener Pfeil: Mukus-Überproduktion. Gestrichelter Pfeil: Entzündungszellinfiltrat. Vergrößerung 20x2,5. Schnittdicke 7 $\mu$ m, Färbung HE.

Im Gegensatz zu den Veränderungen an den Lungen der mit OVA sensibilisierten Tiere, wiesen die der Kontrollgruppe kein peribronchiales oder perivaskuläres Entzündungsinfiltrat auf. Die nachstehende Abbildung 2.13 B demonstriert die unauffällige Lunge eines Kontrolltieres. Sie zeigt regelrechtes Epithel, peribronchiale und perivaskuläre Infiltrate fehlen, es ist keine übermäßige Schleimproduktion erkennbar:



**Abb. 2.13 B:** Histologisches Präparat einer Lunge 48 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation. Kryoschnittpräparat. BALB/c-Maus der Kontrollgruppe: (PBS/OVA) [i. p./Aerosol]. Vergrößerung 20x2,5. Schnittdicke 7 $\mu$ m, Färbung HE.

An den Lungenschnitten der mit  $\alpha$ -MSH behandelten Tiere, war ein protektiver Effekt von  $\alpha$ -MSH bezüglich der Ausbildung einer Atemwegsentzündung erkennbar. In den Lungen war wie bei den Kontrolltieren kein peribronchiales oder perivaskuläres Entzündungsinfiltrat nachweisbar. Die Abbildung 2.13 C zeigt einen histologischen Schnitt der Lunge eines Tieres aus der  $\alpha$ -MSH-Gruppe:



**Abb. 2.13 C:** Histologisches Präparat einer Lunge 48 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation. Kryoschnittpräparat. BALB/c-Maus der  $\alpha$ -MSH-Gruppe: ( $\alpha$ -MSH/OVA/OVA) [i.v./i.p./Aerosol]. Vergrößerung 20x2,5. Schnittdicke 7 $\mu$ m, Färbung HE.

### 2.3.8 Alpha-MSH verhindert nicht die Atemwegshyperreagibilität

Die Atemwegshyperreagibilität (AHR) ist, neben der allergischen Atemwegsentzündung, eine wichtige Komponente des Asthma bronchiale. Diese wurde in der vorliegenden Promotionsarbeit mit Hilfe der *head-out* Bodyplethysmographie quantifiziert (siehe 5.1.7). Als quantitatives Kriterium der AHR wurde die Methacholinkonzentration ermittelt, welche die mittlere Expirationsflussrate (EF<sub>50</sub>) um 50% verringerte.

Die Dosis, die zu einer 50% Reduktion des expiratorischen Atemflusses führte war 71 $\pm$ 14 mg/ml in der Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu reichte eine Dosis von nur 50 $\pm$ 9,8 mg/ml bei der NIL/OVA-Gruppe und 49 $\pm$ 13,4 mg/ml bei der  $\gamma$ -MSH/OVA-Gruppe aus, um den gleichen Effekt zu erreichen, der eine AHR anzeigt ( $p < 0.001$ ).  $\alpha$ -MSH behandelte allergische Tiere zeigten

eine Tendenz Richtung Normalisierung mit  $56,6 \pm 14$  mg/ml (nicht statistisch signifikant im Vergleich zu Kontrollen, NIL/OVA, und  $\gamma$ -MSH/OVA).

## 2.4 Ein potentieller Mechanismus von alpha-MSH

Der beobachtete Anstieg der IL-10- Konzentrationen in der BAL der mit  $\alpha$ -MSH behandelten Tiere (2.3.4), warf die Frage auf, inwieweit die protektiven Effekte von  $\alpha$ -MSH auf die Entstehung der allergischen Atemwegsentzündung IL-10 vermittelt seien. Aus diesem Grunde wurden IL-10 *knock-out* (IL-10  $-/-$ ) Mäuse dahingehend untersucht, ob bei ihnen die Inhibition der allergischen Atemwegsentzündung ebenfalls über  $\alpha$ -MSH induziert werden könnte. Die IL-10  $-/-$  Mäuse durchliefen ein Versuchsprotokoll, das dem der vorigen Versuche identisch war. Da IL-10  $-/-$  Mäuse auf dem genetischen Hintergrund von C57BL/6 Wildtyp (wt) Mäusen gezüchtet werden, wurde zum adäquaten Vergleich in dem neuen Versuchsprotokoll die Wirkung von  $\alpha$ -MSH auch an C57BL/6 wt Mäusen untersucht.

### 2.4.1 Alpha-MSH zeigt keine antiinflammatorische Wirkung bei IL-10 *knock-out* Mäusen

Die intravenöse Gabe von  $\alpha$ -MSH erbrachte bei IL-10  $-/-$  Mäusen keine Änderung der allergischen Atemwegsentzündung.

Als relevante Parameter für die allergische Atemwegsentzündung wurden, analog zu den vorangegangenen Versuchen, die Zellzusammensetzung in der BAL, sowie das Profil der Immunglobulinkonzentrationen im Serum ausgewählt:

Bei Betrachtung der Gesamtzellzahl in der BAL wies die  $\alpha$ -MSH-Gruppe (verglichen mit der NIL-Gruppe) nahezu identische Zellzahlen auf (siehe Abb. 2.14 B). Ebenso verhielt es sich bei den eosinophilen und neutrophilen Granulozyten (Abb. 2.14 D und F).

Die Analyse der Immunglobuline im Serum ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede für das Gesamt-IgE im Vergleich zwischen NIL- und  $\alpha$ -MSH-Gruppe der IL-10  $-/-$  Mäuse (Abb. 2.15 B). Auch bei Betrachtung spezifischer anti-OVA-Antikörper konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen festgestellt werden: Die Serumkonzentrationen von anti-OVA IgE (Abb. 2.15 D), sowie anti-OVA IgG1

(Abb.2.15 F) und anti-OVA IgG2a (Abb. 2.15 H) waren in der NIL- und  $\alpha$ -MSH-Gruppe annähernd gleich hoch; es ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede nachweisen.

Zusammengefasst konnten bei IL-10  $-/-$  Mäusen durch  $\alpha$ -MSH keine antiinflammatorischen Effekte ausgelöst werden.

#### **2.4.2 Alpha-MSH verhindert die allergische Atemwegsentzündung bei C57BL/6 wt Mäusen**

Alle unter 2.3 beschriebenen antiinflammatorischen Wirkungen von  $\alpha$ -MSH wurden bei Mäusen des Stammes BALB/c beobachtet. Hingegen konnte bei den IL-10  $-/-$  Mäusen eine allergische Atemwegsentzündung durch  $\alpha$ -MSH nicht verhindert werden. Da diese Mäuse auf dem genetischen Hintergrund des C57BL/6 Wildtyps gezüchtet werden, wurden C57BL/6 wt-Mäuse nach dem bereits etablierten Sensibilisierungs- und Behandlungsprotokoll behandelt (siehe 5.1.3) und hinsichtlich möglicher Veränderungen im Modell für die allergische Atemwegsentzündung untersucht.

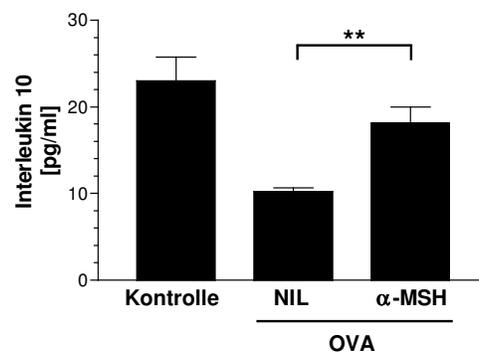
In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ -MSH auch bei C57BL/6 wt-Mäusen antiinflammatorische Eigenschaften bezüglich der allergischen Atemwegsentzündung aufweist.

Bei Betrachtung der Zellzusammensetzung in der BAL fiel in der  $\alpha$ -MSH-Gruppe eine signifikant niedrigere Anzahl eosinophiler Granulozyten verglichen mit der NIL-Gruppe auf ( $p < 0,001$ ; Abb.2.14 C). Des Weiteren kam es bei den Tieren der  $\alpha$ -MSH-Gruppe zu einem signifikanten Influx an neutrophilen Granulozyten ( $p < 0,05$ ), der auch bei BALB/c-Mäusen beobachtet worden war. Die Gesamtzellzahl der BAL wurde durch die  $\alpha$ -MSH Applikation nicht gesenkt (siehe auch Abb. 2.14).

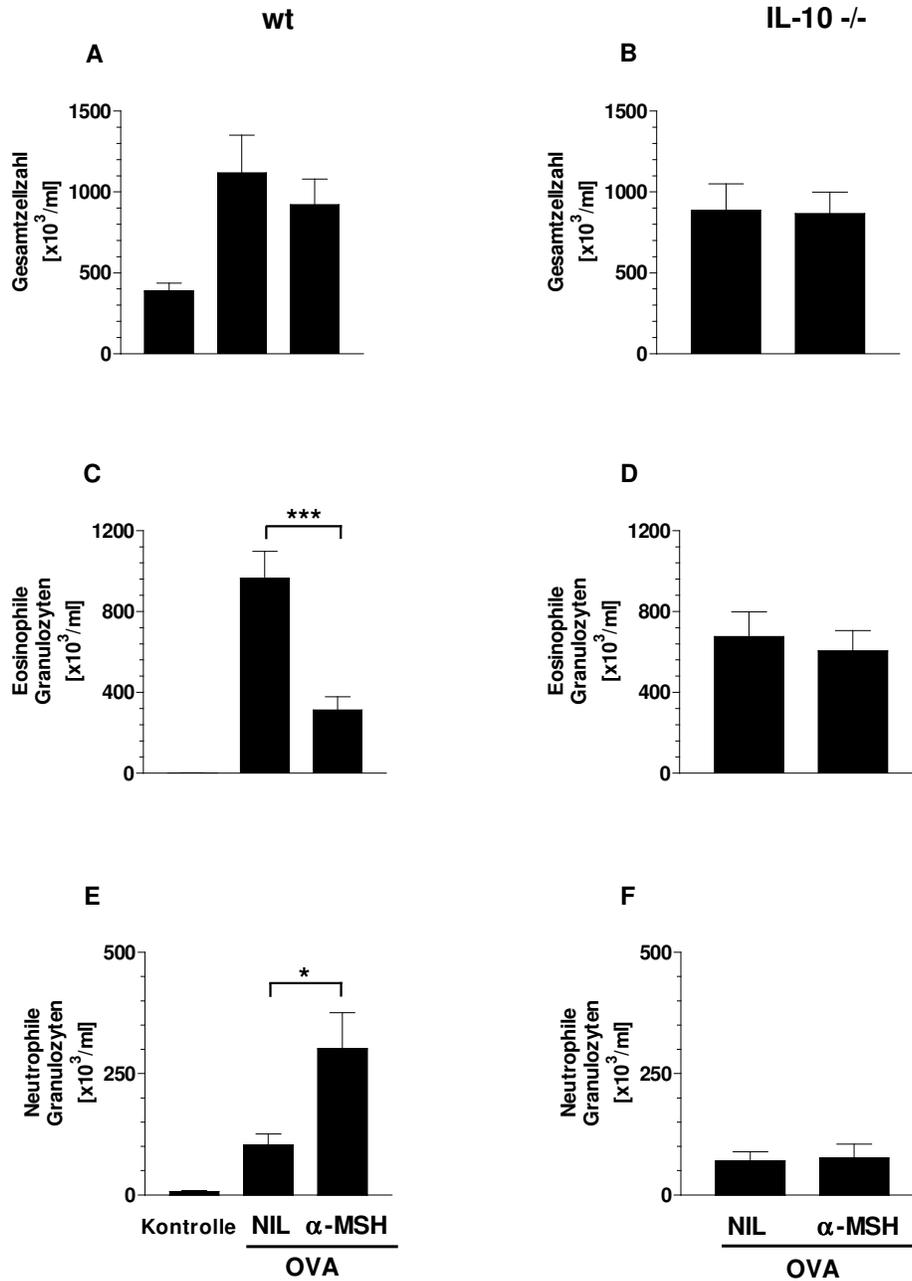
Eine Reduktion der Serumkonzentrationen allergenspezifischer Immunglobuline konnte durch die Behandlung mit  $\alpha$ -MSH ebenfalls nachgewiesen werden (siehe Abb. 2.15). Zwar blieben im Vergleich zwischen NIL- und  $\alpha$ -MSH-Gruppe die Gesamt-IgE und anti-OVA IgG1-Konzentrationen von  $\alpha$ -MSH unbeeinflusst, die Konzentrationen an anti-OVA IgE und anti-OVA IgG2a waren aber signifikant erniedrigt (jeweils  $p < 0,05$ ).

Parallel zu den Versuchen mit BALB/c-Mäusen war auch bei den C57BL/6 wt-Mäusen in der  $\alpha$ -MSH-Gruppe eine deutliche IL-10-Induktion zu verzeichnen (siehe Abb. 2.16). Verglichen mit der NIL-Gruppe konnten signifikant höhere IL-10-Konzentrationen in der  $\alpha$ -MSH-Gruppe gemessen werden ( $p < 0,01$ ).

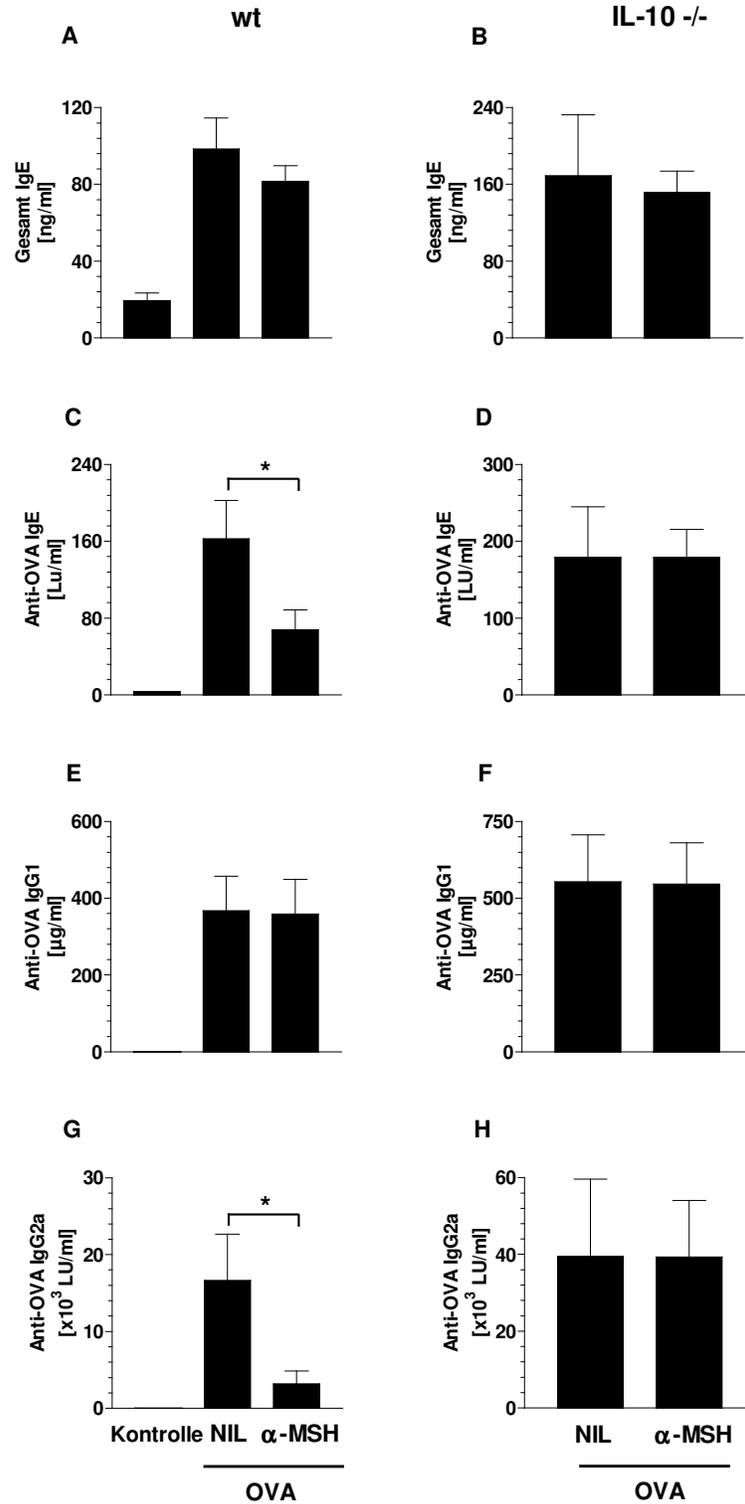
Aufgrund des Umfangs der Abbildungen 2.14 und 2.15 sind diese umseitig am Ende des Kapitels aufgeführt.



**Abb. 2.16:** Interleukin-10-Konzentrationen in der BAL 24 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation. Gemessen mit ELISA Technik. C57BL/6 wt Mäuse. Kontrolle: (PBS/OVA); NIL: (OVA/OVA);  $\alpha$ -MSH: ( $\alpha$ -MSH/OVA/OVA). MW  $\pm$  SEM; n=6 - 9; \*\* $p < 0,01$ . Nachweisgrenze: 7,8 pg/ml.



**Abb. 2.14:** Leukozytenzahlen in der BAL 24 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation. Mit Quick-Diff gefärbt und mikroskopisch doppelblind differenziert. C57BL/6 wt Mäuse (A, C und E) und C57BL/6 IL-10  $-/-$  Mäuse (B, D und F). Kontrolle: (PBS/OVA); NIL: (OVA/OVA);  $\alpha$ -MSH: ( $\alpha$ -MSH/OVA/OVA). MW  $\pm$  SEM; n=8 - 10; \* $p$ <0,05; \*\*\* $p$ <0,001



**Abb. 2.15:** Immunglobulinkonzentrationen im Serum 24 Stunden nach aerosolischer Allergenprovokation. Mit ELISA Technik gemessen. C57BL/6 wt Mäuse (A, C, E und G) und C57BL/6 IL-10  $-/-$  Mäuse (B, D, F und H). Kontrolle: (PBS/OVA); NIL: (OVA/OVA);  $\alpha$ -MSH: ( $\alpha$ -MSH/OVA/OVA). MW  $\pm$  SEM; n=6 - 10; \*p<0,05

### **3 Diskussion**

In der vorliegenden Promotionsarbeit sollte geklärt werden, ob  $\alpha$ -MSH, dessen immunmodulatorischen Effekte bei entzündlichen Hauterkrankungen gut beschrieben sind<sup>62, 63, 84</sup>, auch eine antiinflammatorische Rolle im Mausmodell für allergische Atemwegsentzündung ausübt. Weiterhin sollte geklärt werden, ob  $\alpha$ -MSH, per se in der Lunge nachweisbar ist. Hierzu wurde ein Studienprotokoll in Anlehnung an ein bereits gut etabliertes Mausmodell für allergische Atemwegsentzündung mit verschiedenen Mausstämmen BALB/c, C57BL/6 und C57BL/6 IL-10 <sup>-/-</sup> Mäusen angewandt.<sup>49, 54</sup>

Da die Applikation eines Peptides im Organismus immer auch einen unspezifischen Effekt verursachen kann, wurde als diesbezügliche Kontrolle für das Neuropeptid  $\alpha$ -MSH zusätzlich das Neuropeptid  $\gamma$ -MSH im Studienprotokoll eingesetzt.  $\gamma$ -MSH ist genau wie  $\alpha$ -MSH ein POMC Derivat. Es besitzt allerdings keine nachgewiesenen immunmodulatorischen Eigenschaften. Solche konnten auch in keinem der Versuche im Rahmen dieser Promotionsarbeit nachgewiesen werden. Es kann deshalb als geeignete Kontrolle angesehen werden, um eventuellen unspezifischen Effekten durch die Applikation eines Peptides an sich zu begegnen.

#### **3.1 Der erstmalige Nachweis von $\alpha$ -MSH in der Lunge**

Die beschriebenen antiinflammatorischen Eigenschaften von  $\alpha$ -MSH sollen, gemäß der Hypothese dieser Promotionsarbeit, ebenfalls für die allergische Atemwegsentzündung gelten. Bislang wurde pulmonales Gewebe jedoch noch nicht auf  $\alpha$ -MSH untersucht. Aus diesem Grunde wurde zunächst die BAL völlig unbehandelter BALB/c Mäuse mittels RIA auf  $\alpha$ -MSH untersucht, mit dem Ergebnis, dass  $\alpha$ -MSH in der BAL nachweisbar ist. Dieser positive Befund ist aufgrund der Tatsache, dass die Lunge nicht zu den bislang beschriebenen Zielorganen  $\alpha$ -MSHs gehörte, außergewöhnlich. Er unterstützt aber ganz nachhaltig die aufgestellte Hypothese, dass  $\alpha$ -MSH

auch in der Lunge eine Rolle für immunmodulatorische Funktionen zukommen könnte.

Nach einer aerosolischen Allergenprovokation waren bei nicht sensibilisierten Tieren deutlich erhöhte  $\alpha$ -MSH-Konzentrationen in der BAL zu messen. Ganz im Gegenteil dazu war dieser Effekt bei gegen OVA sensibilisierten Tieren nicht nachzuweisen. Es ist demnach wahrscheinlich, dass  $\alpha$ -MSH in die Regulation des Immunsystems bei Aeroallergen-Exposition eingreift.

Bei den Kontrollgruppen wurde keine allergische Atemwegsentzündung nachgewiesen. Interessanterweise zeigten aber gerade die Kontrollgruppen eine erhöhte Konzentration von  $\alpha$ -MSH in der BAL im Vergleich zu den OVA sensibilisierten Tieren. Dies lässt vermuten, dass allein die Allergenprovokation – ohne Sensibilisierung – wie sie bei der Kontrollgruppe durchgeführt wurde einen Reiz zur  $\alpha$ -MSH Produktion darstellt. Die erniedrigte Konzentration von  $\alpha$ -MSH in der OVA-Gruppe deutet auf eine mögliche Fehlregulation mit Entwicklung einer deutlichen Atemwegsentzündung hin.  $\alpha$ -MSH scheint daher eine wichtige Rolle in der Modulation allergischer Entzündungsreaktionen, auch in der Lunge einzunehmen.

### **3.2 Niedrige Konzentrationen der allergenspezifischen Immunglobuline bei unverändert hohen gesamt IgE-Werten**

Die Synthese allergenspezifischer Immunglobuline, wie anti-OVA IgE, anti-OVA IgG1 und anti-OVA IgG2a, wurde durch die Behandlung mit  $\alpha$ -MSH signifikant gesenkt. Im Gegensatz dazu blieb die Konzentration des Gesamt-IgE von  $\alpha$ -MSH unbeeinflusst. Atopische Erkrankungen gehen oft mit erhöhten Gesamt-IgE-Konzentrationen im Serum einher. Warum nur die allergenspezifischen Immunglobuline in ihrer Produktion gehemmt wurden, ist unklar. Ein möglicher Zusammenhang könnte aber darin bestehen, dass  $\alpha$ -MSH immer 30 Minuten vor den OVA Applikationen verabreicht wurde. Eine stärkere Einflussnahme auf die aktuelle Allergenexposition wäre im Rahmen einer frühzeitigen Behandlung, zum Beispiel Stunden vor der OVA Sensibilisierung/Aerosolprovokation, durchaus denkbar. Auch bei Untersuchungen der Haut konnte in einem Mausmodell nachgewiesen

werden, dass eine Behandlung mit  $\alpha$ -MSH zur spezifischen Toleranzentwicklung gegenüber einzelnen Haptenen führt.<sup>86</sup> In diesen Versuchen wurde  $\alpha$ -MSH i. v. zwei Stunden vor der Sensibilisierung mit dem Hapten appliziert.

Eine generelle Einflussnahme auf die Funktionen von B-Zellen und so auf die Produktion von Immunglobulinen, ist bereits in früheren Studien beschrieben worden.<sup>66, 83</sup> Hierbei konnte nicht nur die Herabsetzung der IgE-Synthese, sondern auch die verringerte Expression an co-stimulatorischen Molekülen, wie CD40 und CD86, gezeigt werden.<sup>70</sup>

### **3.3 Kein Influx eosinophiler Granulozyten trotz erhöhtem IL-5**

Die antiinflammatorischen Eigenschaften von  $\alpha$ -MSH bezüglich der allergischen Atemwegsentzündung zeichneten sich des Weiteren durch die Modulation von Zytokinen in der BAL, sowie durch die Reduktion der eosinophilen Granulozyten im Bronchialtrakt, aus.

Die Konzentrationen von IL-4 und IL-13 wurden durch die Behandlung mit  $\alpha$ -MSH signifikant gesenkt. Allerdings konnte keine Änderung der IL-5-Konzentrationen nachgewiesen werden. IL-5 ist ein ebenfalls für allergische Entzündungsreaktionen charakteristisches Zytokin. Ihm kommt eine Schlüsselrolle in der Aktivierung eosinophiler Granulozyten zu. So führt es zur verstärkten Chemotaxis und Verlängerung der Überlebenszeit eosinophiler Granulozyten.<sup>87, 88</sup> Nichtsdestotrotz wurden bei Tieren der  $\alpha$ -MSH-Gruppe signifikant weniger eosinophile Granulozyten in der BAL gemessen als in der NIL-Gruppe. Ferner war auf histologischen Lungenschnitten in der  $\alpha$ -MSH-Gruppe eine deutliche Abschwächung des peribronchialen, entzündlichen Infiltrats zu erkennen. In Anbetracht der hohen IL-5-Konzentrationen wäre eine mögliche Erklärung dieses Effektes, die verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen, wie VCAM-1 und E-Selektin, auf Endothelzellen, durch  $\alpha$ -MSH. Dass  $\alpha$ -MSH das Potenzial hat, die Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und E-Selektin zu unterdrücken, konnte bereits in einer früheren Studie und auch kürzlich in einem Vaskulitis-Modell gezeigt werden.<sup>89, 90</sup> Ferner modulieren die Zytokine IL-4, IL-13 und TNF- $\alpha$  die Kontrolle der Expression von VCAM-1.<sup>91</sup> So wird

durch die Stimulation mit IL-4 und IL-13 eine erhöhte und verlängerte Expression von VCAM-1 bewirkt.<sup>91</sup> Wie im Ergebnisteil unter **2.3.4** dargestellt ist, reduziert  $\alpha$ -MSH die Produktion dieser Zytokine.

Bei den mit  $\alpha$ -MSH behandelten Tieren fiel neben der signifikanten Senkung der Anzahl der eosinophilen Granulozyten, ein deutlicher Influx neutrophiler Granulozyten auf. Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten war in der  $\alpha$ -MSH-Gruppe signifikant höher als in der NIL-Gruppe. Dieser Effekt konnte in allen untersuchten Mausstämmen, BALB/c Mäusen, als auch Mäusen des Stammes C57BL/6, nachgewiesen werden. Wie es zu diesem Influx kam, ist noch nicht geklärt, allerdings ist in der Literatur eher eine Inhibition der Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten durch die Stimulation mit  $\alpha$ -MSH beschrieben.<sup>92, 93</sup>

### **3.4 Verhinderung der allergischen Entzündung, nicht aber der Atemwegshyperreagibilität**

Obwohl deutlich gezeigt werden konnte, dass  $\alpha$ -MSH die allergische Atemwegsentszündung supprimiert, konnte kein signifikanter Einfluss auf die Atemwegshyperreagibilität (AHR) im Vergleich zu den Kontrollgruppen nachgewiesen werden. Es zeigten sich zwar Unterschiede in der Ausprägung der AHR bei den mit OVA sensibilisierten Tieren im Vergleich zu den mit  $\alpha$ -MSH behandelten Tieren mit einer Tendenz der Besserung der AHR bei  $\alpha$ -MSH-Behandlung, diese Unterschiede waren allerdings nicht statistisch signifikant. Eine mögliche Erklärung für die ausbleibende signifikante Einflussnahme auf die AHR könnte der Applikationsweg von  $\alpha$ -MSH, das bei allen Tieren intravenös appliziert wurde, darstellen. Da  $\alpha$ -MSH nur eine sehr kurze Halbwertszeit hat (1/2 h), könnte möglicherweise die Konzentration von  $\alpha$ -MSH lokal in der Lunge zu niedrig sein, um protektive Effekte auf die Inhibition der AHR auszuüben. Durch eine lokale Applikation von  $\alpha$ -MSH über Aerosolverneblung bzw. direkte Applikation mittels Tropfeninhalation wäre daher eine deutlichere Einflussnahme auf die AHR gut denkbar. Dies wurde allerdings in diesem Versuchsprotokoll nicht untersucht.

In dieser Promotionsarbeit wurde der Einfluß von  $\alpha$ -MSH auf die AHR mittels Methacholinaerosol-Exposition untersucht. Es gibt jedoch viele weitere

Möglichkeiten den Einfluß auf die Kontraktionsfähigkeit der glatten Atemwegsmuskulatur, wie zum Beispiel über Serotonin-, Neurokinin- und Substanz-P abhängige Mechanismen, zu untersuchen. Dass  $\alpha$ -MSH auf diese Mechanismen einen deutlicheren Einfluß als auf die AHR hat, ist gut möglich, wurde bislang aber noch nicht untersucht. Darüber hinaus könnte den eosinophilen Granulozyten bei der AHR eine wesentliche Rolle zukommen. Zwar konnte eine signifikante Reduktion der eosinophilen Granulozyten in der BAL von  $\alpha$ -MSH behandelten Tieren nachgewiesen werden, die Zahl der verbleibenden eosinophilen Granulozyten könnte jedoch ausreichen, um trotzdem noch eine AHR zu induzieren.

### **3.5 Ein potentieller Wirkmechanismus von $\alpha$ -MSH – via Induktion von IL-10**

Parallel zu Untersuchungen über die funktionelle Rolle von  $\alpha$ -MSH in der Haut<sup>62, 86</sup>, wurde in der BAL ein signifikanter Anstieg der IL-10-Konzentrationen nachgewiesen.

IL-10 ist ein überwiegend antiinflammatorisches Zytokin, das immunmodulatorische Wirkungen auf eine Vielzahl von Zellen hat. Zu den IL-10 produzierenden Zellen zählen hauptsächlich TH-2 Zellen, B-Zellen, Keratinozyten, Mastzellen, Makrophagen und Monozyten.<sup>94</sup> Neuere Erkenntnisse zeigen, dass IL-10 maßgeblich immunmodulatorische Eigenschaften auf die Funktionen von Makrophagen, Monozyten, Natürlichen-Killer-Zellen und T-Helferzellen ausübt.<sup>94</sup> So hemmt IL-10 die unterstützenden Zellfunktion von Monozyten bezüglich der IL-4 abhängigen IgE-Synthese.<sup>95</sup> Es konnte ferner gezeigt werden, dass die Stimulation menschlicher Blut-Monozyten mit  $\alpha$ -MSH, bei diesen zu einer signifikant erhöhten IL-10-Synthese führt.<sup>82</sup>

Eine gesteigerte Produktion von IL-10 wurde auch während einer spezifischen anti-allergischen Immuntherapie beobachtet. Die erhöhten IL-10-Konzentrationen korrelieren dabei mit dem Erfolg dieser Therapie.<sup>96</sup> Die Induktion regulativer T-Zellen durch IL-10 scheint für diesen Effekt mitverantwortlich zu sein.<sup>97</sup> Ferner konnte die IL-10-Synthese durch murine, CD4 CD25 positive, regulative T-Zellen nachgewiesen werden.<sup>98, 99</sup>

Dass  $\alpha$ -MSH seine antiinflammatorischen Eigenschaften über eine gesteigerte Produktion von IL-10 entfaltet, ließen schon frühere Studien vermuten. In einem Mausmodell konnte durch eine Behandlung mit  $\alpha$ -MSH eine haptenspezifische Toleranzentwicklung hervorgerufen werden. Wurden dabei allerdings gleichzeitig IL-10-Antikörper appliziert, blieb eine Toleranzentwicklung aus.<sup>86</sup>

Diese Tatsachen und die signifikant erhöhten IL-10-Konzentrationen in der BAL der mit  $\alpha$ -MSH behandelten Tiere, gaben nachhaltigen Anlass zu der Hypothese, dass die hier dargestellten antiinflammatorischen Effekte von  $\alpha$ -MSH potentiell IL-10 vermittelt seien könnten.

Aus diesem Grunde wurden IL-10 *knock-out* (IL-10  $-/-$ ) Mäuse dahingehend untersucht, ob bei ihnen die beobachteten, durch  $\alpha$ -MSH vermittelten, antiinflammatorischen Effekte ebenfalls nachzuweisen waren. Die IL-10  $-/-$  Mäuse durchliefen ein Versuchsprotokoll, das dem der vorigen Versuche identisch war. Und doch wurden bei ihnen bezüglich aller gemessenen Parameter, in der NIL/OVA-Gruppe nahezu identische Ergebnisse wie in der  $\alpha$ -MSH/OVA-Gruppe nachgewiesen. Keiner der zuvor beschriebenen antiinflammatorischen Effekte konnte beobachtet werden. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass  $\alpha$ -MSH seine antiinflammatorischen Eigenschaften in der allergischen Atemwegsentzündung über die Induktion von IL-10 entfaltet. Da IL-10  $-/-$  Mäuse auf dem genetischen Hintergrund des Wildtyps (wt) C57BL/6 Mäusen gezüchtet werden, wurde das  $\alpha$ -MSH Versuchsprotokoll in diesem wt wiederholt. Die bereits für das BALB/c Mausmodell erhobenen Daten konnten auch in diesem wt für C57BL/6 reproduziert werden. So zeigte sich die typische Immunantwort für allergische Atemwegsentzündung mit Nachweis von allergenspezifischen Immunglobulinen, erhöhten Eosinophilenzahlen und gesteigerten Zytokinkonzentrationen von IL-4, IL-5 und IL-13. Durch die Applikation von  $\alpha$ -MSH konnten signifikant niedrigere Zahlen von eosinophilen Granulozyten und Zytokinkonzentrationen in der BAL, sowie signifikant niedrigere anti-OVA IgE- und anti-OVA IgG2a-Konzentrationen im Serum nachgewiesen werden.

Darüber hinaus waren die IL-10-Konzentrationen in der BAL der  $\alpha$ -MSH behandelten Tiere, wie auch in dem BALB/c Mausmodell, signifikant erhöht. Die Reproduzierbarkeit dieses Effektes unterstreicht noch einmal die

Bedeutung des beschriebenen Versuches mit IL-10<sup>-/-</sup> Mäusen, da jetzt die beobachteten Effekte von  $\alpha$ -MSH in dem C57BL/6 wt ebenfalls mit besagter IL-10-Induktion in Verbindung zu bringen sind. Die Hypothese, die antiinflammatorischen Eigenschaften von  $\alpha$ -MSH seien IL-10 vermittelt, wird so weiter bekräftigt.

$\alpha$ -MSH wird im wesentlichen Maße von Monozyten und Makrophagen produziert. Da gerade der Bronchialtrakt reich an Makrophagen ist, könnten diese hauptsächlich für die nachgewiesene  $\alpha$ -MSH-Produktion in der Lunge verantwortlich sein. Zudem wurde auf Makrophagen die Expression des Melanocortin-Rezeptors MC-1 nachgewiesen.<sup>66</sup> Dieser gilt unter den fünf bekannten Melanocortin-Rezeptoren als hochspezifisch für  $\alpha$ -MSH.<sup>66</sup> In der Tat unterdrückt  $\alpha$ -MSH die Produktion einer Reihe von proinflammatorischen Zytokinen, die von Makrophagen ausgeschüttet werden. Im wesentlichen gehören dazu IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ .<sup>70, 80, 100</sup> Aber auch das antiinflammatorische Zytokin IL-10 kann von Makrophagen produziert werden. Makrophagen könnten daher als wichtige Zielzellen von  $\alpha$ -MSH im Bronchialtrakt fungieren.

Weitere Hinweise dafür liefert die FACS-Analyse von BAL-Makrophagen. Wiesen in der NIL/OVA-Gruppe gerade einmal 13% der BAL-Leukozyten den Makrophagen-Aktivierungsmarker MAC-3 auf, so konnte dieser auf 79% der Leukozyten in der  $\alpha$ -MSH/OVA-Gruppe nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigten 10% der Zellen in der  $\alpha$ -MSH/OVA-Gruppe zusätzlich zur MAC-3-Expression, die Expression des Melanocortin-Rezeptors MC-1. Eine deutliche Einflussnahme von  $\alpha$ -MSH auf die Funktionalität von Makrophagen im Bronchialtrakt kann demnach angenommen werden. Es ist daher durchaus denkbar, dass die Behandlung mit  $\alpha$ -MSH zu einer Stimulation der Makrophagen im Bronchialtrakt führt und diese daraufhin verstärkt IL-10 synthetisieren. Diese erhöhte IL-10-Ausschüttung würde dann schlussfolgernd in den beschriebenen Toleranz-induzierenden Effekten von  $\alpha$ -MSH resultieren.

Zusammenfassend können  $\alpha$ -MSH eine Reihe von antiinflammatorischen Eigenschaften bezüglich der allergischen Atemwegsentzündung zugesprochen werden. Der Nachweis für die Senkungen allergenspezifischer

Immunglobuline im Serum und inflammatorischer Zytokine in der BAL wurde erbracht. Die für diese Erkrankung charakteristische bronchiale Eosinophilie, sowie die peribronchiale Entzündungsreaktion wurden ebenfalls supprimiert. Die Inhibition einer AHR konnte allerdings nicht im signifikanten Maße nachgewiesen werden, was möglicherweise durch den Ort der Applikation zu erklären ist.

Zu den wichtigsten Zielzellen von  $\alpha$ -MSH im Bronchialtrakt gehören die Makrophagen, die durch die  $\alpha$ -MSH-Behandlung deutlich aktiviert werden. Als wesentlichen Mechanismus, mit dem  $\alpha$ -MSH seine antiinflammatorischen oder auch Toleranz-induzierenden Wirkungen entfaltet, kann die Induktion des Zytokins IL-10 angenommen werden.

Auch spiegeln sich die Ergebnisse früherer Studien, bezüglich einer antiinflammatorischen Wirkung von  $\alpha$ -MSH bei allergischen Erkrankungen der Haut, hier wieder. So dass abschließend die Hypothese dieser Promotionsarbeit bejaht werden kann: Ein antiinflammatorischer Wirkmechanismus von  $\alpha$ -MSH im Bezug auf die allergische Atemwegsentzündung ist über eine IL-10-Induktion vermittelt.

## **4 Zusammenfassung**

Erkrankungen des atopischen Formenkreises, wie beispielsweise das Asthma bronchiale, die Rhinitis allergica oder die atopische Dermatitis gehören heute zu den großen Volkskrankheiten der Industrienationen. Dabei sind ihre Inzidenzen und Prävalenzen in den letzten Jahren stetig angestiegen.

Aufgrund des meist großen Verlustes an Lebensqualität der Patienten und der fortwährend steigenden Fallzahlen besteht ein hoher Aufklärungsbedarf bezüglich der immunologischen Grundlagen atopischer Erkrankungen, um letztlich neue und wirkungsvollere Therapiestrategien entwickeln zu können.

Die zentrale Hypothese dieser Promotionsarbeit ist, dass das alpha-Melanozyten-stimulierende-Hormon ( $\alpha$ -MSH) die allergische Atemwegsentzündung *in vivo* inhibiert.

Die Lunge ist ein Organ, in dem sich schwerwiegende allergische Erkrankungen manifestieren können. Aufgrund der oftmals beschriebenen antiinflammatorischen Eigenschaften von  $\alpha$ -MSH auf allergische Reaktionen der Haut, wurde die Hypothese aufgestellt, dass  $\alpha$ -MSH auch bezüglich der allergischen Atemwegsentzündung antiinflammatorisch wirke.

Um den Einfluss von  $\alpha$ -MSH auf die allergische Atemwegsentzündung zu untersuchen, wurde ein neues Studienprotokoll in Anlehnung an ein bereits gut etabliertes Mausmodell für allergische Atemwegserkrankungen entworfen. BALB/c-Mäuse wurden systemisch (i. p.) mit dem Modellallergen Ovalbumin (OVA) immunisiert. Weiterhin erfolgte durch eine zweimalige Allergenprovokation mit einem OVA-Aerosol die Induktion der allergischen Entzündung in der Lunge. Einer Versuchsgruppe wurde zusätzlich vor allen Immunisierungs- und Provokationsschritten  $\alpha$ -MSH i. v. appliziert. Als Negativkontrolle zu  $\alpha$ -MSH wurde das Neuropeptid  $\gamma$ -MSH verwendet, von dem bislang keine immunmodulatorischen Funktionen bekannt sind.

Zur Quantifizierung der Atemwegshyperreagibilität wurde die *non-invasive head-out* Bodyplethysmographie herangezogen. Zudem erfolgte bei den

Tieren eine broncho-alveoläre Lavage (BAL). In der BAL-Flüssigkeit wurden zum einen relevante Zytokine mittels ELISA-Techniken bestimmt, zum anderen wurde eine mikroskopische Differenzierung des Zellprofils der BAL durchgeführt. Ferner wurden zur Darstellung des pulmonalen Entzündungsinfiltrates Kryoschnittpräparate von den Lungen der Versuchstiere angefertigt. Weiterhin wurde mittels FACS-Analyse die Expression des für  $\alpha$ -MSH spezifischen Melanocortin-Rezeptors MC-1 auf BAL-Makrophagen, sowie die Expression des Makrophagen-Aktivierungsmarkers MAC-3 untersucht. Mittels Radioimmunoassay erfolgte darüber hinaus erstmalig der Nachweis von  $\alpha$ -MSH in der BAL. Außerdem wurde der Verlauf der  $\alpha$ -MSH-Konzentrationen nach einer aerosolischen Allergenprovokation über 16 Tage gemessen. Des Weiteren wurden mit Hilfe von ELISA-Techniken relevante Immunglobuline aus dem peripheren Blut bestimmt.

Die Analysen ergaben folgende Ergebnisse: In der BAL-Flüssigkeit von Tieren, die parallel zu dem Sensibilisierungsprotokoll mit  $\alpha$ -MSH behandelt wurden, waren die Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-4 oder IL-13, signifikant erniedrigt, im Vergleich zu nur OVA sensibilisierten/provozierten (OVA-Gruppe) Tieren. Im Gegensatz dazu waren die Konzentrationen des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 in der  $\alpha$ -MSH-Gruppe signifikant erhöht. Des Weiteren konnte in der  $\alpha$ -MSH-Gruppe ein signifikanter Abfall der Anzahl von eosinophilen Granulozyten in der BAL-Flüssigkeit, verglichen mit Tieren ohne  $\alpha$ -MSH Behandlung, nachgewiesen werden. Ebenso zeigten die mit  $\alpha$ -MSH behandelten Tiere nicht die sonst bei der allergischen Atemwegserkrankung zu findende peribronchiale entzündliche Infiltration. Die Auswertung der Bodyplethysmographie ergab allerdings nur eine tendenzielle Verringerung der Atemwegshyperreagibilität in der  $\alpha$ -MSH-Gruppe. Hingegen konnte bei der Analyse der Serum-Immunglobuline ein signifikanter Abfall der Konzentrationen von anti-OVA spezifischen Antikörpern bei der  $\alpha$ -MSH-Gruppe im Vergleich zur OVA-Gruppe nachgewiesen werden.

In früheren Studien gab es weitreichende Hinweise darauf, dass die antiinflammatorischen Wirkungen von  $\alpha$ -MSH IL-10 vermittelt sein könnten. Diesbezüglich waren bei den Ergebnissen dieser Promotionsarbeit erhöhte

IL-10-Konzentrationen in der BAL-Flüssigkeit  $\alpha$ -MSH behandelte Tiere aufgefallen. Um zu untersuchen, ob die  $\alpha$ -MSH vermittelten Effekte im vorliegenden Tiermodell ebenfalls IL-10 vermittelt seien, etablierten wir daher ein identisches Studienprotokoll mit IL-10-*knock-out*-Mäusen. Bei den IL-10-*knock-out*-Mäusen konnte keiner der oben aufgeführten antiinflammatorischen Effekte von  $\alpha$ -MSH nachgewiesen werden. Ein IL-10 vermittelter Wirkmechanismus von  $\alpha$ -MSH erscheint demnach wahrscheinlich.

In Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde erstmals  $\alpha$ -MSH in der Lunge nachgewiesen. Zudem bestätigen die vorliegenden Ergebnisse, dass  $\alpha$ -MSH in der Tat eine antiinflammatorische Wirkung im Rahmen der allergischen Atemwegsentzündung innehat. Des Weiteren konnten schlüssige Hinweise auf den immunologischen Mechanismus der durch  $\alpha$ -MSH vermittelten Effekte gewonnen werden, die IL-10 vermittelt erscheinen.

## **5 Methoden**

### **5.1 Behandlungsprotokolle**

Die Untersuchungen der allergischen Atemwegsentzündung wurden in der vorgelegten Promotionsarbeit anhand eines Mausmodelles durchgeführt, das von Herrn Professor Dr. med. Harald Renz und Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Udo Herz im Zentrallabor der Philipps - Universität Marburg etabliert wurde. In der Promotionsarbeit wurde mit 6 - 8 Wochen (Gewicht 18 – 22 g) alten Weibchen der Tierstämme BALB/c, C57BL/6, so wie mit homozygoten C57BL/6 IL-10 *knock-out* Mäusen gearbeitet. Die im Folgenden beschriebenen Methoden gelten für alle in der Promotionsarbeit verwendeten Mausstämme.

Eine Ausnahmegenehmigung gemäß § 9 I S. 4 Tierschutzgesetz wurde vom Regierungspräsidium Giessen unter dem Geschäftszeichen II 25.3 – 19 c 20/16 a MR 20/13 erteilt. Diese Ausnahmegenehmigung gilt für Eingriffe und Behandlungen an Mäusen.

#### **5.1.1 Tierhaltung und -pflege**

Die Anzahl der Tiere pro Käfig muss in Relation zur Käfiggröße gesetzt werden. In einem Standard Mausekäfig (10080 cm<sup>3</sup>) können 4 bis 5 Tiere gehalten werden. Diese Anzahl zu erhöhen verstößt nicht nur gegen ethische Grundsätze, sondern stellt für die Tiere eine enorme Stresssituation dar, was eventuell zu Unregelmäßigkeiten in den Ergebnissen führen kann. Ebenso verhält es sich mit der Reinigung der Käfige. Es ist darauf zu achten, dass die Käfige stets regelmäßig gereinigt und die Tiere mit frischem Wasser und Futter versorgt werden.

Um das Infektionsrisiko möglichst gering zu halten, sind die Käfige der Tiere im Tierstall an eine eigene Luftfilteranlage angeschlossen; alle Käfige haben eine separate Luftzufuhr und können einzeln davon getrennt werden. Die Reinigung der Käfige, so wie das Arbeiten mit den Tieren findet unter einer

sterilen Werkbank statt. Da gerade bei immunologischen Fragestellungen Infektionen der Tiere leicht zu verfälschten Ergebnissen führen, muss auf steriles Arbeiten großen Wert gelegt werden.

Die Grundversorgung der Tiere geschieht durch ausgebildete Tierpfleger beziehungsweise unter deren Anleitung. Die Tiere erhalten Wasser und ovalbuminfreies Futter *ad libitum*.

Allen Tieren wird vor Beginn der Experimente mindestens eine Woche zur Akklimatisation gegeben.

### 5.1.2 Wahl der Behandlung

Das im folgenden Unterpunkt beschriebene Studiendesign basiert auf dem etablierten Mausmodell, mit dessen Hilfe sich eine allergische Atemwegsentzündung hervorrufen lässt.<sup>54</sup>

Um zu der mit  $\alpha$ -MSH behandelten Experimentalgruppe eine Kontrollgruppe zu schaffen, die dem gleichem Versuchsablauf ausgesetzt ist, wird eine der Versuchsgruppen mit  $\gamma_2$ -MSH behandelt. Diese Neuropeptid-Kontrollgruppe wurde eingesetzt, um zu zeigen, dass nicht die Gabe eines Peptides alleine einen immunmodulatorischen Effekt ausübt. Das Neuropeptid  $\gamma_2$ -MSH entsteht, genauso wie  $\alpha$ -MSH, aus der Vorstufe Proopiomelanocortin (POMC).  $\gamma_2$ -MSH besitzt eine von  $\alpha$ -MSH verschiedene Aminosäuresequenz und weist keine publizierte immunmodulatorische Aktivität auf. Das Molekulargewicht von  $\gamma_2$ -MSH ( $C_{74}H_{99}N_{21}O_{16}S$ ) beträgt 1570,7 g/mol, das Molekül besteht aus 12 Aminosäuren. Das Molekulargewicht von  $\alpha$ -MSH ( $C_{77}H_{109}N_{21}O_{19}S$ ) beträgt 1664,9 g/mol,  $\alpha$ -MSH besteht aus 13 Aminosäuren.

### 5.1.3 Studiendesign

Das Zeitschema für alle in der Promotionsarbeit durchgeführten Experimente ist gleich. Als einzige Ausnahme ist das Experiment zur alpha-MSH Kinetik zu nennen, dessen Zeitschema im Anschluss an das allgemeine abgehandelt wird.

Die Arbeitsschritte bei der Sensibilisierung und der aerosolischen Allergenprovokation sind im Folgenden unter eigenen Punkten abgehandelt. Am Analysetag erfolgt die Blutentnahme, so wie die broncho-alveoläre Lavage. Die gewonnenen Proben werden zur weiteren Datenerhebung entsprechend aliquotiert und gelagert.

Allgemeines Zeitschema:

Versuchstag:

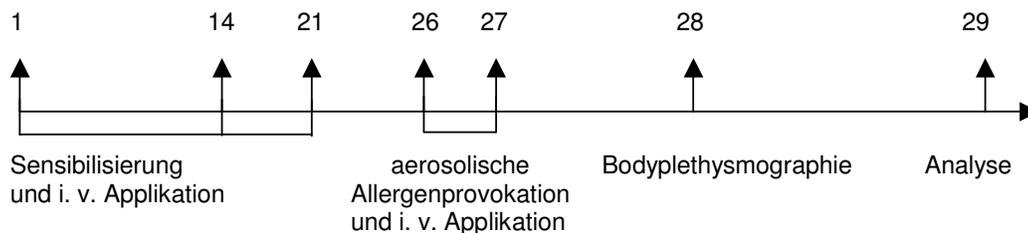


Abb. 5.1

Es werden vier Gruppen gebildet, die nach dem beschriebenen Zeitschema behandelt werden:

1. Gruppe PBS: Diese Gruppe erhält an den Sensibilisierungstagen (1, 14, 21) steriles PBS intraperitoneal (i. p.). An den Tagen 26 und 27 werden die Tiere einem OVA Grad V Aerosol ausgesetzt.  
Kontrollgruppe
2. Gruppe OVA: Diese Gruppe erhält an den Sensibilisierungstagen (1, 14, 21) an Al(OH)<sub>3</sub> absorbiertes OVA Grad VI i. p..  
NIL-Gruppe  
An den Tagen 26 und 27 werden die Tiere einem OVA Grad V Aerosol ausgesetzt.
3. Gruppe  $\gamma$ -MSH: Diese Gruppe erhält an den Sensibilisierungstagen (1, 14, 21) an Al(OH)<sub>3</sub> absorbiertes OVA Grad VI i. p.; 30 Minuten vor der Sensibilisierung wird das Neuropeptid  $\gamma_2$ -MSH intravenös (i. v.) injiziert.  
Kontrollpeptid

An den Tagen 26 und 27 werden die Tiere einem OVA Grad V Aerosol ausgesetzt. 30 Minuten vor der aerosolischen Allergenprovokation wird  $\gamma_2$ -MSH i. v. injiziert.

4. Gruppe  $\alpha$ -MSH: Diese Gruppe erhält an den Sensibilisierungstagen (1, 14, 21) an  $\text{Al}(\text{OH})_3$  absorbiertes OVA Grad VI i. p.; 30 Minuten vor der Sensibilisierung wird das Neuropeptid  $\alpha$ -MSH i. v. injiziert.

An den Tagen 26 und 27 werden die Tiere einem OVA Grad V Aerosol ausgesetzt. 30 Minuten vor der aerosolischen Allergenprovokation wird  $\alpha$ -MSH i. v. injiziert.

Bei dem Experiment zur  $\alpha$ -MSH Kinetik wird wie folgt verfahren:

Es wird das oben aufgeführte Studienprotokoll eingehalten, allerdings entfällt die Bodyplethysmographie am Tag 28. Die Versuchsgruppen (25 Tiere) werden in gleich große Untergruppen à 5 Tieren eingeteilt. Je eine dieser Untergruppen wird an den Tagen 1, bzw. 2, 4, 8 und 16 nach der aerosolischen Allergenprovokation analysiert.

#### **5.1.4 Sensibilisierung**

Um bei den Tieren eine Asthma ähnliche Immunantwort zu induzieren, werden diese mit Ovalbumin (OVA) sensibilisiert. Zur Sensibilisierung wird OVA Grad VI verwendet.

Um eine ausreichende Sensibilisierung zu erlangen, wird den Tieren nach dem unter **5.1.2** beschriebenen Schema, an  $\text{Al}(\text{OH})_3$  absorbiertes OVA intraperitoneal mittels einer 0,55x25 mm Kanüle injiziert. Die Applikationsdosis pro Injektion beträgt 10  $\mu\text{g}$  OVA Grad VI, absorbiert an 1,5

mg  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , gelöst in 200  $\mu\text{l}$  sterilem PBS. Die Applikationslösung wird unter sterilen Bedingungen angesetzt.

An  $\text{Al}(\text{OH})_3$  absorbiertes OVA führt zu einer besseren Sensibilisierungsreaktion. Die Absorption von  $\text{Al}(\text{OH})_3$  an OVA wird durch 15-minütiges Umwälzen in einem Dreiwegehahnssystem erreicht. Im Einzelnen verfährt man wie folgt: An einen Dreiwegehahn werden zwei 5 ml Injektionsspritzen angeschlossen und das dritte Ende verschlossen. Eine der Injektionsspritzen wird mit der Applikationslösung gefüllt. Die Umwälzung erfolgt dann unter Druck von einer Injektionsspritze in die zweite.

Die Injektionen werden bei der Sensibilisierung intraperitoneal unter einer sterilen Werkbank vorgenommen.

Bei der negativ Kontrollgruppe (Gruppe PBS), verfährt man mit den entsprechenden Mäusen identisch, mit der Ausnahme, dass an Stelle des OVA steriles PBS appliziert wird.

### 5.1.5 Applikation der Neuropeptide

Neuropeptide sind sehr instabile Substanzen, deshalb müssen sie zur Aufbewahrung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert werden. Die Neuropeptide werden in PBS, welches 0,1% BSA enthält gelöst und aliquotiert. Die Aliquots werden erst kurz vor Gebrauch aufgetaut, verdünnt und bis zur endgültigen Applikation auf Eis gelagert.

Die Neuropeptide  $\alpha$ -MSH und  $\gamma_2$ -MSH (welches als Kontrollpeptid verwendet wird) werden intravenös injiziert. Die Applikationsdosis beträgt 100  $\mu\text{l}$  á 20  $\mu\text{g}$  Neuropeptid (1 mg/kg Körpergewicht), die Injektion wird 30 Minuten vor der OVA-Sensibilisierung vorgenommen.

Zur intravenösen Injektion wird eine Schwanzvene punktiert, da diese leicht zugänglich und verhältnismäßig kräftig ist. Am besten eignet sich hierfür eine 0,45x13 mm Kanüle. Zunächst wird der Schwanz der Maus in einem Wasserbad erwärmt, um so ein besseres Hervortreten der Venen zu gewährleisten. Die Temperatur des Wassers sollte ca.  $37^\circ\text{C}$  betragen und muss ständig kontrolliert bzw. auf dieser Temperatur gehalten werden. Nach kurzem Aufwärmen im Wasserbad wird der Schwanz durch Zug fixiert und die kräftigste Schwanzvene punktiert. Die 100  $\mu\text{l}$  Applikationsvolumen sollten

möglichst langsam injiziert werden, damit es nicht durch Überdehnung der Gefäßwand zur Ruptur der Vene kommt.

Alle Arbeitsschritte werden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

### **5.1.6 Aerosolische Allergenprovokation**

Um bei den Tieren, nach erfolgter Sensibilisierung gegen OVA, eine Asthma bronchiale ähnliche Immunantwort zu induzieren, werden diese an zwei aufeinander folgenden Tagen für jeweils 20 Minuten einem OVA Aerosol ausgesetzt. Das Aerosol wird mittels eines Verneblers (Master: Typ 84.0100; PARI GmbH, Starnberg) über eine Baby S Aerosolkugel erzeugt, welche mit 7 ml einer 1% Lösung OVA Grad V in sterilem PBS befüllt wird. Die Expositionskammer besteht aus Plexiglas und hat ein Volumen von 5460 cm<sup>3</sup>. Sie verfügt über einen Zulauf, der mit der Aerosolkugel verbunden ist, so wie über einen Ablass, der an den Abzug der Werkbank angeschlossen wird. Die Expositionskammer ist für bis zu 15 Tiere ausgelegt.

### **5.1.7 Bodyplethysmographie**

Die Atemwegsreagibilität wird in der vorgelegten Promotionsarbeit mittels der *non-invasiven head-out* Bodyplethysmographie bestimmt. Die Bodyplethysmographie erfolgt 24 Stunden nach der letzten aerosolischen Allergenprovokation. Ein schematischer Aufbau des Bodyplethysmographen ist in Abbildung 5.2 dargestellt.

Das System besteht aus einer Glasepositionskammer (Volumen 2500 cm<sup>3</sup>), die über einen Zugang für Aerosol- und Dampfgemische verfügt. In diese Expositionskammer sind vier Bodyplethysmographen eingefügt, so dass bis zu vier Tiere gleichzeitig gemessen werden können. Der Rumpf der Tiere befindet sich dabei im Bodyplethysmographen, während der Kopf durch eine individuell gefertigte, luftdichte Latexhalskrause in das Lumen der Expositionskammer ragt. Die durch die Atembewegungen der Tiere bedingten Größenveränderungen ihres Brustkorbes verursachen im luftdicht verschlossenen Bodyplethysmographen Druckschwankungen. Diese sind zur

Atemstromstärke proportional. Die Messung der Atemstromstärke erfolgt über einen dem Bodyplethysmographen aufsitzenden Pneumotachographen und den an diesen angeschlossenen Differenzdruckwandler. Die beschriebenen Druckschwankungen erzeugen einen fluktuierenden Luftstrom im Pneumotachographen, die Fluktuationen sind den Druckschwankungen im Bodyplethysmographen, und somit der Atemstromstärke, proportional. Die Fluktuationen werden vom Differenzdruckwandler erfasst und in ein Atemflusssignal umgewandelt. Dieses wird verstärkt und auf einem Oszilloskop sichtbar gemacht. Gleichzeitig wird das Signal an einem Computer zur weiteren Analyse und Speicherung der Daten weitergeleitet. Jeder einzelne der vier simultan verwendeten Bodyplethysmographen hat einen eigenen Kanal und eine eigenen Verstärker.

Bei der Messung müssen zunächst die Ausgangswerte für jedes Tier bestimmt werden. Dies geschieht in der 15-minütigen Basalwertperiode bei Raumluftatmung. So erhält man einen individuellen Vergleich zur im Anschluss provozierten Atemwegshyperreagibilität (AHR). Die AHR wird über die Abnahme der mittleren Expirationsflussrate ( $EF_{50}$ ) nach Methacholinaerosol Exposition bestimmt. Das Aerosol wird für eine Minute in die Expositions-kammer geleitet, danach folgt eine 3-minütige Erholungsphase bei Raumluftatmung. Dieser Vorgang wird nun mit steigenden Methacholinkonzentrationen, bis hin zu 200 mg/ml gelöst in PBS, wiederholt. Es wird die Methacholinkonzentration bestimmt, die eine Reduktion der mittleren Expirationsflussrate um 50% hervorruft.

## Der head-out Bodyplethysmograph

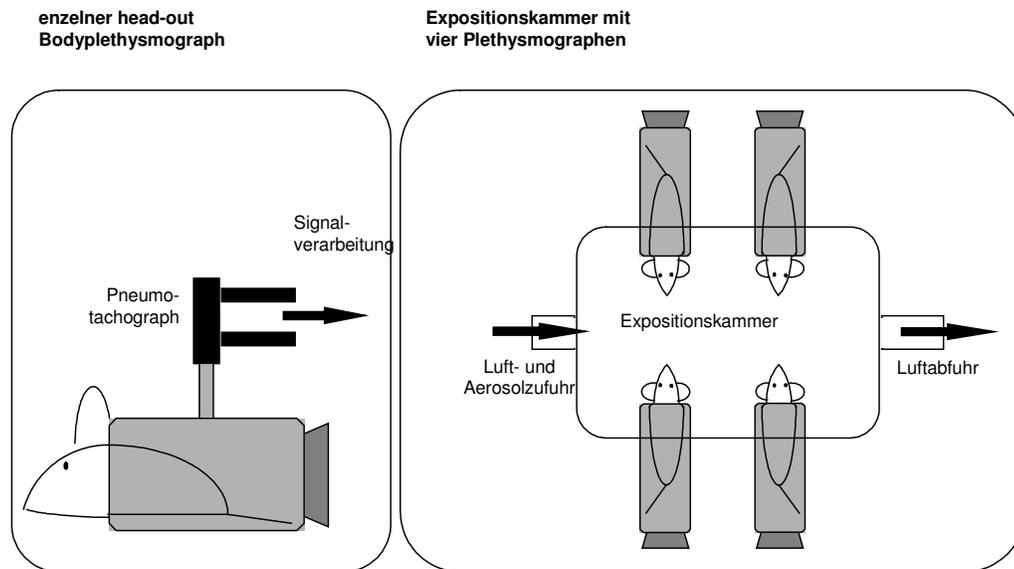


Abb. 5.2

### 5.1.8 Gewinnung von Serum

Bevor man mit der eigentlichen Blutentnahme beginnen kann, müssen die Mäuse in einem Brutkasten über 20 Minuten einer Temperatur von 37°C bis 45°C ausgesetzt werden. Dies dient zur Anregung des Kreislaufes und ermöglicht so, bei der späteren Blutentnahme, ein ausreichendes Volumen zu erzielen.

Die Tiere werden zügig nach dem Aufwärmen in einen Blutentnahmezylinder gesetzt und der Schwanz durch Zug fixiert. Auf der Ventralseite wird der Schwanz proximal mit einem Skalpell geritzt und das austretende Blut in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Nach Sistieren des Blutflusses wird die Wunde durch Druck mit einem sterilen Tupfer noch für einige Zeit verschlossen und das Tier in seinen Käfig zurückgesetzt.

Das so gewonnene Blut bleibt anschließend für zwei Stunden bei Raumtemperatur (RT) stehen. Nach abgelaufener Gerinnung wird es dann bei 4000 g für 20 Minuten bei RT zentrifugiert. Der Serumüberstand wird abpipettiert, bei -80°C eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt zur Bestimmung der Immunglobulinkonzentrationen weiterverarbeitet.

### 5.1.9 Broncho-alveoläre Lavage (BAL)

Für die BAL werden die Tiere durch Genickbruch getötet. Unmittelbar nach Exitus wird die Trachea sorgfältig freipräpariert. Das kraniale Ende der Trachea wird sodann mit einer Klemme geeigneter Größe verschlossen. Ist dies geschehen, wird die Trachea mit einer 0,55x25 mm Kanüle punktiert und über diese 0,8 ml steriles, auf 4°C gekühltes PBS injiziert. Die Flüssigkeit wird vorsichtig und nicht zu schnell wieder aspiriert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Dieser Vorgang wird ein weiteres Mal wiederholt, wobei darauf zu achten ist, dass bei der abermaligen Punktion die Kanüle erneut durch das bereits bestehende Punktionsloch geführt wird, um sicherzustellen, dass die Flüssigkeit auch in die Lungen fließt. Das Aspirat wird in dasselbe Reaktionsgefäß gegeben. Von den insgesamt eingebrachten 1,6 ml PBS müssen mindestens 1,2 ml wieder aspiriert werden, um die Probe verwenden zu können. Angestrebt werden Durchschnittsvolumina von 1,4 ml. Die Proben werden bei allen weiteren Arbeitsschritten auf Eis gelagert.

Die BAL wird nun gewogen, anschließend werden 150 µl für die Zellzählung und den Cytospin separiert. Der Rest wird bei 4000 g für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände werden unverzüglich abgenommen, aliquotiert und bei -80°C tiefgefroren.

Da Zytokine sehr instabile Substanzen sind, ist es nicht möglich eine einmal für eine Diagnostik aufgetaute Probe, ohne erheblichen Verlust erneut tiefzufrieren, um diese beispielsweise zu einem späteren Zeitpunkt nochmals zu verwenden. Dieser Umstand muss bereits bei der Aliquotierung der Proben beachtet werden, um die Qualität der weiteren Analytik nicht zu gefährden. Es werden aus diesem Grund im Vorfeld von jeder Probe Aliquots von ca. 600 µl angelegt.

## 5.2 Zellzählung

Ein wichtiger Parameter für die Atemwegsentzündung ist die Leukozytenzahl in der BAL. Diese wird unter dem Mikroskop mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Aus der frisch gewonnenen BAL entnimmt man, nach sorgfältigem Aufschütteln, 10 µl für die Zellzählung und lagert diese bis zur mikroskopischen Analyse auf Eis.

In der Neubauer-Zählkammer werden vier Quadranten mit jeweils vier Quadranten ausgezählt und die ermittelte Anzahl an Zellen durch vier geteilt.

Die so erhaltene gemittelte Zellzahl ( $Z_m$ ) wird wie folgt auf die gesamte Zellzahl ( $Z_{ges}$ ) hochgerechnet:

$$Z_m \times \text{ml Zellsuspension} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = Z_{ges} / \text{ml}$$

Der Faktor  $10^4$  ist bei Verwendung der Neubauer - Zählkammer eine feststehende Größe, die das Volumen der Zählkammer mit in die Gleichung einbezieht.

### 5.3 Cytospin

Die Zellen, welche sich in der BAL der Tiere befinden, werden zur weiteren histologischen Untersuchung mittels Cytozentrifugation auf Objektträgern angereichert. Der Cytospin wird am Tag der BAL angefertigt. Die Reaktionsgefäße, in denen sich die BAL befindet, werden bis zur Verarbeitung der BAL auf Eis gelagert. Der Cytospin wird wie folgt angefertigt:

Das Eppendorf Reaktionsgefäß (1,5 ml), in dem sich die BAL befindet, wird auf einem Rüttelmischer für einige Sekunden durchgemischt, damit die in der BAL befindlichen Zellen homogen im Reaktionsgefäß verteilt werden. Aus der BAL werden nun 100 µl für die Anfertigung des Cytospins entnommen. Da die Zelldichte in der BAL erfahrungsgemäß zu hoch ist, um später eine genaue Zelldifferenzierung unter dem Mikroskop vornehmen zu können, müssen die entnommenen 100 µl BAL im Verhältnis 1:4 mit gekühltem PBS verdünnt werden. Die resultierenden 400 µl werden dann wiederum auf dem Rüttelmischer sorgfältig durchgemischt. Die Cytospin-Zentrifuge wird mit Objektträgern (76x26 mm) beladen. Von je einer Probe werden immer zwei Cytospins angefertigt, um eine Doppelbestimmung zu gewährleisten. Die

Beschriftung der Objektträger muss mit Bleistift erfolgen, da dieser nicht durch die späteren Färbeschritte abgewaschen wird.

Jeweils 200 µl der angefertigten Verdünnung werden auf einen Objektträger aufgetragen. Die Objektträger werden in der Cytospin-Zentrifuge für fünf Minuten bei 700 g zentrifugiert und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Sind die Objektträger ausreichend getrocknet, wird eine Diff – Quick Färbung vorgenommen. Hierzu werden die Objektträger jeweils zwischen 6 bis 10 Sekunden in die Färbelösung A getauscht. Anschließend werden die Präparate in Aqua bidest abgewaschen und für erneute 6 bis 10 Sekunden in Lösung B getaucht. Abschließend wird identisch mit Lösung C vorgegangen. Nach einer zweistündigen Trocknungszeit, kann dann die mikroskopische Zelldifferenzierung vorgenommen werden.

Um bei der späteren Zelldifferenzierung Fehler aufgrund des Rosenthal-Effektes (Beeinflussung durch die eigene Erwartung des Ergebnisses) zu vermeiden, sollte aus der Beschriftung der Objektträger nicht auf den ersten Blick ersichtlich sein, wie das entsprechende Tier sensibilisiert worden ist. Außerdem sollten die zu einer Doppelbestimmung gehörenden Objektträger nicht direkt hintereinander ausgewertet werden.

## 5.4 Zytokin-ELISA

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zytokin-ELISA arbeiten nach dem *Sandwich*-Prinzip. Auf Mikrotiterplatten (MTP) werden für das zu messende Zytokin spezifische Antikörper (AK) aufgebracht (*coating*). An diese Primär-Antikörper binden die Zytokine, welche sich in den anschließend aufgetragenen Standard- und Probelösungen befinden. Um die Bindungsquantität messen zu können, wird nun ein Sekundär-Antikörper, welcher mit einem Enzym gekoppelt ist und an das zu detektierende Zytokin der Probesubstanz bindet, auf die Mikrotiterplatte gegeben (*detecting*). An das zu bestimmende Zytokin sind nun, zum einen der mit der Mikrotiterplatte verbunden Primär-Antikörper, so wie der enzymgekoppelte Sekundär-Antikörper gebunden. Das an den Sekundär-Antikörper gekoppelte Enzym

löst nach Zugabe eines Indikatorssubstrates eine Farbreaktion aus, die proportional zur gebundenen Zytokinkonzentration in der Probe verläuft. Die Farbintensität wird mittels Photometer-Analysegerät erfasst und in Konzentrationsangaben umgerechnet.

Es versteht sich von selbst, dass eine hinreichende Messgenauigkeit nur durch exaktes Einhalten der Inkubationszeiten, genauestes Auftragen der Lösungen und im Besonderen gründliche Durchführung der Waschschriffe, zu gewährleisten ist.

Die genauen Vorgehensweisen für die einzelnen Zytokin-ELISA sind im Folgenden beschrieben. Die Zusammensetzungen und Konzentrationen der Puffer und Lösungen sind unter **6.3** aufgeführt.

#### **5.4.1 ELISA für IL-4 / IL-5 / IFN- $\gamma$**

Für die Messung dieser Zytokine werden OptEIA Sets der Firma PharMingen verwendet. Die Sets enthalten die Standardlösung, so wie Primär- und Sekundär-Antikörper.

Tag 1: *Coaten* der MTP mit dem Primär-AK. Hierzu wird der Primär-AK nach Herstellervorschrift im *Coating* Puffer gelöst und 50  $\mu$ l pro well aufgetragen. Die MTP wird anschließend über Nacht im Kühlraum (4°C) auf einem Rüttelmischer inkubiert.

Tag 2: Zu Beginn des zweiten Tages wird die MTP dreimal gewaschen, um ungebundene AK zu entfernen. Anschließend werden 200  $\mu$ l *Blocking* Puffer pro well auf die MTP gegeben. Die MTP wird dann für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) auf dem Rüttelmischer inkubiert und erneut dreimal gewaschen. Durch diesen Arbeitsschritt soll verhindert werden, dass die AK unspezifische Bindungen eingehen und somit die Analyse verfälschen. Jetzt werden die zuvor im Assay Puffer angesetzten Standardverdünnungsreihen und die Proben mit 50  $\mu$ l pro well auf die MTP gegeben. Es wird grundsätzlich eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die MTP wird dann zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Rüttelmischer inkubiert und anschließend fünfmal gewaschen. Während der Inkubation wird die im

folgenden Schritt benötigte Arbeitslösung angesetzt. Diese muss spätestens 15 Minuten vor Ablauf der Inkubationszeit fertiggestellt sein, damit diese selbst genügend Zeit zu inkubieren hat. Die Arbeitslösung besteht aus dem Sekundär-AK und dem Enzym Av – HRP, welche zu gleichen Teilen im Assay Puffer nach Herstellervorschrift gelöst werden. Im folgenden Schritt werden 50 µl der Arbeitslösung pro well aufgetragen, die MTP wird eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rüttelmischer inkubiert und anschließend siebenmal gewaschen. Auf die MTP kann jetzt das Substrat (50 µl/well) aufgetragen werden. Durch das an den Sekundär-AK gekoppelte Enzym kommt es zu einer Farbreaktion. Zu beobachten ist eine zunehmende Blaufärbung der Substratlösung. Nach ca. einer viertel Stunde ist die Farbintensität stark genug, um die Reaktion mit 1 M Schwefelsäure abzustoppen. Durch die Schwefelsäure kommt es außerdem zu einem Farbumschlag ins Gelbe. Die MTP wird nach dem Abstoppen der Enzymreaktion im Milena Analysegerät photometrisch analysiert. Die Konzentrationen der Zytokine werden in [pg/ml] angegeben.

#### **5.4.2 ELISA für IL-10 / IL-13**

Für die Bestimmung der Zytokine IL-10 und IL-13 werden Antikörper verwendet, die bei der Firma R&D hergestellt wurden.

Tag 1: *Coaten* der MTP mit dem Primär-AK. Die erworbene AK-Lösung wird 1:125 im *Coating* Puffer verdünnt und mit 50 µl pro well aufgetragen. Die MTP wird anschließend auf einem Rüttelmischer über Nacht bei 4°C inkubiert.

Tag 2: Zum Auftakt des zweiten Tages wird die Platte dreimal gewaschen, wodurch ungebundene AK entfernt werden. Ebenso wie bei den oben beschriebenen OptEIA ELISA Sets, muss um unspezifische Bindungen zu verhindern, ein Inkubationsschritt mit einem *Blocking* Puffer erfolgen, bei dem so genannte Fc-Bindungsstellen, an denen unspezifische Bindungen stattfinden können, abgesättigt werden. Dazu werden 200 µl/well *Blocking* Puffer auf die MTP gegeben und diese für zwei Stunden bei RT auf dem

Rüttelmischer inkubiert, die MTP wird anschließend dreimal gewaschen. Jetzt können die Standardverdünnungsreihen und die Proben in Doppelbestimmung (50 µl/well) aufgetragen werden. Die MTP muss nun erneut über Nacht, bei 4 °C auf dem Rüttelmischer, inkubiert werden.

Tag 3: Der dritte Tag wird mit dem Ansetzen einer 1:125 Verdünnung des Sekundär-AK im Assay Puffer begonnen. Wenn die Verdünnung fertiggestellt ist, wird die MTP dreimal gewaschen. Ist dies geschehen kann der Sekundär-AK mit 50 µl/well aufgetragen werden. Es schließt sich eine Inkubationszeit von zwei Stunden bei RT an; die MTP befinden sich auf dem Rüttelmischer. Während der Inkubationszeit wird eine Streptavidin POD (Peroxidase) Enzymlösung hergestellt. Dazu wird Streptavidin POD 1:600 im Assay Puffer verdünnt und gründlich auf dem Rüttelmischer gemischt.

Nicht gebundene Sekundär-AK werden nach Ablauf der Inkubationszeit durch dreimaliges Waschen entfernt. Nun kann die Enzymlösung (50 µl/well) aufgetragen werden. Um eine Kopplung zwischen dem Enzym und dem Sekundär-AK zu ermöglichen, wird die MTP für 30 Minuten bei RT auf dem Rüttelmischer inkubiert und anschließend überschüssige Lösung durch dreimaliges Waschen entfernt. Es werden jetzt 50 µl/well Substratlösung aufgetragen. Die Umsetzung des Substrates durch das Enzym bewirkt eine blaue Farbreaktion, die nach ca. 15 Minuten ausreichende Intensität erreicht, um diese mit 1 M Schwefelsäure (50 µl/well) abzustoppen. Die Schwefelsäure bewirkt einen Farbumschlag ins Gelbe. Die Intensität der Farbe ist der Zytokinkonzentration in der Probe bzw. dem Standard proportional. Die MTP wird nun im Milena Analysegerät photometrisch analysiert. Die Zytokinkonzentrationen werden vom Analysegerät in [pg/ml] angegeben.

## 5.5 Immunglobulin-ELISA

Die durchgeführten Immunglobulin-ELISA arbeiten, genauso wie die unter 5.4 beschriebenen Zytokin-ELISA, nach dem *Sandwich*-Prinzip. Die genauen Zusammensetzungen von hierbei verwendeten Lösungen sind unter Punkt 6.3 aufgeführt.

Aus dem Serum der Tiere wurden folgende Immunglobuline (Ig) bestimmt:  
Gesamt-IgE, anti-OVA IgE, anti-OVA IgG1, anti-OVA IgG2a

Die Standards für die Bestimmung von anti-OVA IgE und anti-OVA IgG2a wurden nicht kommerziell erworben, sondern aus einem Serumpool gegen OVA sensibilisierter BALB/c Mäuse generiert. Diese Standards werden in der Maßeinheit Labor-Units (LU) angegeben.

Tag 1: Die Mikrotiterplatten für die Bestimmung für Immunglobulinen mit anti-OVA Spezifität werden mit OVA VI 20 µg/ml in sterilem PBS gecoatet. Die MTP für die Bestimmung von Gesamt-IgE wird mit der PC 284.U anti-IgE (1:1500 in sterilem PBS verdünnt) beschichtet. Es werden jeweils 50 µl/well aufgetragen. Nach dem *Coating* werden die MTP bei 4°C auf dem Rüttelmischer bis zum folgenden Tag inkubiert.

Tag 2: Der zweite Tag beginnt mit dreimaligen Waschen der MTP, anschließend werden 150 µl *Blocking* Puffer pro well aufgetragen und dieser für drei Stunden bei Raumtemperatur, unter leichtem Rütteln, auf den MTP belassen. Nachdem die MTP nun abermals dreimal gewaschen wurden, können die Proben und Standards wie folgt aufgetragen werden:

Standard Gesamt-IgE:	250 – 2 ng/ml
Standard anti-OVA IgE:	1000 – 7,8 LU
Standard anti-OVA IgG1:	88 – 3,4 ng/ml
Standard anti-OVA IgG2a:	500 – 2 LU

Die Proben und Standards werden in Doppelbestimmung mit 50 µl pro well aufgetragen.

Die Proben können bei Bedarf in PBS/0,1% Tween 20 verdünnt werden. Sind die Proben und Standards aufgetragen, wird die MTP über Nacht bei 4°C auf dem Rüttelmischer inkubiert.

Tag 3: Zu Beginn des dritten Tages wird die MTP dreimal gewaschen. Jetzt können die Sekundär-Antikörper, welche zuvor zu folgenden Konzentrationen in PBS/0,1% Tween 20 verdünnt wurden, aufgetragen werden (50 µl/well). Der Sekundär-AK anti-IgE wird mit einer Konzentration von 2,5 [µg/ml] aufgetragen, der anti-IgG1 AK mit 0,5 [mg/ml] und schließlich der anti-IgG2a AK mit 0,25 [µg/ml]. Es schließt sich eine zweistündige Inkubationszeit bei RT auf dem Rüttelmischer an.

Die MTP wird nochmals dreimal gewaschen. Anschließend wird die Streptavidin-Peroxidase mit einer 1:1000fachen Verdünnung in PBS/0,1% Tween 20 auf die MTP gegeben (50 µl/well). Sie verbleibt dort für 30 Minuten. Die MTP wird bei RT auf dem Rüttelmischer geschüttelt. Sie wird jetzt erneut dreimal gewaschen und hinterher 150 µl pro well Substrat BM blue aufgetragen. Ebenso wie bei den Zytokin-ELISA führt dies zu einer blauen Farbreaktion. Diese wird mit 2 M Schwefelsäure (50 µl/well) abgestoppt, wenn der Standard mit der geringsten Konzentration vom Leerwert durch eine Blaufärbung zu unterscheiden ist. Nach dem Abstoppen der Farbreaktion wird die MTP photometrisch analysiert.

## 5.6 Radioimmunoassay

Die  $\alpha$ -MSH Konzentrationen in der BAL werden mittels eines kompetitiven Radioimmunoassays (RIA) bestimmt.

Methode: Für den  $\alpha$ -MSH RIA wird ein Antiserum gegen ein  $\alpha$ -MSH-Albumin Konjugat verwendet. Dieses Antiserum ist gegen das C-terminale Ende des  $\alpha$ -MSH Moleküls gerichtet und weist keine Kreuzreaktivität mit dem, aus derselben Vorstufe entstandenen, adrenocorticotropen Hormon auf.

Das  $\alpha$ -MSH in der Probe konkurriert nun mit radioaktiv markierten  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -MSH, welches mit gleicher Affinität gebunden wird, um die Bindung an das

Antiserum. Zur Erhöhung der Sensitivität des RIA, wird  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -MSH dem  $\alpha$ -MSH-Antiserum-Gemisch erst verzögert zugesetzt; je mehr  $\alpha$ -MSH in der Probe vorhanden ist, desto weniger radioaktives  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -MSH kann an die noch verbleibenden Antikörperbindungsstellen binden. Das noch freie  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -MSH wird vom antikörpergebundenen durch die Doppel-Antikörper-Polyethylenglycol (PEG) Präzipitationstechnik separiert. Die Radioaktivität im Präzipitat wird anschließend mit einem Geigerzähler bestimmt. Dadurch, dass der unbekannt Probe definierte Mengen an Antiserum und  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -MSH zugesetzt werden, spiegelt die Radioaktivität des Präzipitats die  $\alpha$ -MSH Konzentrationen in der Probe wieder.

Durchführung: 100  $\mu\text{l}$  der Probe werden in ein 3 ml Reaktionsgefäß aus Glas pipettiert. Anschließend werden 200  $\mu\text{l}$  des anti- $\alpha$ -MSH Serums hinzugefügt und sorgfältig gemischt. Das Gemisch wird für 24 Stunden bei 4 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgt die Zugabe von 200  $\mu\text{l}$   $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -MSH, wiederum sorgfältiges Mischen und erneute 24 Stunden Inkubation bei 4 °C. Am dritten Tag werden dann 500  $\mu\text{l}$  Doppel-Antikörper in das Gemisch gegeben und für weitere 60 Minuten inkubiert. Das Reaktionsgemisch wird darauf hin zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und die Radioaktivität im Präzipitat gemessen. Die Zählzeit für den Geigerzähler beträgt 3 Minuten.

## 5.7 FACS-Analyse von BAL-Makrophagen

Die Analyse im FACS-Zytometer wurde in dieser Promotionsarbeit an Leukozyten aus der BAL vorgenommen. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (4000 x g bei 4 °C über 20 Minuten) separiert, der zellfreie Überstand der BAL dann anderweitigen Analysen zugeführt. Anschließend wurden Zell-Poole aus der BAL von jeweils fünf Tieren je Versuchsgruppe angelegt und in sterilem, auf 4 °C gekühltem PBS gelagert. Damit eine FACS-Analyse durchführbar ist, muss jeder Zell-Pool mindestens  $2 \times 10^5$  Zellen pro ml enthalten. Aus diesem Grunde wurden die Zell-Poole mittels der

Neubauer-Zählkammer auf die enthaltenen Zellzahlen hin überprüft (siehe dazu auch 5.2).

Sind diese Arbeitsschritte ausgeführt worden, kann mit der eigentlichen FACS-Analyse begonnen werden:

Die so gewonnenen und aufbereiteten Zellen werden auf FACS-Röhrchen verteilt. Anschließend wird erneut zentrifugiert (700 x g bei 4°C über 5 Minuten) und die Überstände dekantiert. Es folgt sodann die Zugabe 100 µl PBS/2% BSA (Bovines Serum Albumin) und 2%iges, Hitze inaktiviertes Mausserum. Die Antikörper aus dem Mausserum sollen freie Zellfragmente aus der Zellsuspension abfangen und so unspezifische Bindungen der später zuzugebenden Analyse-Antikörper verhindern. Die Suspension wird 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) unter Lichtabschluss (LA) inkubiert.

Den Röhrchen werden nun 500 µl PBS (4°C) zugesetzt, und es wird abermals abzentrifugiert. Die Einstellungen der Zentrifuge verbleiben dabei wie zuletzt. Nach Dekantieren der Überstände werden die Röhrchen mit 100 µl PBS/2% BSA und 1 µl farbstoffassoziierten Antikörpern befüllt, gefolgt von einer 15 minütigen Inkubation bei RT und LA.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wird als Waschvorgang 1 ml PBS (4°C) auf die Röhrchen gegeben und diese wie gehabt abzentrifugiert. Dieser Vorgang wird nach Dekantierung des Überstandes ein zweites Mal wiederholt. In die Röhrchen werden anschließend 500 µl PBS (4°C) gegeben, sie sind jetzt für das Einsetzen in das FACS-Zytometer bereit.

Für die Belange dieser Promotionsarbeit wurden zum einen Antikörper zur Darstellung der Oberflächen-Expression von MAC-3 und zum anderen Antikörper zur Demonstration der MC-1 Expression eingesetzt. MAC-3 gilt hierbei als ein Marker für aktivierte Makrophagen, MC-1 auf der anderen Seite ist der für  $\alpha$ -MSH hochspezifische Melanocortin-Rezeptor.

Für die MAC-3 Darstellung wurde ein monoklonaler PE konjugierter Antikörper, M3/M84, herangezogen. Als Isotyp-Kontrolle wurde Ratten IgG1  $\kappa$  PE eingesetzt. Die Bestimmung der MC-1 Expression erfolgte mittels eines polyklonalen Hase-anti-Maus Antikörpers. Dieser war direkt gegen die Aminosäuresequenz 2-18 der extrazellulären Domäne gerichtet. Als Sekundär-Antikörper wurden schließlich FITC konjugierte Ziege-anti-Hase Antikörper verwendet.

Das Messfeld wurde auf alle Leukozyten eingestellt, die Messdauer auf 10000 Messereignisse begrenzt. Die Quadranten wurden anhand der Isotyp-/Sekundär-Antikörper Kontrollen festgesetzt. Die Auswertung der Messdaten geschah mittels Cellquest Software.

## 5.8 Gewebefixierung und Gewebeschnitte

Zur histologischen Beurteilung der Atemwegsentzündung wurden Schnittpräparate von den Lungen der Versuchstiere hergestellt. Die Lungen wurden unmittelbar nach Exodus des Versuchstieres entnommen und mit Tissue-Tec fixiert. Direkt im Anschluss erfolgte das Schock-Gefrieren der Lungen in flüssigem Stickstoff. Die Präparate wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und binnen einer Woche weiter verarbeitet. Mit dem Mikrotom wurden  $7\ \mu\text{m}$  dicke Schnitte von den Präparaten angefertigt, die anschließend mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt wurden. Dazu wurden die Objektträger für 15 Sekunden in eine Hämatoxylin-Lösung nach Ehrlich getaucht. Gebläut wurde unter fließendem Leitungswasser, anschließend wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser abgespült. Es schloss sich der Färbeschritt in einer Eosin-Lösung (1 g Eosin auf 100 ml Aqua bidest; 1:10 verdünnt) für 5-10 Minuten an. Die Präparate wurden nach erneutem Abspülen mit destilliertem Wasser getrocknet. Anschließend wurden die Präparate mit Eukitt Eindeckmedium betropft und mit einem Deckgläschen eingedeckt.

## 5.9 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen wurden mit dem Computerprogramm GraphPad Prism 3.02 (GraphPad Software Inc.) durchgeführt. Es wurde der *Student's t test* für unverbundene Stichproben angewandt, das Signifikanzniveau  $p$  wurde auf 0,05 festgesetzt. Die Daten sind als Mittelwerte (MW) +/- *Standard Error of the mean* (SEM) angegeben worden.

## 6 Material und Geräte

### 6.1 Tiere

Tierstamm	Geschlecht	Alter	Züchter und Firmensitz
BALB/c Maus	weiblich	6-8 Wochen	Harlan Winkelmann GmbH Borchen, D
C57BL/6 Maus	weiblich	6-8 Wochen	Harlan Winkelmann GmbH Borchen, D
C57BL/6-IL10 <sup>tm1Cgn</sup> homozygot	weiblich	6-8 Wochen	The Jackson Laboratory Bar Harbour, ME, USA

### 6.2 Geräte und Hilfsmittel

Gerätschaft / Hilfsmittel	Hersteller	Firmensitz
Aerosolkugel, Baby S	PARI GmbH	Starnberg, D
Brutkasten Typ R5	Greisinger	Regenstauf, D
Cellquest <sup>TM</sup> Software	Becton Dickinson	Heidelberg, D
Cytospin Zentrifuge, Cytospin 3	Shandon	Frankfurt/M, D
Differenzdruckwandler	Gaeltec	Dunvegan, GB
ELISA Rüttelmischer MTS 4	IKA Labortechnik	Staufen, D
FACScan flow Cytometer	Becton Dickinson	Heidelberg, D
Finnpipette, (multikanal)	Eppendorf	Hamburg, D
$\gamma$ - counter 1277 Gammamaster	LKB Wallac	Turku, FIN
Heizplatte	IKA Labortechnik	Staufen, D
MAC OS 8.6 Computer	Apple Inc.	Cupertino, USA
Mikroskop	Olympus	Hamburg, D
Mikrotom	GaLa Gabler	Bad Schwallbach, D
Milenia Kinetik Analyzer	DPC Biermann	Bad Nauheim, D
Multipette	Eppendorf	Hamburg, D
Neubauer Zählkammer	Marienfeld	Landau-Königshofen, D
Nunc-Immune Wash 12, ELISA-Handwaschgerät	Nunc	Wiesbaden, D
Oszilloskop KombiGraf 4	Gould	Dietzenbach, D
Personal Computer 486	Peacock	Wünneberg-Haaren, D
Personal Computer Pentium 3	Peacock	Wünneberg-Haaren, D
Pipette, 1 – 10 $\mu$ l	Eppendorf	Hamburg, D
Pipette, 10 – 200 $\mu$ l	Eppendorf	Hamburg, D
Pipette, 100 – 1000 $\mu$ l	Eppendorf	Hamburg, D

Pneumotachograph	Hugo Sachs Elektronik	March-Hugstetten, D
Präperationsbesteck, Klemme	Martin	Tuttlingen, D
Präperationsbesteck, Pinzette	Aesculap	Tuttlingen, D
Präperationsbesteck, Schere	Aesculap	Tuttlingen, D
Rüttelmischer Reax 2000	Heidolph	Schwabach, D
Signalverstärker	Gaeltec	Dunvegan, GB
Sunrise ELISA Analyzer	Tecan	Crailsheim, D
Thermometer	Braun	Melsungen, D
Tierkäfig, Maus Standard	Ehret	Emmendingen, D
Vernebler, Master (Typ 84,0100)	PARI GmbH	Starnberg, D
Waage, (50 mg – 111 g)	Satorius	Göttingen, D
Werkbank, steril	HERAEUS	Hanau, D
Zentrifugen	HERAEUS	Hanau, D

## 6.3 Materialien

### 6.3.1 Reagenzien und Chemikalien

Reagenz / Chemikalie	Hersteller	Firmensitz
Aqua ad injectabilia	Braun	Melsungen, D
BM Blue POD Substrat	Roche	Mannheim, D
BSA Fraktion 5	Sigma	Deisenhofen, D
DadeDiff - Quick Färbelösung 1	Dade Behring AG	Düdingen, CH
DadeDiff - Quick Färbelösung 2	Dade Behring AG	Düdingen, CH
DadeDiff - Quick Fixierlösung	Dade Behring AG	Düdingen, CH
EDTA Dinatriumsalz	MERCK	Darmstadt, D
Eosin	MERCK	Darmstadt, D
Eukitt Eindeckmedium	Kindler	Freiburg, D
FACSClean	Becton Dickinson	Heidelberg, D
FACSFlow	Becton Dickinson	Heidelberg, D
FACSRinse	Becton Dickinson	Heidelberg, D
FACSafe	Becton Dickinson	Heidelberg, D
Fetales Kälber Serum (FKS)	Seromed	Berlin, D
Hämatoxylin	MERCK	Darmstadt, D
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 2,5 M	MERCK	Darmstadt, D
Imjekt Alum	Pierce	Rockford, USA
Mausserum, 2%	DAKO	Glostrup, DK
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , Trockensubstanz	MERCK	Darmstadt, D
NaCl 0,9%	Braun	Melsungen, D

NaHCO <sub>3</sub> , Trockensubstanz	MERCK	Darmstadt, D
OVA V	Sigma	Deisenhofen, D
OVA VI	Sigma	Deisenhofen, D
PBS	PAA Labs.	Linz, A
Streptavidin Peroxidase	Sigma	Deisenhofen, D
Tissue Tec	Sakuraus	Zoeterwoude, NL
Tween 20	MERCK	Darmstadt, D

### 6.3.2 Verbrauchsmaterial

Artikel	Hersteller	Firmensitz
96 well ELISA Platte MaxiSorp	Nunc	Wiesbaden, D
Deckgläser für Objektträger	Menzel Gläser	Braunschweig, D
Dreivegeharn Discifix-3	Braun	Melsungen, D
Filterkarton für Cytozentrifuge	Shandon	Frankfurt/M, D
Injektionsnadel, 0,45 x 13 mm	Becton Dickinson	Heidelberg, D
Injektionsnadel, 0,55 x 25 mm	Becton Dickinson	Heidelberg, D
Kolbenspritze, 1 ml	Becton Dickinson	Heidelberg, D
Kolbenspritze, 5 ml	Becton Dickinson	Heidelberg, D
Minisart steril Filter	Sartorius	Göttingen, D
Mundschutz, einweg	Johnson and Johnson, Medical Inc.	Arlington, TX, USA
Objektträger 76x26 mm	Menzel Gläser	Braunschweig, D
Pipettenspitzen, bis 10 µl	Eppendorf	Hamburg, D
Pipettenspitzen, bis 200 µl	Eppendorf	Hamburg, D
Pipettenspitzen, bis 1000 µl	Eppendorf	Hamburg, D
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf	Hamburg, D
Reaktionsgefäße 3 ml	Falcon, via Becton Dickinson	Heidelberg, D
Reaktionsgefäße 15 ml	Sarsfeld	Nümbrecht, D
Reaktionsgefäße 50 ml	Greiner	Frickenhausen, D
Reaktionsgefäße, ELISA 1,3 ml	Greiner	Frickenhausen, D
Skalpelli, einweg No 15	Produkte für Medizin AG	Köln, D
Untersuchungshandschuhe	Hartmann	Heidenheim, D

### 6.3.3 Antikörper und Neuropeptide

Antikörper / Neuropeptide	Hersteller	Firmensitz
$\alpha$ -MSH	Bachem	Heidelberg, D
$\gamma_2$ -MSH	Bachem	Heidelberg, D
anti-OVA IgE Mouse ELISA Standard	Uni. Marburg, Zentrallabor	Marburg, D
anti-OVA IgG1 Mouse ELISA Standard	Sigma	Deisenhofen, D
anti-OVA IgG2a Mouse ELISA Standard	Uni. Marburg, Zentrallabor	Marburg, D
PC 284.U anti IgE	Binding Site	Heiden/Westf., D
IgE Mouse ELISA Detection AK	PharMingen	Heidelberg, D
IgE Mouse ELISA Standard	PharMingen	Heidelberg, D
IgG1 Mouse ELISA Detection AK	PharMingen	Heidelberg, D
IgG2a Mouse ELISA Detection AK	PharMingen	Heidelberg, D
IL-10 Mouse ELISA Capture AK	R&D	Minneapolis, USA
IL-10 Mouse ELISA Detection AK	R&D	Minneapolis, USA
IL-10 Mouse ELISA Standard	R&D	Minneapolis, USA
IL-13 Mouse ELISA Capture AK	R&D	Minneapolis, USA
IL-13 Mouse ELISA Detection AK	R&D	Minneapolis, USA
IL-13 Mouse ELISA Standard	R&D	Minneapolis, USA
OptEIA Mouse IFN- $\gamma$ Set	PharMingen	Heidelberg, D
OptEIA Mouse IL-4 Set	PharMingen	Heidelberg, D
OptEIA Mouse IL-5 Set	PharMingen	Heidelberg, D
anti-MAC3 AK M3/M84, monokl. PE konj.	PharMingen	Heidelberg, D
anti-MC-1 AK, rabbit-anti-mouse, polyklonal	Inventus Biotec	Münster, D
FACS AK Isotypkontrolle, IgG1, Ratte $\kappa$ PE konj.	PharMingen	Heidelberg, D
FACS Sekundär AK, goat-anti-rabbit, monoklonal, FITC	Dianova	Hamburg, D

### 6.3.4 Lösungen

Lösung	Ansatz
Aluminiumhydrochlorid	1 Flasche Imjekt Alum à 50 ml mit 100 ml PBS steril mischen. Die resultierenden 150 ml werden in 3 x 50 ml portioniert und auf 50 ml Greinerröhrchen aufgeteilt.
PBS / Al(OH) <sub>3</sub> für i. p. Injektionen	Die bereits zuvor angesetzte Aluminiumhydrochloridlösung wird mit PBS steril 1:2 verdünnt.
OVA VI für i. p. Injektionen	OVA VI (100 µg/ml) wird mit der zuvor angesetzten Aluminiumhydrochloridlösung steril 1:2 verdünnt.
OVA V für aerosolische Provokationen	Es wird eine 1% OVA V Lösung in PBS angesetzt. Pro aerosolischer Provokation werden 7 ml dieser Lösung verwendet.
α-MSH für i. v. Injektionen	Die Lösung wird unter sterilen Arbeitsbedingungen angesetzt. 600,64 µl PBS/BSA 0,1% werden mit 4399,36 µl sterilen NaCl 0,9% zu 5 ml aufgefüllt. In diesen wird 1 mg α-MSH gelöst. Es werden Aliquots à 500 µl hergestellt. Endkonzentration: 20 µg α-MSH/100 µl.
γ <sub>2</sub> -MSH (Kontrollpeptid) für i. v. Injektionen	318 µl 2PBS/BSA 0,2% werden mit 318 µl Aqua ad injectabile zu insgesamt 636 µl aufgefüllt. In diesen wird 1 mg γ <sub>2</sub> -MSH gelöst. Es werden Aliquots à 63,6 µl hergestellt. Vor Verabreichung werden die Aliquots mit 463,4 µl sterilen NaCl 0,9% aufgefüllt. Die Endkonzentration beträgt 20 µg γ <sub>2</sub> -MSH/100 µl.

Zytokin - ELISA Waschkonzentrat, 25fach	238,75 g PBS + 12,5 g Tween 20 auf 1 Liter Aqua bidest geben. Um eine gebrauchsfähige Waschlösung zu erhalten: 40 ml Konzentrat auf einen Liter mit Aqua bidest auffüllen.
<i>Coating</i> Puffer für Interleukin ELISA	0,1 M Carbonate; pH 9,5  8,40 g NaHCO <sub>3</sub> + 3,56 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> auf 1 Liter mit Aqua bidest auffüllen.
<i>Blocking/Assay</i> Puffer Für IL-4/IL-5/IFN- $\gamma$ ELISA	10% FKS in PBS  50 ml FKS (inaktiviert) auf 500 ml mit PBS auffüllen.
<i>Blocking</i> Puffer für IL-10/IL-13 ELISA	0,5% BSA in PBS  2,5 g BSA werden in 500 ml PBS gegeben.
<i>Assay</i> Puffer für IL-10/IL-13 ELISA	0,5% BSA 0,05% Tween 20 in PBS  2,5 g BSA + 0,25 g Tween werden in 500 ml PBS gegeben.
Ig - ELISA Waschlösung	PBS/0,1% Tween 20
<i>Coating</i> Puffer für OVA spez. Ig - ELISA	OVA VI 20 $\mu$ g/ml in PBS  10 mg OVA VI werden auf 500 ml PBS gegeben.
<i>Coating</i> Puffer für IgE ELISA	PC 284.U anti IgE binding site 1:1500 in PBS verdünnt

<i>Blocking</i> Puffer für alle Ig ELISA	3% BSA in PBS  15 g BSA werden in 500 ml PBS gegeben.
<i>Assay</i> Puffer für alle Ig ELISA	PBS/0,1% Tween 20

## **7 Literaturverzeichnis**

- <sup>1</sup>**Wettengel R, Berdel D, Hofmann D, Krause J, Kroegel C, Kroidl RF, Leupold W, Lindemann H, Magnussen H, Meister R, Morr H, Nolte D, Rabe K, Reinhardt D, Sauer R, Schultze-Werninghaus G, Ukena D, Worth H.** Empfehlungen zur Asthmathherapie bei Kindern und Erwachsenen. *Pneumologie* 52 **1998**; 591-601
- <sup>2</sup>**Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey Motala C, Ortega Martell JA, Platts-Mills TA, Ring J, Thien F, Van Cauwenberge P, Williams HC.** Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* **2004** May; 113(5): 832-6
- <sup>3</sup>**Holgate ST.** The cellular and mediator basis of asthma in relation to natural history. *Lancet* **1997**; 350 (suppl. 2): 5-9
- <sup>4</sup>**Bentley AM, Menz G, Storz C, Robinson DS, Bradley B, Jeffery PK, Durham SR, Kay AB.** Identification of T lymphocytes, macrophages, and activated eosinophils in the bronchial mucosa in intrinsic asthma. Relationship to symptoms and bronchial responsiveness. *Am Rev Respir Dis* **1992**; 146: 500-506
- <sup>5</sup>**Humbert M, Grant JA, Taborda-Barata L, Durham SR, Pfister R, Menz G, Barkans J, Ying S, Kay AB.** High-affinity IgE receptor (FcεRI)-bearing cells in bronchial biopsies from atopic and nonatopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **1996**; 153: 1931-1937
- <sup>6</sup>**Svanes C, Jarvis D, Chinn S, Burney P.** Childhood environment and adult atopy: results from the European Community Respiratory Health Survey. *J Allergy Clin Immunol* **1999**; 103: 415-420
- <sup>7</sup>**The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steerin Committee.** Worldwide variation in prevalence of symptoms of

asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema. *Lancet* **1998**; 351: 1225-1232

<sup>8</sup>**National Asthma Education and Prevention Programme (NAEPP).** National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) National Institutes of Health, USA **1999**; *Program description, Statistics*

<sup>9</sup>**Gergen PJ, Weiss KB.** Changing patterns of asthma hospitalisation among children: 1979 to 1987. *Jama* **1990**; 264: 1688-1692

<sup>10</sup>**Holt PG, McMenanim C, Nelson D.** Primary sensitisation to inhalant allergen during infancy. *Pediatric Allergy Immunol* **1990**; 1: 3-13

<sup>11</sup>**Stock S, Redaelli M, Luengen M, Wendland G, Civello D, Lauterbach KW.** Asthma: prevalence and cost of illness. *Eur Respir J* **2005** Jan; 25(1):47-53

<sup>12</sup>**Castro-Rodriguez JA, Holberg CJ, Wright AL, Halonem M, Taussig LM, Morgan WJ, et al.** Association of radiologically ascertained pneumonia before age 3 yr with asthmalike symptoms and pulmonary function during childhood – a prospective study. *Am J Respir Crit Care Med* **1999**; 159: 1891-7

<sup>13</sup>**Gern JE, Lemanske RF Jr, Busse WW.** Early life origins of asthma. *J Clin Invest* **1999**; 104: 837-43

<sup>14</sup>**Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B, Bjorksten B.** Asthma and immunoglobulin E antibodies after respiratory syncytial virus bronchiolitis: a prospective cohort study with matched controls. *Pediatrics* **1995**; 95: 500-505

<sup>15</sup>**Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonem M, Taussig LM, et al.** Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* **1999**; 354: 541-5

- <sup>16</sup>**Herz U, Bunikowski R, Renz H.** Role of T cells in atopic dermatitis. New aspects on the dynamics of cytokine production and the contribution of bacterial superantigens. *Int Arch Allergy Immunol* **1998** Mar; 115(3): 179-90
- <sup>17</sup>**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**; 136: 2348-2357
- <sup>18</sup>**Maggie E, Del Prete G, Macchia D, Parronchi P, Tiri A, Chretien I, Ricci M, Romagnani S.** Profiles of lymphokine activities and helper function for IgE in human T cell clones. *Eur J Immunol* **1988**; 18: 1045-1050
- <sup>19</sup>**Kim J, Woods A, Becker-Dunn E, Bottomly K.** Distinct functional phenotypes of cloned Ia-restricted helper T cells. *J Exp Med* **1985**; 162: 188-201
- <sup>20</sup>**Zurawski G, de Vries JE.** Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol Today* **1994**; 15: 19-26
- <sup>21</sup>**Hamelmann E, Oshiba A, Schwarze J, Bradley K, Loader J, Larsen GL, Gelfand EW.** Allergen-specific IgE and IL-5 are essential for the development of airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol* **1997**; 16: 674-82
- <sup>22</sup>**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**; 167: 219-24
- <sup>23</sup>**Walker C, Braun RK, Boer C, Kroegel C, Virchow JC, Hansel TT.** Cytokine control of eosinophils in pulmonary diseases. *J Allergy Clin Immunol* **1994**; 94: 1262-71
- <sup>24</sup>**Strober W, Kelsall B, Fuss I, Marth T, Ludviksson B, Ehrhardt R, Neurath M.** Reciprocal IFN-gamma and TGF-beta responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunol Today* **1997**; 18: 61-64

- <sup>25</sup>**Marh T, Strober W, Seder RA, Kelsall BL.** Regulation of transforming growth factor-beta production by interleukin-12. *Eur J Immunol* **1997**; 27: 1213-1220
- <sup>26</sup>**Martin LB, Kita H, Leiferman KM, Gleich GJ.** Eosinophils in allergy: role in disease, degranulation, and cytokines. *Int Arch Allergy Immunol* **1996**; 109: 207-15
- <sup>27</sup>**Busse WW, Banks-Schlegel S, Wenzel SE.** Pathophysiology of severe asthma. NHLBI Workshop summary. *J Allergy Clin Immunol* **2000**; 106: 1033-42
- <sup>28</sup>**D'Amato G, Liccardi G, D'Amato M, Cazzola M.** Respiratory allergic diseases induced by outdoor air pollution in urban areas. *Monaldi Arch Chest Dis.* **2002**;57(3-4): 161-3
- <sup>29</sup>**Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U et al.** Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med* **2002**; 347: 869-77
- <sup>30</sup>**Renz H, Herz U.** The bidirectional capacity of bacterial antigens to modulate allergy and asthma. *Eur Respir J* **2002**;19(1): 158-71
- <sup>31</sup>**Herz U, Lacy P, Renz H, Erb K.** The influence of infections on the development and severity of allergic disorders. *Curr Opin Immunol* **2000**;12(6): 632-40
- <sup>32</sup>**Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich Kautzky E, Schou C, Krishnaswamy G, Beaty TH.** Linkage analysis of IL-4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* **1994**; 264: 1152-1156
- <sup>33</sup>**Nickel R, Wahn U, Hizawa N, Maestri N, Duffy DL, Barnes KC, Beyer K, Forster J, Bergmann R, Zepp F, et al.** 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**; 46: 159-162

- <sup>34</sup>**Pykalainen M, Kinoshita R, Valkonen S, Rydman P, Kilpeläinen M, Laitinen LA, Karjalainen J, Nieminen M, Hurme M, Kere J, Laitinen T, Lahesmaa R.** Association analysis of common variants of STAT6, GATA3, and STAT4 to asthma and high serum IgE phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* **2005** Jan;115(1): 80-7
- <sup>35</sup>**von Mutius E, Martinez FD, Fritzsche 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
- <sup>36</sup>**von Mutius E, Weiland SK, Fritzsche 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
- <sup>37</sup>**Barnes PJ.** Neuroeffector mechanisms: The interface between inflammation and neuronal response. *J Allergy Clin Immunol* **1996**; 98: 73-81
- <sup>38</sup>**Kaltreider HB, Ichikawa S, Byrd PK, Ingram DA, Kishiyama JL, Sreedharan SP, Warnock ML, Beck JM und Goetzel EJ.** Upregulation of neuropeptides and neuropeptide receptors in a murine model of immune inflammation in lung parenchyma. *Am J Respir Cell Mol Biol* **1997**; 16: 133-144
- <sup>39</sup>**Casale TB.** Neurogenic control of inflammation and airway function. *Allergy principles and practice. St. Louis, USA* **1996**; pp. 650-671
- <sup>40</sup>**Renz H.** Neurotrophins in bronchial asthma. *Respir Res* **2001**; 2(5): 265-8
- <sup>41</sup>**Nockher WA, Renz H.** Neurotrophins in inflammatory lung diseases: modulators of cell differentiation and neuroimmune interactions. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **14** **2003**; 559–578
- <sup>42</sup>**Buckley TL und Nijkamp FP.** Airways hyperreactivity and cellular accumulation in a delayed-type hypersensitivity reaction in the mouse. Modulation by capsaicin-sensitive nerves. *Am J Respir Crit Care Med* **1994**; 149: 400-7

- <sup>43</sup>**Matsuse T, Thomson RJ, Chen XR, Salari H und Schellenberg RR.** Capsaicin inhibits airway hyperresponsiveness but not lipoxygenase activity or eosinophilia after repeated aerosolized antigen in guinea pigs. *Am Rv Resir Dis* **1991**; 144: 368-72
- <sup>44</sup>**Barnes PJ.** Mechanisms of action of glucocorticoids in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **1996**; 154 (2 pt 2): 21S-25S
- <sup>45</sup>**Quinn JM.** The side effects if inhaled corticosteroids. *Insights Allergy* **1994**; 9: 1-8
- <sup>46</sup>**Lipworth BJ.** Systemic adverse effects if inhaled corticosteroid therapy. A system review and meta-analysis. *Arch Intern Med* **1999**; 159: 941-955
- <sup>47</sup>**Jardieu PM, Fick RB Jr.** IgE inhibition as a therapy for allergic disease. *Int Arch Allergy Immunol* **1999**; 118: 112-115
- <sup>48</sup>**Barnes PJ.** Anti-IgE Therapy in Asthma: Rationale and Therapeutic Potential. *Int Arch Allergy Immunol* **2000**; 123: 196-204
- <sup>49</sup>**Herz U, Lumpp U, Da Palma JC, Enssle K, Takatsu K, Schnoy N, Daser A, Köttgen E, Wahn U, Renz H.** The relevance of murine animal models to study the development of allergic bronchial asthma. *Immunol Cell Biol* **1996**; 74: 209-17
- <sup>50</sup>**Kips JC, Anderson GP, Fredberg JJ, Herz U, Inman MD, Jordana M, Kemeny DM, Lotvall J, Pauwels RA, Plopper CG, Schmidt D, Sterk PJ, Van Oosterhout AJ, Vargaftig BB, Chung KF.** Murine models of asthma. *Eur Respir J* **2003**;22(2):374-82.
- <sup>51</sup>**Renz H.** Animal models for atopic dermatitis. *Immunolgy and Allergy Clinics of North America* **2002**; 22: 91-105
- <sup>52</sup>**Herz U, Braun A, Ruckert R, and Renz H.** Various immunological phenotypes are associated with increased airway responsiveness. *Clin Exp Allergy* **1998**; 28, no. 5:625

- <sup>53</sup>**Renz H, Smith HR, Henson JE, Ray BS, Irvin CG, and Gelfand EW.** Aerosolized antigen exposure without adjuvant causes increased IgE production and increased airway responsiveness in the mouse. *J-Allergy-Clin-Immunol* **1992**; 89, no. 6:1127
- <sup>54</sup>**Neuhaus-Steinmetz U, Glaab T, Daser A, Braun A, Lommatzsch M, Herz U, Kips J, Alarie Y, Renz H.** Sequential development of airway hyperresponsiveness and acute airway obstruction in a mouse model of allergic inflammation. *Int Arch Allergy* **2000**; 121, no. 1:57
- <sup>55</sup>**Schauer E, Trautinger F, Kock A, Schwarz A, Bhardwaj R, Simon M, Ansel JC, Schwarz T, and Luger TA.** Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes. *J Clin Invest* **1994**; 93, no. 5:2258
- <sup>56</sup>**Bhardwaj RS, and Luger TA.** Proopiomelanocortin production by epidermal cells: evidence for an immune neuroendocrine network in the epidermis. *Arch Dermatol Res* **1994**; 287, no. 1:85
- <sup>57</sup>**Scholzen TE, Kalden DH, Brzoska T, Fisbeck T, Fastrich M, Schiller M, Bohm M, Schwarz T, Armstrong CA, Ansel JC, and Luger TA.** Expression of proopiomelanocortin peptides in human dermal microvascular endothelial cells: evidence for a regulation by ultraviolet light and interleukin-1. *J Invest Dermatol* **2000**; 115, no. 6:1021
- <sup>58</sup>**Botchkarev VA, Botchkareva NV, Slominski A, Roloff B, Luger T, Paus R.** Developmentally regulated expression of alpha-MSH and MC-1 receptor in C57BL/6 mouse skin suggests functions beyond pigmentation. *Ann N Y Acad Sci* **1999**; 885:433
- <sup>59</sup>**Wintzen M, and Gilchrist BA.** Proopiomelanocortin, its derived peptides, and the skin. *J Invest Dermatol* **1996**; 106, no. 1:3
- <sup>60</sup>**Benjannet S, Rondeau N, Day R, Chretien M, Seidah NG.** PC1 and PC2 are protein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. *Proc Natl Acad Sci USA* **1991**; 88: 3564-3568

- <sup>61</sup>**Seidah NG, Day R, Benjannet S, Rondeau N, Boudreault A, Reudelhuber T, Schafer MK, Watson SJ, Chretien M.** The prohormone and proprotein processing enzymes PC1 and PC2: structure, selective cleavage of mouse POMC and human renin at pairs of basic residues, cellular expression, tissue distribution, and mRNA regulation. *NIDA Res Monogr* **1992**; 126: 132-150
- <sup>62</sup>**Luger TA, Scholzen T, Grabbe S.** The role of alpha-melanocyte-stimulating hormone in cutaneous biology. *J Invest Dermatol Symp Proc* **1997**; no. 1:87
- <sup>63</sup>**Luger TA, Scholzen T, Brzoska T, Becher E, Slominski A, and Paus R.** Cutaneous immunomodulation and coordination of skin stress responses by alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Ann N Y Acad Sci* **1998**; 840:381
- <sup>64</sup>**Schiller M, Brzoska T, Bohm M, Metze D, Scholzen TE, Rougier A, Luger TA.** Solar-simulated ultraviolet radiation-induced upregulation of the melanocortin-1 receptor, proopiomelanocortin, and alpha-melanocyte-stimulating hormone in human epidermis in vivo. *J Invest Dermatol.* **2004** Feb; 122(2): 468-76
- <sup>65</sup>**Hartmeyer M, Scholzen T, Becher E, Bhardwaj RS, Schwarz T, Luger TA.** Human dermal microvascular endothelial cells express the melanocortin receptor type 1 and produce increased levels of IL-8 upon stimulation with alpha-melanocyte-stimulating hormone. *J Immunol* **1997**; 159, no. 4:1930
- <sup>66</sup>**Bhardwaj R, Becher E, Mahnke K, Hartmeyer M, Schwarz T, Scholzen T, Luger T.** Evidence for the differential expression of the functional alpha-melanocyte-stimulating hormone receptor MC-1 on human monocytes. *J Immunol* **1997**; 158, no. 7:3378
- <sup>67</sup>**Chhajlani V, Muceniece R, Wikberg JE.** Molecular cloning of a novel human melanocortin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **1996**; 218, no. 2:638

- <sup>68</sup>**Curry JL, Pinto W, Nickoloff BJ, Slominski AT.** Human keratinocytes express functional alpha-MSH (MC1-R) receptors. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **2001**; 37, no. 4:234
- <sup>69</sup>**Böhm M, Schulte U, Hartmeyer M, Scholzen T, Becher E, Luger TA.** Human dermal fibroblasts express melanocortin-1 receptors and respond to alpha-melanocyte stimulating hormone with secretion of interleukin-6 and interleukin-8. *J Invest Dermatol* **1997**; 108: 593 (abstr.)
- <sup>70</sup>**Luger TA, Brzoska T, Scholzen TE, Kalden DH, Sunderkotter C, Armstrong C, Ansel J.** The role of alpha-MSH as a modulator of cutaneous inflammation. *Ann N Y Acad Sci* **2000**; 917:232
- <sup>71</sup>**Cone RD, Lu D, Koppula S, Vage DI, Klungland H, Boston B, Chen W, Orth DN, Pouton C, Kesterson RA.** The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Prog Horm Res* **1996**; 51: 287-317
- <sup>72</sup>**Eller MS, Ostrom K, Gilchrist BA.** DNA damage enhances melanogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **1996**; 93: 1087-1092
- <sup>73</sup>**Pawelek JM.** Studies on the Cloudman melanoma cell line as a model for the action of MSH. *Yale J Biol Med* **1985**; 58: 571-578
- <sup>74</sup>**Hunt G, Donation PD, Cresswell JE, Thody AJ.** The effect of alpha-MSH on the attachment of human melanocytes on laminin and fibronectin. Evidence for specific alpha-MSH receptors on these cells. *Ann NY Acad Sci* **1993**; 680: 549-551
- <sup>75</sup>**Boston BA, Cone RD.** Characterization of melanocortin receptor subtype expression in murine adipose tissues and in the 3T3-L1 cell line. *Endocrinology* **1996**; 137: 2043-2050
- <sup>76</sup>**Kiss M, Wlaschek M, Brenneisen P, Michel G, Hommel C, Lange TS, Peus D, Kemeny L, Dobozy A, Scharffetter Kochanek K, Ruzicka T.** Alpha-melanocyte stimulating hormone induces collagenase/matrix

metalloproteinase-1 in human dermal fibroblasts. *Biol Chem Hoppe Seyler* **1995**; 376: 425-430

- <sup>77</sup>**Lipton JM, Zhao H, Ichiyama T, Barsh GS, Catania A.** Mechanisms of antiinflammatory action of alpha-MSH peptides. In vivo and in vitro evidence. *Ann N Y Acad Sci* **1999**; 885:173
- <sup>78</sup>**Luger TA, Bhardwaj RS, Grabbe S, Schwarz T.** Regulation of the immune response by epidermal cytokines and neurohormones. *J Dermatol Sci* **1996**; 13, no. 1:5
- <sup>79</sup>**Cutuli M, Cristiani S, Lipton JM, Catania A.** Antimicrobial effects of alpha-MSH peptides. *J Leukoc Biol* **2000**; 67, no. 2:233
- <sup>80</sup>**Cannon JG, Tatro JB, Reichlin S, Dinarello CA.** Alpha-melanocyte stimulating hormone inhibits immunostimulatory and inflammatory actions of interleukin 1. *J Immunol* **1986**; 137: 2232-2236
- <sup>81</sup>**Lipton JM, Catania A.** Antiinflammatory actions of the neuroimmunomodulator  $\alpha$ -MSH. *Immunol Today* **1997**; 18: 140-145
- <sup>82</sup>**Bhardwaj RS, Schwarz A, Becher E, Mahnke K, Arange Y, Schwarz T, Luger TA.** Pro-opiomelanocortin-derived peptides induce IL-10 production in human monocytes. *J Immunol* **1996**; 156(7): 2517-21
- <sup>83</sup>**Aebischer I, Stampfli MR, Zurcher A, Miescher S, Urwyler A, Frey B, Luger T, White RR, Stadler BM.** Neuropeptides are potent modulators of human in vitro immunoglobulin E synthesis. *Eur J Immunol* **1994**; 24, no. 8:1908
- <sup>84</sup>**Slominski A, Wortsman J, Mazurkiewicz JE, Matsuoka L, Dietrich J, Lawrence K, Gorbani A, Paus R.** Detection of proopiomelanocortin-derived antigens in normal and pathologic human skin. *J Lab Clin Med* **1993**; 122, no. 6:658
- <sup>85</sup>**Rheins LA, Coteleur AL, Kleier RS, Hoppenjans WB, Saunder DN, Nordlund JJ.** Alpha-melanocyte stimulating hormone modulates contact

hypersensitivity responsiveness in C57/BL6 mice. *J Invest Dermatol* **1989**; 93, no. 4:511

<sup>86</sup>**Grabbe S, Bhardwaj RS, Mahnke K, Simon M, Schwarz T, Luger TA.** alpha-Melanocyte-stimulating hormone induces hapten-specific tolerance in mice. *J Immunol* **1996**; 156, no. 2:473

<sup>87</sup>**Wedi B, Raap U, Lewrick H, Kapp A.** Delayed eosinophil programmed cell death in vitro: a common feature of inhalant allergy and extrinsic and intrinsic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* **1997**; 100, no. 4:536

<sup>88</sup>**Wardlaw AJ.** Eosinophil trafficking in asthma. *Clin Med* **2001**; 1, no. 3:214

<sup>89</sup>**Kalden DH, Scholzen T, Brzoska T, Luger TA.** Mechanisms of the antiinflammatory effects of alpha-MSH. Role of transcription factor NF-kappa B and adhesion molecule expression. *Ann N Y Acad Sci* **1999**; 885:254

<sup>90</sup>**Scholzen TE, Sunderkotter C, Kalden DH, Brzoska T, Fastrich M, Fisbeck T, Armstrong CA, Ansel JC, Luger TA.** Alpha-melanocyte stimulating hormone prevents lipopolysaccharide-induced vasculitis by down-regulating endothelial cell adhesion molecule expression. *Endocrinology* **2003**; 144(1): 360-70

<sup>91</sup>**Croft D, McIntyre P, Wibulswas A, Kramer I.** Sustained elevated levels of VCAM-1 in cultured fibroblast-like synoviocytes can be achieved by TNF-alpha in combination with either IL-4 or IL-13 through increased mRNA stability. *Am J Pathol* **1999**;154, no. 4:1149

<sup>92</sup>**Catania A, Delgado R, Airaghi L, Cutuli M, Garofalo L, Carlin A, Demitri MT, Lipton JM.** Alpha-MSH in systemic inflammation. Central and peripheral actions. *Ann N Y Acad Sci* **1999**; 885: 183-7

<sup>93</sup>**Catania A, Rajora N, Capsoni F, Minonzio F, Star RA, Lipton JM.** The neuropeptide alpha-MSH has specific receptors on neutrophils and reduces chemotaxis in vitro. *Peptides* **1996**; 17(4): 675-9

- <sup>94</sup>**Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A.** Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* **2001**; 19:683
- <sup>95</sup>**Punnonen J, de Waal Malefyt R, van Vlasselaer P, Gauchat JF, de Vries JE.** IL-10 and viral IL-10 prevent IL-4-induced IgE synthesis by inhibiting the accessory cell function of monocytes. *J Immunol* **1993**; 151, no. 3:1280
- <sup>96</sup>**Blaser K, Akdis CA, Faith A. 1999.** Differential regulation of allergen-specific antibodies in allergy and specific immunotherapy. *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M* **1999**; no. 93:243
- <sup>97</sup>**Akdis CA, Blaser K.** Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. *Immunology* **2001**; 103, no. 2:131
- <sup>98</sup>**Pantoux C, Banz A, Papiernik M.** Natural CD4 CD25(+) regulatory T cells control the burst of superantigen induced cytokine production: the role of IL-10. *Int Immunol* **2002**; 14, no. 2:233
- <sup>99</sup>**Luger TA, Scholzen TE, Brzoska T, Bohm M.** New insights into the functions of alpha-MSH and related peptides in the immune system. *Ann N Y Acad Sci* **2003**; 994:133-40
- <sup>100</sup>**Hiltz ME, Catania A, Lipton JM.** Alpha-MSH peptides inhibit acute inflammation induced in mice by rIL-1 beta, rIL-6, rTNF-alpha and endogenous pyrogen but not that caused by LTB4, PAF and rIL-8. *Cytokine* **1992**; 4, no. 4:320

## **8 Anhang**

### **Curriculum Vitae**

#### Persönliche Daten

Familiennahme: Sohl  
Vorname: Sirius Benjamin  
Geburtsdatum: 06.05.1977  
Geburtsort: Heidelberg  
Eltern: Sibylle Beatrice Sohl, Ballerina u. Schauspielerin  
Uwe Weert Duken, Kunstmaler; verstorben  
Geschwister: Saskia Tara Sohl, geb. 13.06.1979  
Anschrift: Kurt-Eisner-Straße 69, 04275 Leipzig

#### Schulische Bildung

1983 – 1987 Besuch der Grundschule: Holzhausenschule Frankfurt  
1987 – 1996 Besuch des altsprachlichen und humanistischen Lessing-  
Gymnasiums Frankfurt  
1994 Erwerb des großen Latinums  
Juni 1996 Ablegen der Abiturprüfung mit der Note 1,4

#### Werdegang vor Aufnahme des Studiums

01.10.96 – 26.12.96 Pflegepraktikum auf einer internistischen Station  
des Bürgerhospitals Frankfurt  
Januar/Februar 97 Besuch der International Language Academy  
London zur Vertiefung der schulisch erworbenen  
Englischkenntnisse.  
01.03.97 – 31.12.97 Wehrdienst im Logistikregiment 5.

Ab dem 13.10.97 für die Aufnahme des  
Medizinstudiums vom Dienst freigestellt.

Berufliche Bildung

13.10.1997	Aufnahme des Medizinstudiums an der Philipps – Universität zu Marburg an der Lahn
03.09.1999	Bestehen der Physikumsprüfung mit der Note 2,6
28./29.08.2000	Schriftlich Prüfung des ersten Staatsexamens. Bestehen mit der Note 2,0
09.04.2003	Bestehen des zweiten Staatsexamens mit der Note 1,6
14.06.2004	Bestehen des dritten Staatsexamens mit der Note 1,0
17.06.2004	Bestehen der Ärztlichen Prüfung mit der Gesamtnote 1,49
01.10.2004	Erteilung der Approbation als Arzt
05.02.2001	Beginn der vorgelegten Promotionsarbeit.
11.07.2001	Erhalt von Fördermitteln der P. E. Kempkes Stiftung für die Forschungsarbeit im Rahmen der Promotion.
April 2003	Publikation der Forschungsergebnisse im: <i>The Journal of Immunologie</i>
19.07.2004	Aufnahme der Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Universitäts-Hautklinik Leipzig. Klinikdirektor: Prof. Dr. med. J. Simon.
01.10.2004	Übernahme als Assistenzarzt in die Universitäts-Hautklinik Leipzig. Klinikdirektor: Prof. Dr. med. J. Simon.

Weitere Fähigkeiten und Kenntnisse

Sommer 1993	Erwerb der CMAS Tauchlizenz
Wintersemester 99/00	Teilnahme an dem Fortbildungsseminar der Transfusionsmedizin und Serologie der Universitätsblutbank Marburg
Ab März 1999	Nebenberufliche Tätigkeit im Pflegedienst auf der Intensivstation des Bethanien - Krankenhauses Frankfurt
2001/2002	Betreuung des Praktikums Klinische Chemie für Humanmediziner an der Universität Marburg als studentische Hilfskraft.

Fremdsprachen

Latein

Englisch

Alt-Griechisch, Basiskenntnisse

Französisch

Spanisch; Grundkenntnisse

Sirius Benjamin Sohl

## Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Arnold, R.	Krieg, J. C.
Barth, P. J.	Kroll, P.
Basler, H. D.	Lammel, E.
Baum, E.	Lang, R. E.
Beyer, J.	Lennarzt, H.
Christiansen, H.	Löffler, M.
Daut, J.	Maisch, B.
Eilers, M.	Moll, R.
Feuser, B.	Mueller, G.
Garrel, T. von	Mutters, R.
Gerdes, B.	Oertel, W. H.
Geus, A.	Renschmidt, H.
Gotzen, L.	Renz, H.
Griss, P.	Rothmund, M.
Gudermann, T.	Schäfer, H.
Happle, R.	Schmidt, S.
Hellinger, A.	Schneyer, T.
Hofmann, R.	Seitz, J.
Jungclas, H.	Sundermeyer, J.
Kern, H. F.	Vohland, H. W.
Klenk, H. D.	Weihe, E.
König, A.	Werner, J. A.
Kretschmer, V.	

## Danksagung

Hiermit möchte ich meinen ausdrücklichen Dank all denen aussprechen, die dieses Projekt unterstützt und gefördert haben.

Herrn Prof. Dr. med. H. Renz möchte ich dafür danken, dass ich in seiner Forschungsabteilung als Doktorand dieses interessante und aktuelle Thema bearbeiten durfte. Darüber hinaus danke ich ihm für die großzügige und freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Promotionsarbeit.

Natürlich gilt mein außerordentlicher Dank auch Frau Dr. med. U. Raap, die mich direkt betreute und anleitete. Danke Ulrike, dass Du für mich immer ansprechbar warst und mir jederzeit zuverlässig zur Seite standst.

Unserem Laborleiter Herrn PD Dr. rer. nat. U. Herz gilt ebenfalls mein besonderer Dank. Er stand immer mit gutem Rat und engagierter Tat bereit, wenn Hilfe gebraucht wurde.

Aber auch Herrn Dr. med. Thomas Brzoska und Herrn Dr. med. Armin Braun danke für ihre fruchtbaren Ideen, ihr technisches *Know-how* und ihre tatkräftige Unterstützung.

Nicht zu vergessen sind auch die medizinisch technischen Assistentinnen und Assistenten sowie die Tierpfleger der Abteilung. Ohne sie wäre ein reibungsloses Arbeiten im Labor kaum möglich gewesen. Vornehmlich möchte ich an dieser Stelle Frau Britta Kosche nennen, die einem geduldig in die Feinheiten so mancher analytischen Methode einwies.

Meinen Condoktoranden möchte ich für die gute Atmosphäre im Team danken. Im Speziellen ist hier Herr Jörg Emmel zu nennen, auf dessen Hilfe und Freundschaft man immer zählen konnte.

Nicht zuletzt möchte ich all denjenigen meinen Dank aussprechen, die dieses Projekt finanziell förderten. Der P. E. Kempkes Stiftung gilt hierbei mein ausdrücklicher Dank für die Bereitstellung von Fördermitteln für die Forschungsarbeit im Rahmen der Promotion.

## Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin in Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel: „Untersuchungen über die antiinflammatorischen Eigenschaften des alpha-Melanozyten-stimulierenden-Hormones im Bezug auf die allergische Atemwegsentzündung“, in der Abteilung Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Harald Renz, mit Unterstützung von Frau Dr. med. Ulrike Raap, ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

### Originalbeitrag:

Raap U, Brzoska T, **Sohl S**, Päth G, Emmel J, Herz U, Braun A, Luger T, Renz H. Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits allergic airway inflammation. *J Immunol* **2003**; 171(1): 353-9

### Abstracts:

Raap U, Brzoska T, **Sohl S**, Emmel J, Päth G, Herz U, Braun A, Luger T, Renz H. Alpha-melanozyten stimulierendes Hormon ( $\alpha$ -MSH) verhindert die allergische Atemwegsentzündung über eine gesteigerte IL-10 Produktion. 14. Mainzer Allergie-Workshop, Bochum, **13-16. März 2002**

Raap U, Brzoska T, **Sohl S**, Emmel J, Päth G, Herz U, Braun A, Luger T, Renz H.  $\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) inhibits allergic airway inflammation. Society of Investigative Dermatology, Los Angeles, **15.-19. Mai 2002**

Marburg, den

Sirius Benjamin Sohl