

Aus der Abteilung Pneumologie der Klinik für Inneren Medizin der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

# **Zellbiologische Plastizität humaner eosinophiler Granulozyten.**

**Die Bedeutung von Interleukin-3, Interleukin-5 und Interferon- $\gamma$ ,  
sowie der Einfluß anti-asthmatischer Medikamente auf Phänotyp,  
Transmigration, Viabilität und Apoptose.**

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)**

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Michael Kühl  
geboren am 14.11.1976 in München

Jena 2002

# **I. Inhaltsverzeichnis**

	<b>Seite</b>
<b>I. Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>II. Tabellenverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>III. Figurenverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>IV. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>V. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Asthma bronchiale	1
1.2 Der eosinophile Granulozyt	5
1.2.1 Ursprung und Differenzierung	5
1.2.2 Morphologie	5
1.2.3 Membranrezeptoren und Oberflächenmarker	5
1.2.4 Zelluläre Bestandteile und Produkte	6
1.3 Zellbiologische Eigenschaften	7
1.3.1 Transmigration	7
1.3.2 Apoptose	9
<b>2 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>11</b>
<b>3 Material &amp; Methoden</b>	<b>12</b>
3.1 Isolierung der eosinophilen Granulozyten	12
3.2 Durchflußzytometrische Methoden	13
3.2.1 Inkubation der Zellen	13
3.2.2 Messung der Oberflächenmarker	13
3.2.3 Bestimmung der Viabilität mit Propidiumjodid	14
3.2.4 Bestimmung der Apoptose mit Annexin V	14
3.2.5 Modulation des Ca <sup>2+</sup> -Einstroms in die Zelle	15
3.3 Transmigration	15
3.4 ELISA	16
3.5 Total RNA-Extraktion	16
3.6 Reverse Transkription	17

3.7	Polymerase-Ketten-Reaktion	17
3.8	Gelelektrophorese	18
3.9	Statistische Methoden	18
<b>4</b>	<b>Resultate</b>	<b>19</b>
4.1.1	Modulation des Phänotyps eosinophiler Granulozyten	19
4.1.2	CD11b	19
4.1.3	CD13	20
4.1.4	CD26	21
4.1.5	CD32	22
4.1.6	CD49d	26
4.1.7	CD54	28
4.1.8	CD62L	30
4.1.9	CD69	32
4.1.10	CD95	34
4.2	Modulation der Viabilität des eosinophilen Granulozyten	35
4.2.1	Modulation der Apoptose durch Montelukast	41
4.3	Modulation der Transmigration eosinophiler Granulozyten	43
4.4	Sekretion von Metalloproteinase-9	44
4.5	Expression von Metalloproteinase-9	45
4.6	Modulation des Ca <sup>2+</sup> -Einstroms in die Zelle	46
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>47</b>
5.1	Effekt von Zytokinen	47
5.2	Effekt von Lipidmediatoren (LTC <sub>4</sub> )	47
5.3	Effekt von Proteinen (C5a)	47
5.4	Effekt von Leukotrien-Rezeptorantagonisten (ML und ZL)	48
5.5	Effekt von Antihistaminika (FF)	48
5.6	Effekt von Chloridionenhemmer (NC)	49
5.7	Variabilität des Phänotyps	50
5.8	Variabilität der Viabilität	51

5.9	Variabilität der Transmigration	55
5.10	Variabilität der Funktionalität	59
5.11	Konzept der zellbiologischen Plastizität	60
5.12	Bedeutung der Ergebnisse für das zellbiologische Verständnis	63
5.13	Limitationen der Arbeit	64
5.14	Zukünftige Arbeiten	65
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>67</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>68</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>75</b>
9.1	Danksagung	75
9.2	Lebenslauf	76
9.3	Ehrenwörtliche Erklärung	77

## **II. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1	14
-----------	----

## **III. Figurenverzeichnis**

Figur 1	56
Figur 2	57
Figur 3	62

## **IV. Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1	3
Abbildung 2 a,b	19
Abbildung 3 a,b	20
Abbildung 4	20
Abbildung 5	21
Abbildung 6	21
Abbildung 7	22
Abbildung 8	22
Abbildung 9	23
Abbildung 10 a,b	24
Abbildung 11 a-c	24/25
Abbildung 12	25
Abbildung 13	26
Abbildung 14a,b	26
Abbildung 15 a-c	27/28
Abbildung 16	28
Abbildung 17	29
Abbildung 18 a,b	29
Abbildung 19	30
Abbildung 20 a,b	31
Abbildung 21 a,b	31
Abbildung 22 a,b	32
Abbildung 23 a,b	32
Abbildung 24 a-c	33

Abbildung 25	34
Abbildung 26	34
Abbildung 27	35
Abbildung 28 a,b	35
Abbildung 29	36
Abbildung 30	37
Abbildung 31	37
Abbildung 32	38
Abbildung 33	38
Abbildung 34	39
Abbildung 35	39
Abbildung 36	40
Abbildung 37	40
Abbildung 38	41
Abbildung 39	42
Abbildung 40	43
Abbildung 41 a-c	44
Abbildung 42 a,b	45
Abbildung 43	46

## V. Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen präsentierende Zelle
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BCL	B-cell lymphocyte
C5a	Komplementfaktor 5a
CD	Cluster of Differentiation
DEPC	Diethyppyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNP	Desoxynukleotidphosphate
ECP	Eosinophiles kationisches Protein
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EPO	Eosinophile Peroxydase
EPX	Eosinophiles Protein X
ET	Eotaxin
FACS	Fluorescence activated Cell Sorter
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	Fluoreszin Diazetat
FEV1	Forciertes Expiratorisches Volumen
FF	Fexofenadin
FITC	Fluorszin-iso-thiocyanat
FMLP	f-Methionin-Leucin-Phenylalanin
GAPDH	Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
H <sub>1</sub>	Histamin (Typ 1 Rezeptor)
HLA	Human leucocyte antigen
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen-1
LT	Leukotrien

LTRA	Leukotrien-Rezeptorantagonisten
MACS	Magnetic-Assisted-Cell-Sorting
MBP	Major Basic Protein
MgCl	Magnesium Chlorid
ML	Montelukast
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MPO	Myeloperoxidase
n	Anzahl der Beobachtungen
NC	Nedocromil
PAF	Platelet activating factor
PBS	Phosphatebuffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PG	Prostaglandin
PI	Propidiumjodid
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (Phorbolster)
RANTES	Zytokin (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted)
RNA	Ribonukleinsäure
SEM	Standardfehler der Mittel
SMF	Standard mean fluorescence
TGF	Transforming growth factor
Th2	T-Helferzelle (Typ 2)
TNF	Tumornekrosefaktor
TXA2	Thromboxan A2
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
VLA	Very late antigen
ZL	Zafirlukast

# 1. Einleitung

## 1.1 Asthma bronchiale

Die Krankheit Asthma bronchiale wird definiert als eine variable und reversible Atemwegsobstruktion infolge Entzündung und Hyperreaktivität der Atemwege.

Die Angaben in der Literatur bezüglich der Häufigkeit des Asthma bronchiale schwanken zwischen 200 und 10 000 Fällen je 100 000 Einwohnern. Für die Bundesrepublik Deutschland wird eine Prävalenz von 6000 Fällen je 100 000 Einwohnern angegeben. Über die Inzidenz des Asthma bronchiale gibt es keine genaueren Zahlenangaben, sie wird auf 1000 bis 2000 Fälle je 100 000 Einwohnern geschätzt. Insgesamt nimmt die Inzidenz des Asthma bronchiale zu (Wagner, Häufigkeitsangaben zum Asthma bronchiale).

Es werden zwei in der Ätiologie unterschiedliche Formen beschrieben:

### A) Allergisches Asthma (Extrinsisches Asthma, exogenes Asthma):

Das extrinsische oder allergische Asthma ist eine mit Umweltallergenen assoziierte Atemwegserkrankung, die saisonal rezidivierend mit Erhöhung der Eosinophilenzahl im Blut sowie des gesamt- und allergenspezifischen IgE einhergeht. Die Erkrankung manifestiert sich oft bereits in der Kindheit oder frühen Jugend und eine allergische Diathese in der Familie ist meist bekannt. Immunologisch finden sich beim extrinsischen Asthma bronchiale passagere, mit der Allergenexposition zeitlich im Zusammenhang stehende aktivierte CD4<sup>+</sup>-Zellen sowie Th<sub>2</sub>-Zell assoziierte Zytokine in den Atemwegen.

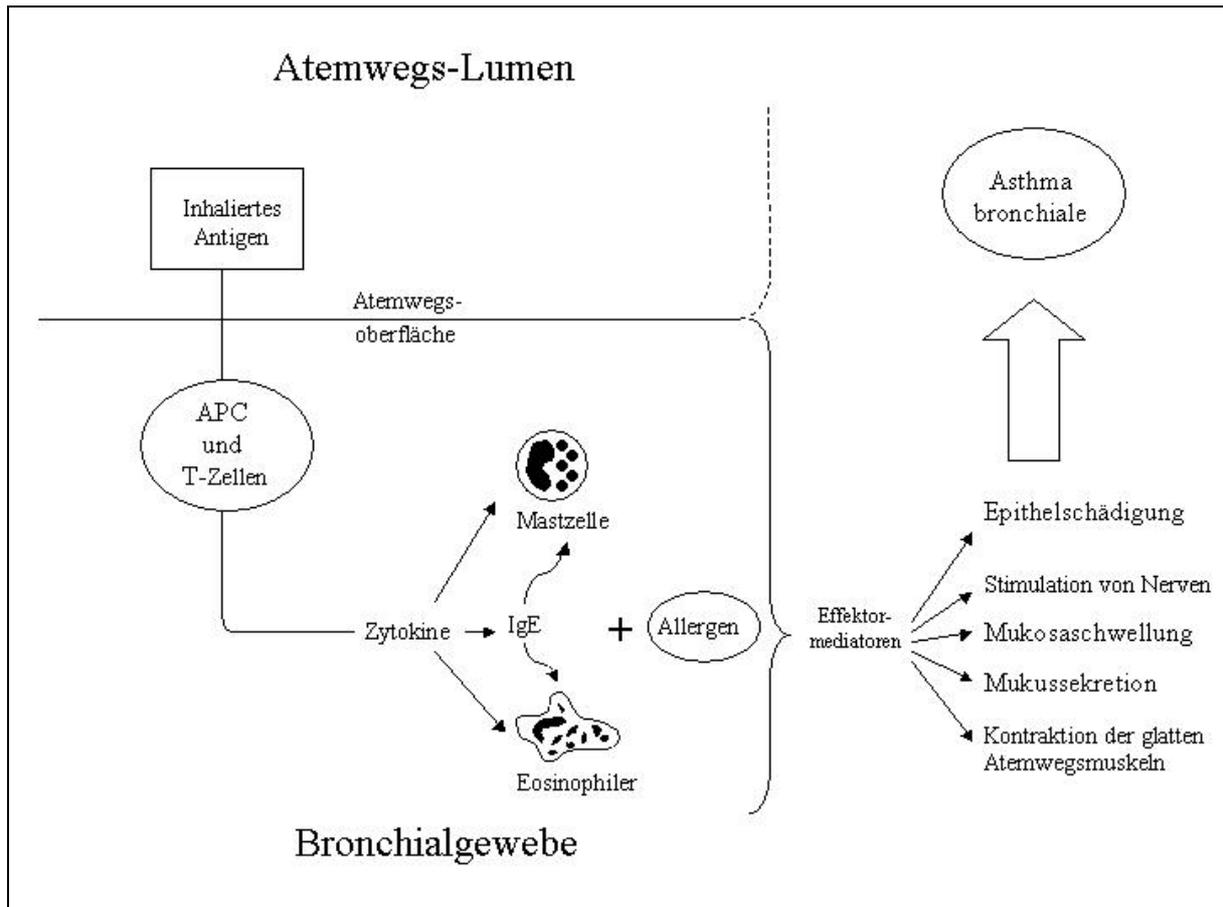
### B) Nichtallergisches Asthma (Intrinsisches Asthma, endogenes Asthma):

Im Gegensatz zum allergischen Asthma bevorzugt das intrinsische Asthma bronchiale ein höheres Alter (>40 Jahre) und entwickelt sich in den meisten Fällen nach einem respiratorischen Infekt. Eine allergische Diathese oder Vermehrung des Gesamt- bzw. spezifischen IgE läßt sich nicht nachweisen. Im Vergleich zum allergischen Asthma ist die Eosinophilie im allgemeinen stärker ausgeprägt und unterliegt ebenso wie die klinische Symptomatik keinen größeren jahreszeitlichen Schwankungen. Während die immunologische Endstrecke in der Pathogenese beim intrinsischen und extrinsischen Asthma im Sinne einer von Eosinophilen dominierten Entzündung miteinander vergleichbar ist, scheinen sich jedoch

die zentralen regulatorischen Immunprozesse beider Formen zu unterscheiden. Parallel zur fortbestehenden Bluteosinophilie findet sich beim intrinsischen Asthma eine auch im symptomarmen Intervall anhaltende Aktivierung der CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten im Blut und der BAL, die sich durch die Expression der IL-2, HLA-DR und VLA-1 Oberflächenantigene äußert. Die intrinsische Form des Asthma bronchiale zeichnet sich ferner durch eine Umverteilung peripherer Lymphozyten in sog. „memory“-T-Zellen (CD45RO) aus, die beim extrinsischen Asthma nicht nachweisbar ist. Diese Beobachtung deutet auf einen pathogenetischen Unterschied zwischen extrinsischem und intrinsischem Asthma hin.

Andere Bezeichnungen, einschließlich des Anstrengungs- und Analgetika-assoziierten Asthmas oder nächtlichen (nocturnalen) Asthmas, beziehen sich auf den Auslöser bzw. den Zeitraum gehäufte klinischer Beschwerden. Es handelt sich hierbei nicht um unabhängige Formen eines Asthmas bronchiale, sondern vielmehr bezeichnen sie häufige Trigger oder die tageszeitliche Zuordnung asthmatischer Beschwerden, die sich auf dem Boden entweder eines vorbestehenden intrinsischen oder extrinsischen Asthmas in unterschiedlicher Häufigkeit manifestieren.

Das pathophysiologische Hauptmerkmal des Asthmas ist die bronchiale Hyperreaktivität. Hierunter versteht man eine im Vergleich zum Gesunden überschießende Bronchokonstriktion auf unspezifische Irritationen unserer Umwelt. Immunologisch wird eine erhöhte IgE Antikörperproduktion auf definierte Umwelt-Allergene ausgelöst, die sich sowohl in einer Erhöhung des Gesamt-IgE im Serum äußert, aber auch in einem Anstieg von spezifischen IgE Antikörpern. Histologisch sieht man Zeichen einer chronischen Atemwegsentzündung, die vor allem mit einer Infiltration von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen, sowie einer Aktivierung von T-Zellen verbunden sind. Die Menge der T-Zellen korreliert mit der Zahl der Eosinophilen. Man weiß, dass T-Zellen die Eosinophilen-Infiltration und Aktivierung unterstützen (Kay, 1991, Holgate, 1993). T-Zellen, von denen gezeigt werden konnte, dass sie sich zusammen mit den Mastzellen bereits vor Allergenexposition im Lungengewebe befinden, sind größtenteils vom Th<sub>2</sub>-Phänotyp und spielen als Regulatoren der Immunantwort eine große Rolle (Kay, 1991, Holgate, 1993). So modulieren sie beispielsweise über die Freisetzung definierter Zytokine Zahl, Funktion und Reaktivität die Effektorzellen des Asthma bronchiale, Mastzelle und eosinophilen Granulozyten.



**Abbildung 1:** Zusammenhang zwischen der Atemwegs-entzündung und dem Entstehen von Symptomen des Asthmas, wie bronchialer Hyperreaktivität und Atemflussverminderung.

Das klinische Leitsymptom des Asthma bronchiale ist die Anfallsweise auftretende Dyspnoe mit expiratorischem Stridor. Keuchen, Husten, thorakales Engegefühl, auskultatorisches Giemen und Brummen, verminderter FEV<sub>1</sub>-Wert und Reversibilität der Bronchialobstruktion zählen ebenfalls zu den Krankheitszeichen.

Die Atemwegsreaktion beim Asthma bronchiale lässt sich in drei Phasen einteilen (Sohei 1995):

1. Sofortantwort (Immediate Asthmatic Response; IAR)
2. Spätantwort (Late Asthmatic Response; LAR)
3. Verzögerte Spätantwort (Post-Late Asthmatic Response; p-LAR)

Bei der IAR setzen hauptsächlich Mastzellen bronchokonstriktive und vasoaktive Mediatoren, wie Leukotriene (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>), Prostaglandin (PGD<sub>4</sub>), Thromboxan (TXA<sub>2</sub>), Platelet activating factor (PAF) und Histamin frei. Daneben können eosinophile Granulozyten über

niedrig-affine IgE-Rezeptoren, IgG-Rezeptoren und/oder IgA Rezeptoren durch Antigene stimuliert, ebenfalls Mediatoren (LTC<sub>4</sub>, MPO, EPO und PAF) freisetzen (Capron 1992).

2 bis 3 Stunden nach Allergenprovokation sind Eosinophile im Bronchialgewebe und -lumen vorhanden, wobei das Maximum der Eosinophilie bei 6 Stunden liegt und die Zellen noch mehrere Tage nachweisbar sind. Die LAR scheint zumindest teilweise durch die eosinophilen Granulozyten ausgelöst zu werden.

Als p-LAR wird die allergen-induzierte Erhöhung der Atemwegsreaktivität bezeichnet. Sie tritt häufiger bei LAR-positiven Patienten auf, als bei IAR Patienten. So scheint sie abhängig von der Akkumulation der eosinophilen Granulozyten in der Bronchialwand zu sein. Hyperreaktivität gegenüber inhaliertem Histamin beobachtete man bei Patienten mit LAR 2 bis 74 Tage nach Allergengabe (Cartier et al., 1982). Eine solche langandauernde Infiltration der Eosinophilen ist die Ursache für dauernden Schaden des Bronchialepithels (vermehrte Mukusekretion, Kontraktion der glatten Muskeln, Schleimhautschwellung, nervale Reizung, subendotheliale Fibrose) und führt so zur Hyperreaktivität des Atemsystems.

Nach den Empfehlungen der Deutschen Atemwegsliga richtet sich die Behandlung des Asthma bronchiale nach vier Schweregraden. Hier werden dem Patienten je nach Schweregrad sogenannte Controller, die eine lange Wirkzeit haben, wie beispielsweise topische Steroide, langwirksame  $\beta_2$ -Sympatomimetika, Mastzellstabilisatoren, Leukotrien-Rezeptorantagonisten, H<sub>1</sub>-Antagonisten, Theophyllinpräparate und orale Glukokortikoide verschrieben. Als Bedarfsmedikation kommen  $\beta_2$  Agonisten zum Einsatz. In klinischen Studien werden neuere Präparate, wie Anti-IgE Antikörper, Anti-IL-5 Antikörper, Anti-IL-4 Antikörper, Lipoxigenase-Inhibitoren und neuere Generationen von Leukotrien-Rezeptorantagonisten getestet. Auch wenn einzelne Aspekte der Wirkungsweise dieser Medikamente bekannt sind, ist diese für andere noch nicht beschrieben.

Im Verlauf können sich die klinischen Beschwerden bei Kindern in mehr als 50% der Fälle und bei Erwachsenen in ca. 20% der Fälle zurückbilden.

## **1.2 Der eosinophile Granulozyt**

Da dem eosinophilen Granulozyten eine Schlüsselrolle als Effektorzelle im allergischen Geschehen und der Entzündungsreaktion bei Asthma bronchiale zukommt, soll im Folgenden näher auf ihn eingegangen werden.

### **1.2.1 Ursprung und Differenzierung**

Der eosinophile Granulozyt entstammt dem Knochenmark und differenziert sich dort unter dem Einfluß von verschiedenen Zytokinen (IL-3, IL-5, GM-CSF) von der Stammzelle zum reifen Eosinophilen (Clutterbuck et al., 1989). Im Blut zirkuliert er für ca. 25 Stunden, bevor er sich in Geweben, wie dem Gastrointestinaltrakt, Urethraltrakt und den Atemwegen niederläßt (Spry 1988). Dort kann er mindestens 6 Tage verweilen, wobei sein Überleben von Zytokinen wie IL-3, IL-5 und GM-CSF verlängert werden kann (Owen et al., 1987, Rothenberg et al., 1988). Ob und wie das Überleben durch die Therapie mit anti-asthmatischer Medikation beeinflusst wird, ist noch ungeklärt.

### **1.2.2 Morphologie**

Der eosinophile Granulozyt ist ein granulierter Leukozyt mit einem Durchmesser von ca. 8 µm und einem zwei-gelappten Kern, sowie großen eosinophilen Granula, die sich gelb-rötlich mit Eosin anfärben lassen. Neben den großen Granula, den primären Granula, die Lysofosphatase enthalten, existieren noch sekundäre, kleine Granula. Die sekundären oder spezifischen Granula enthalten basische Proteine (MBP: Major Basic Protein, ECP: Eosinophil Cationic Protein, EPX: Eosinophil Protein X), Hydrolasen (Kollagenasen, β-Glukuronidasen) und eosinophile Peroxidasen. Lipidkörper, die nach Aktivierung des Eosinophilen vermehrt beobachtet werden können, dienen als Speicher für Arachidonsäureprodukte (LTC<sub>4</sub>, etc.) (Weller and Dvorak 1985).

### **1.2.3 Membranrezeptoren und Oberflächenmarker**

Die Oberflächenrezeptoren der humanen eosinophilen Granulozyten lassen sich in fünf größere Gruppen einteilen: Rezeptoren für Immunglobuline, Lipidmediatoren, Komplementmediatoren, Zytokine und Adhäsionsmoleküle. Eosinophile tragen viele Antigene, die auch auf anderen weißen Blutzellen zu finden sind, wie zum Beispiel das human leucocyte antigen (HLA) und das common leucocyte antigen (CD45) (Hartnell et al., 1990, Kroegel et al., 1991). Die Zelle exprimiert zwar kein zellspezifisches Antigen, doch

fehlen ihr Oberflächenstrukturen, die auf anderen Leukozyten vorhanden sind, wie zum Beispiel den Immunglobulin G Rezeptor  $Fc\gamma$ -RIII (CD16), den man auf Neutrophilen und Makrophagen findet. Dies dient als Grundlage bei der indirekten immunmagnetischen Isolation der Eosinophilen (Hansel et al., 1989). Eosinophile tragen den Immunglobulin G Rezeptor  $Fc\gamma$ RII (CD32) und Rezeptoren für Immunglobulin E und A. Nach Koppelung eines Antikörpers an den Immunglobulinrezeptor, folgt eine Sekretion von ECP und EPO (Capron et al., 1989a, 1989b, Abu et al., 1989).

Darüber hinaus befinden sich eine große Zahl an Adhäsionsmolekülen auf dem Eosinophilen. Dazu gehören die  $\beta_1$ -Integrine (CD29), das mit dem CD49d, einem  $\alpha_4$ -Integrin, den VLA (very late activation antigen) Komplex bildet. Weiterhin die  $\beta_2$ -Integrine (CD11a; CD11b; CD11c), die Immunglobulin Superfamilie (ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1, CD54), sowie die Selektine (L-Selektin: CD62L) (Lucey et al., 1989, Hartnell et al., 1990, Rand et al., 1991, Plumas et al., 1991, Georas et al., 1992, Nishikawa et al., 1992, Kroegel et al., 1993, Virchow et al., 1993). Bei der Transmigration werden neben diesen Adhäsionsmolekülen Oberflächenstrukturen, wie CD13 (Aminopeptidase N), und CD26, ein Kollagenrezeptor, benötigt. Das Antigen CD69, das nur von aktivierten Eosinophilen exprimiert wird, und CD95 vermitteln nach Ligation funktionell eine Apoptose eosinophiler Granulozyten. Rezeptoren für Komplementfaktoren (C1q, C3a, C3b/C4b, C5a, etc.) wurden auch auf Eosinophilen beschrieben (Anwar and Kay, 1977, Tai and Spry, 1980, Changelian and Fearon, 1986, Hamada and Greene, 1987, Hartnell et al., 1990). C5a zeigt hierbei sowohl eine stark chemotaktische Wirkung als auch einen aktivierenden und degranulierenden Effekt auf die Zelle. Eosinophile exprimieren außerdem eine Reihe von Rezeptoren für Lipidmediatoren, zum Beispiel für Prostaglandin E (PGE), Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) und PAF. Schließlich existieren mehrere Zytokinrezeptoren für IL-3, IL-5, GM-CSF und TNF (CD27) (Lopez et al., 1989, Lopez et al., 1990, Migita et al., 1991, Ingley et al., 1991, Lopez et al., 1991).

#### 1.2.4 Zelluläre Bestandteile und Produkte

Neben den fünf verschiedenen basischen Proteinen ECP, MBP, MPO, EPO und EPX vermag der eosinophilen Granulozyt auch Sauerstoffradikale (O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) auszuschütten. Diese Stoffe sind zytotoxisch und dienen ursprünglich der Parasitenabwehr. Sie wirken aber auch auf Tumorzellen und gesunde Gewebszellen, wie humanes Lungenparenchym, interstitielle Matrix (Davis et al., 1984, Gonzalez et al., 1987), kultivierten Lungenepithelzellen (HUVEC) und Atemwegsepithel von Meerschweinchen (Gleich et al., 1979, Frigas et al., 1981, Ayars et

al., 1985, Motojima et al., 1989). Weiterhin wurde gezeigt, dass MPO das menschliche Bronchialepithel schädigt, indem es die zilienträgenden Zellen der Atemwege ablöst und zerstört (Frigas et al., 1981). Neben Lipidmediatoren (LTC<sub>4</sub>, PGF<sub>1</sub>, PAF) vermögen Eosinophile schließlich eine Reihe von Zytokinen (GM-CSF, IL-3, TGF-β<sub>1</sub>, TGF-α) selbst zu produzieren und auszuschütten, die so zur Unterhaltung des inflammatorischen Geschehens beim Asthma bronchiale beitragen.

### **1.3 Zellbiologische Eigenschaften**

#### **1.3.1 Transmigration**

Die Adhäsion zirkulierender Granulozyten an das Gefäßendothel ist von grundlegender Bedeutung für die Entstehung und den Verlauf von Entzündungen. Blutzellen können nur dann im Gewebe akkumulieren, wenn sie zuvor an der Endothellinie “andocken”, in die Gefäßwand eindringen und zum Ort der Gewebsentzündung transmigrieren. Dieser komplexe Mechanismus bedarf eines Zusammenspiels vieler zellulärer und humoraler Mechanismen, die die Permeabilität des Gefäßendothels, den Blutfluss, die Mobilisierung, die Aktivierung und Akkumulation der Leukozyten beeinflussen.

In den letzten Jahren wurden in verschiedenen Studien der Mechanismus, der der Rekrutierung der Eosinophilen aus dem Blutstrom in das Gewebe zugrunde liegt, untersucht (Kroegel et al., 1994). Dieser Prozess kann in sieben Phasen, die nacheinander und teilweise überlappend ablaufen, eingeteilt werden:

1. Die Transmigration wird durch einen zufälligen Kontakt des eosinophilen Granulozyten mit der Wand des Gefäßendothels eingeleitet. Dieser Vorgang findet wahrscheinlich im Kapillarbereich statt, da hier das Lumen der Gefäße besonders klein ist.
2. L-Selektin Rezeptoren (CD62L) auf nicht-aktivierten eosinophilen Granulozyten interagieren mit durch die Entzündung aktivierten Endothelzellen, die die entsprechend passenden Gegenstrukturen auf ihrer Oberfläche tragen (E-Selektin). L-Selektin fungiert so als Anker zwischen den Eosinophilen und den Endothelzellen. Die Scherkräfte des Blutstroms treiben die Zellen allerdings weiter, weshalb die eosinophilen Granulozyten auf den Endothelzellen entlangzurollen scheinen (“rolling”) (Lawrence and Springer, 1991, Lasky et al., 1992). Es wird angenommen, dass der Blutfluss an dieser Stelle durch lokal ausgeschüttete Mediatoren, die die Gefäße erweitern, verlangsamt wird. Dadurch wird dem Eosinophilen die Zeit gegeben, sich zu aktivieren.

3. Zytokine, die von der Entzündungsstelle durch das Gewebe diffundieren, von perivasalen Makrophagen und Lymphozyten stammen, oder von Endothelzellen selbst ausgeschüttet werden, aktivieren den Eosinophilen und führen zu einer festeren Adhäsion am Endothel und zur Expression von weiteren Adhäsionsmolekülen. Verantwortlich dafür ist das  $\beta_1$ -Integrin VLA-4 (CDw49d/CD29), das VCAM-1 auf Endothelzellen bindet. Weiter die  $\beta_2$ -Rezeptoren LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18), und p150.95 (CD11c/CD18), die an ICAM-1 (CD54) binden. Diese Bindung ans Endothel ("sticking") wird einerseits durch nicht-spezifische Expression von Adhäsionsmolekülen und andererseits durch Sekretion spezifischer Chemokine bewirkt.
4. Chemotaktisch wirkende Substanzen (IL-2, IL-5, RANTES, PAF), die aus dem Entzündungsgebiet diffundieren, induzieren nun die "Diapedese" des Eosinophilen durch das Endothel. Der Leukozyt verlässt das Gefäßlumen, indem er zwischen den Endothelzellen hindurch in die extrazelluläre Matrix emigriert. Damit die Eosinophilen nicht am Endothel verharren, müssen einige Adhäsionsmoleküle auch wieder von der Zelloberfläche verschwinden. So ließ sich zeigen, dass Eosinophile bei der Migration das L-Selektin (CD62L) wieder verlieren, das sie für den ersten Kontakt mit dem Endothel noch gebraucht haben (Gimbrone et al., 1989, Kroegel et al., 1993, Georas et al., 1992, Kroegel et al., 1993).
5. Die transmigrierte Zelle wandert nun entlang des chemotaktischen Gradienten zum Ort des inflammatorischen Geschehens. Die Zelle wird nicht nur durch die Konzentrationsänderung von aktivierenden Lipidmediatoren gelenkt, sondern auch durch Adhäsion von zellulären Integrinen an extrazellulären Matrixproteinen, wie CD13 (Aminopeptidase N) oder MMP-9 (Matrixmetalloproteinase-9). Diese Proteasen sind in ihrer Aktivität an bestimmte Metallionen gebunden ist und fungieren als "Scheren" der Zelle, um dem eosinophilen Granulozyten einen Weg durch die extrazelluläre Matrix zum Entzündungsgeschehen zu schaffen (Resnick and Weller, 1993). Über die Regulation der Metalloproteasen ist jedoch bis heute nur sehr wenig bekannt.
6. Am Entzündungsort angekommen, wird der eosinophile Granulozyt einer Vielzahl an aktivierenden Chemokinen, wie Lipidmediatoren, Zytokinen und Neuropeptiden (VIP, Substanz P) ausgesetzt. In niedrigen Dosen vermögen diese Stoffe die Eosinophilen zu aktivieren (siehe 5.11), während hohe Konzentrationen die Leukozyten primen (Silberstein et al., 1989, Kroegel et al., 1989, Nathan and Sporn, 1991) und sie so ihre zytotoxischen Produkte, wie etwa die basischen Proteine (EPO, MPO, EPX) und Sauerstoffradikale freisetzen. Gleichzeitig können die Granulozyten nach ihrer Ankunft in

der Mukosa durch Stoffe wie PAF deaktiviert werden und hyporeaktiv und immobil in den Atemwegen verweilen (Kroegel et al., 1989, Wenzel et al., 1989, Liu et al., 1991, Kroegel et al., 1994a, 1994b).

7. In der letzten Phase werden diese deaktivierten Eosinophilen durch ständigen Zytokineinfluß aufgrund der andauernden Entzündung (Kroegel et al., 1994a, 1994b) wieder aktiviert und zum Ausstoß von Granula-Proteinen, Lipidmediatoren und Sauerstoffradikalen gebracht.

### 1.3.2 Apoptose

Unter Apoptose oder programmiertem bzw. physiologischem Zelltod versteht man einen geordneten Vorgang, der dafür sorgt, überflüssige, alte oder beschädigte Zellen aus dem Organismus zu eliminieren. Im Gegensatz zur Nekrose werden im Rahmen der Apoptose toxische Inhaltsstoffe nicht in die Umgebung abgesondert, da die apoptotische Zelle in membranumhüllte apoptotische Körperchen zerfällt, die phagozytiert werden.

Eosinophile Apoptose wird von den Zellen selbst eingeleitet, wenn sie altern. Apoptotische Zellen zeigen eine zytoplasmatische Kondensation, durch endogene Endonukleasen verursachte intranukleosomale Fragmentierung der DNA und Schrumpfen des Zellvolumens (Stern et al., 1992). Dem Schrumpfen apoptotischer Zellen folgt eine Änderung der Anordnung der Zellmembran. Phosphatidylserin (PS), das normalerweise an der Innenseite der Membran lokalisiert ist, findet sich bei apoptotischen Zellen an der äußeren Membranschicht. Annexin V ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität zu PS. Es ist bekannt, dass FITC-gefärbtes Annexin V ein sensibler und frühzeitiger Apoptosemarker bei Eosinophilen ist. Meist werden apoptotische Zellen jedoch von Makrophagen aufgenommen, bevor sie morphologische Zeichen des programmierten Zelltodes zeigen. Neben Makrophagen sind aber auch Epithelzellen in der Lage, apoptotische Eosinophile zu phagozytieren, was neben der Auswanderung dieser Zellen aus den Atemwegen vielleicht ein wichtiger Schritt bei der Säuberung der Lunge von Eosinophilen nach Allergenexposition darstellt (Walsh et al., 1999).

Verschiedene Faktoren können eine Apoptose auslösen. Darunter befinden sich bestimmte Zytokine, wie TGF- $\beta$  und IL-4, die die Apoptose fördern und zu einer geringeren Viabilität führen. Diese Substanzen werden durch andere Immunmodulatoren antagonisiert, die der Apoptose entgegenstehen und die Lebenszeit der Zellen verlängern, wie zum Beispiel IL-3, IL-5 oder GM-CSF (Alam et al., 1994, Yousefi et al., 1994, Wedi et al., 1998).

Mehrere Studien zeigen, dass sich Apoptose durch eine Stimulation von Oberflächenrezeptoren auslösen lässt. Ein Antigen, dessen Aktivierung eine Apoptose induziert und auf der Oberfläche des Eosinophilen exprimiert wird, ist CD95 (APO-1/Fas), ein Mitglied der TNF-Familie. Bei Ligations von CD95 Antigenen lässt sich die durch IL-5 induzierte Erhöhung der Viabilität antagonisieren (Matsumoto et al., 1994). Neben CD95 induzieren auch andere Membranrezeptoren eine Apoptose, wie zum Beispiel das CD69-Antigen. Es handelt sich hierbei um ein Signalrezeptor (Testi et al., 1994), der nur auf aktivierten Zellen exprimiert wird (Matsumoto et al., 1994, Walsh et al., 1996) und *in vitro* durch IL-3, IL-5 und GM-CSF induziert werden kann. Auch die Vernetzung von CD45 Oberflächenantigenen vermittelt ein pro-apoptotisches Signal.

Neben Zytokinen und Membranrezeptoren sind eine Reihe intrazellulärer Regulatoren der Apoptose beim eosinophilen Granulozyten bekannt. Hierzu gehört beispielsweise die Familie der *bcl-2* Proteine (Ochiai et al., 1997, Saita et al., 1997). *Bcl-2* wurde erstmals bei einem neoplastischen B-Zell Lymphom identifiziert und verhinderte dort durch Überexprimierung den Tod der B-Zelle (Yang and Korsmeyer, 1996). Die Aktivierung anderer *bcl-2* Familienmitglieder verhindern ebenfalls den Zelltod, wirken also anti-apoptotisch. Hierzu gehört *bcl-x<sub>L</sub>*. Demgegenüber wirken andere Mitglieder, wie etwa *bax* und *bcl-x<sub>S</sub>* pro-apoptotisch. Es konnte gezeigt werden, dass der anti-apoptotische Effekt von GM-CSF und IL-5 auf einer vermehrten Transkription von *bcl-x<sub>L</sub>* mRNA beruht und umgekehrt die Apoptose mit einem verminderten Auftreten dem RNA in der Zelle korreliert (Dibbert et al., 1998).

Es wird vermutet, dass diese Proteine sich innerhalb der Zelle das Gleichgewicht halten. Sobald das pro- bzw. anti-apoptotische Produkt in seinem Verhältnis überwiegt, kommt es zur Apoptose oder zur erhöhten Viabilität, beziehungsweise verlängerten Überlebenszeit.

Ob und wie sich neue Asthma Medikamente wie Montelukast, Zafirlukast, Fexofenadin und Nedocromil auf das Überleben der Eosinophilen auswirken, ist bis jetzt noch nicht bekannt.

## 2. Zielsetzung der Arbeit

Üblicherweise werden im Rahmen von zellbiologischen Studien die Zellen aus einem kontinuierlichen physiologischen oder pathophysiologischen Prozess herausgerissen und im Hinblick auf ihre Eigenschaften untersucht. Dabei wird zumeist davon ausgegangen, dass genau diese Zelle, mit den zu diesem Zeitpunkt aktivierten Funktionen, die in diesem definierten Augenblick zu messenden Eigenschaften auch in allen anderen Situationen unverändert beibehält. Dem ist aber nicht so. Die Zellen stehen unter kontinuierlicher simultaner oder sequentieller Einwirkung von Zytokinen, sowie einer sich ständig ändernden Mikroumgebung und müssen sich im genetisch vorgegebenen Rahmen anpassen. Diese Phänomen wird je nach dem Aktivierungsgrad einer Zelle z.B. als 'Aktivierung', 'Priming' oder 'Deaktivierung' beschrieben. Aber auch diese Bezeichnungen sind nur als grobe Annäherung an die tatsächlich bestehende Situation zu verstehen.

Um sich dem Phänomen der Plastizität von Entzündungszellen anzunähern, haben wir in der vorliegenden Arbeit die möglichen phänotypischen Veränderungen, beispielsweise die Oberflächenantigen Expression, und die funktionellen Ausformungen der Zellen, wie etwa die Modifikation von Viabilität, Apoptose, Transmigration, sowie Expression und Sekretion von Zellprodukten unter

1. Stimulation mit Interleukin-3, Interleukin-5, Interferon- $\gamma$ , C5a und LTC<sub>4</sub>,
2. etablierten Medikamenten wie Montelukast, Zafirlukast, Fexofenadin und Nedocromil untersucht.

## 3. Material & Methoden

### **3.1 Isolierung der eosinophilen Granulozyten aus dem Vollblut**

Für die Versuche wurde ausschließlich Blut von Patienten mit allergischer Rhinitis oder mildem Asthma bronchiale verwendet. Die Isolation erfolgte in Anlehnung an die von Hansel et al. 1991 beschriebene Methode.

45 bis 90 ml Vollblut wurden aus der Vena cubitalis in EDTA Röhrchen (1,6mg EDTA/ml Blut) abgenommen. Das Blut wurde dann 1:1 mit PBS verdünnt und je 25 ml über eine Percollösung (1,08 g/cm<sup>2</sup>, Pharmacia, Schweden) geschichtet. Die anschließende Zentrifugation bewirkte eine Auftrennung der Zellbestandteile nach ihrer Dichte. Danach befand sich in dieser Suspension in der obersten Schicht das Serum, in der Mitte die mononukleären Zellen, darunter das restliche Percoll und im Bodensatz, dem sogenannten Pellet, ein Gemisch von Granulozyten und Erythrozyten. Das Serum, die mononukleären Zellen und das Percoll wurden abgesaugt und verworfen. Zur anschließenden osmotischen Erythrozytenlyse wurde zum Granulozyten-Pellet 20 ml 0,2 % Na-Cl-Lösung pipettiert. Nach 30 Sek. wurde mit 20 ml 1,6 % Na-Cl Lösung aufgefüllt und wieder zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde 5 mal wiederholt bis das Pellet weiß war. Das Granulozytenpellet wurde dann in 20 ml PBS (Promo Cell, Heidelberg) / 2 % FCS (Gibco, Paisly, England) aufgenommen und die Zellzahl mittels Kimura Färbung in einer Neubauerkammer ausgezählt.

Grundlage für das Verfahren zur Trennung eosinophiler von neutrophilen Granulozyten bietet die von Miltenyi et al. (1990) entwickelte Methode der negativen Selektion in einer immunmagnetischen Separation. Dabei wurden die von Erythrozyten gereinigten Granulozyten mit einem Antikörper gegen das Oberflächenmolekül CD16 inkubiert. An seinem F<sub>c</sub>-Teil waren Eisenmoleküle befestigt. Da nur neutrophile Granulozyten den Rezeptor CD16 exprimieren, konnten sich so die Antikörper nicht an die Eosinophilen binden. Die inkubierten Zellen ließ man an einer magnetisierten Metallspule entlanglaufen. Die CD16-positiven Zellen blieben darin hängen und es konnten reine Eosinophile gewonnen werden.

Das Granulozytenpellet wurde in 1 ml PBS/FCS resuspendiert und mit anti-CD16 und anti-CD3 (beide: Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) Antikörper für eine halbe Stunde bei 4° C unter Rotation inkubiert. Für 1 x 10<sup>7</sup> Zellen wurden 10 µl magnetische Antikörper verwendet. Der Antikörper gegen CD3 wurde mit den Eosinophilen inkubiert, um restliche vorhandene Lymphozyten ebenfalls magnetisch zu isolieren.

Für die anschließende Zellseparation wurde das MACS System (Miltenyi Biotec, Kalifornien, USA) benützt. Die Eosinophilen wurden mit 40 ml PBS/FCS durchgespült, abzentrifugiert und anschließend in Medium (RPMI (BioCept, Kirchzarten), 10% FCS (Gibco, Paisly, England), 200 mM L-Glutamin (Seromed, Berlin), 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (beide: Boehringer Mannheim, Mannheim), 100 µg/ml Gentamycin; Cell Concept, Umkirch) aufgenommen. Die Endkonzentration der Eosinophilen nach Isolation betrug mindestens 99%.

## **3.2 Durchflußzytometrische Methoden**

### **3.2.1 Inkubation der Zellen**

Die Zellen wurden in einer Mikrotiterplatte (Microtest 96; Becton Dickinson, Heidelberg) inkubiert. Für jede FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) Messung wurden 50 µl Zellsuspension mit einer Konzentration von  $5 \times 10^4$  Eosinophilen pro Messung benötigt. Die Zytokine IL-3, IL-5, IFN- $\gamma$  (alle: Cell Concept, Umkirch) wurde in einer Konzentration von 10 ng/ml, C5a (Sigma, Deisenhofen) in einer Konzentration von 1 nM/ml und LTC<sub>4</sub> (Sigma, Deisenhofen) in einer Konzentration von 10 nM/ml verwendet. Die Medikamente Montelukast (MSD, Haar), Zafirlukast (Zeneca, Schwetzingen), Fexofenadin (Hoechst Marion Roussel, Bad Soden am Taunus) und Nedocromil (Rhône-Poulenc Rorer, Köln) wurden in einer Konzentration von 10 ng/ml mit den Zellen inkubiert. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend für 24 Stunden bei 37,2 °C und 4,9 % CO<sub>2</sub> in dem Inkubator (Forma, Frankfurt am Main) bebrütet.

### **3.2.2 Messung der Oberflächenmarker**

Alle Oberflächenmarker wurden mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten monoklonalen Antikörpern gemessen (siehe unten). 1 µl Antikörpergebrauchslösung wurde zu 50 µl Zellsuspension gegeben. Anschließend wurde die Lösung bei 4° C für 30 Min. im Dunkeln inkubiert. Es folgte das Waschen mit PBS/FCS (Gibco, Paisly, England) und das Wiederaufnehmen in 200 µl Propidiumjodid (0,5 µg/ml, Sigma, Deisenhofen). Bei jeder Messung, die mit dem FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt wurde, wurden mindestens 2000 lebende Zellen gezählt. Tote, Propidium-positive Zellen wurden durch entsprechendes Setzen von Fenstern ausgeschlossen.

Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der CellQuest-Software (Becton Dickinson, Heidelberg) ausgewertet und die Fluoreszenzen von Phycoerythrin (PE) und Fluorescein-iso-

thiocyanat (FITC) in logarithmischen Grafiken dargestellt. Die bestimmten Fluoreszenzen (Single Mean Fluorescence: SMF) wurden zur Kontrolle in Beziehung gesetzt, das heißt die Y-Achse aller dargestellten Ergebnisse der Durchflußzytometrie zeigt die prozentuale Abweichung der erhaltenen Ergebnisse von den unstimulierten Eosinophilen.

Antikörper	Hersteller
IgG-Kontrolle	(DAKO, Glostrup, Dänemark)
CD 11b	(Becton Dickinson, Heidelberg)
CD 13	(Pharmingen, San Diego, USA)
CD 26	(Pharmingen, San Diego, USA)
CD 32	(Pharmingen, San Diego, USA)
CD 49d	(NatuTec, Frankfurt)
CD 54	(Pharmingen, San Diego, USA)
CD 62L	(Pharmingen, San Diego, USA)
CD 69	(Serotec, Oxford, England)
CD 95	(Pharmingen, San Diego, USA)

**Tabelle 1:** Liste der verwendeten Antikörper

### 3.2.3 Bestimmung der Viabilität mit Propidiumjodid

Bei der Messung der lebenden Zellen mit Hilfe von Propidiumjodid (Sigma, Deisenhofen), wurden 50 µl eosinophile Granulozyten in einer Konzentration von  $5 \times 10^4$  Zellen pro Messung verwendet. Propidiumjodid kann nur Zellen mit defekter Zellmembran, also tote Zellen färben. So lassen sich lebende Zellen wiederum durch Setzen von Fenstern bei der Durchflußzytometrie erkennen.

### 3.2.4 Bestimmung der Apoptose mit Annexin V

Bei dieser Methode wurde mit Hilfe des Annexins V (R&D, Wiesbaden) die Apoptose der eosinophilen Granulozyten gemessen.  $5 \times 10^4$  Zellen wurden 15 Min. mit 100 µl Färbelösung inkubiert und nach Zugabe von 100 µl Bindepuffer im FACS gemessen. Bei Bezug der erhaltenen Daten der Annexin positiven Zellen auf die PI-negativen Eosinophilen, ließen sich Aussagen bezüglich dem relativen Anteil der apoptotischen Zellen machen.

### 3.2.5 Modulation des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms in die Zelle

Mit diesem Versuch kann der Calziumanstieg innerhalb einer Zelle, stellvertretend für den Aktivierungsgrad, gemessen werden. Dazu wurden  $5 \times 10^5$  Eosinophile in 100  $\mu\text{l}$  Medium (Promo Cell, Heidelberg) aufgenommen. Es wurde 2  $\mu\text{M}$  Fluo-3 (Sigma, Deisenhofen) dazugegeben und für 20 Min. bei 37° C inkubiert. Danach wurden die Zellen 10 Min. lang zentrifugiert und mit Medium gewaschen. Es wurden nun 100  $\mu\text{l}$  Propidiumjodid (Sigma, Deisenhofen) zu dem Ansatz gegeben und mit PBS auf 450  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Alle 20 Sekunden wurde durchflußzytometrisch gemessen. Nach einer Minute wurde der Stimulus dazugegeben und direkt nach Injektion der Substanz in die Probe gemessen. Nach 5 Min. wurde Ionomycin (Sigma, Deisenhofen) als Positiv-Kontrolle in das Mess-Röhrchen pipettiert, auf die die zuvor gemessenen Daten bezogen wurden.

### **3.3 Transmigration**

HUVEC (Human umbilical vein endothelial Cells; Promocell, Heidelberg) wurden in 1 ml Medium (Promo Cell, Heidelberg) aufgenommen und für 3 Tage im Inkubator angezüchtet, bis in den Kulturflaschen (Falcon, New Jersey, USA) ein dichter Endothelzellrasen gewachsen ist. Die Endothelzellen wurden nach Waschen mittels PBS mit Trypsin abgelöst und in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen in Vertiefungen von Transwell-Platten (Greiner Labortechnik, Frickenhausen) pipettiert. Danach wurden die Zellen mit IL-1 $\beta$  (Cell Concept, Umkirch) in einer Konzentration von 10 ng/ml bei 37° C für 4 Stunden inkubiert. IL-1 $\beta$  wurde abgesaugt und die Transwells mit PBS/FCS gespült. In die unteren Kammern wurden 500  $\mu\text{l}$  Medium und in die oberen 100  $\mu\text{l}$  RPMI mit eosinophilen Granulozyten pipettiert. Die Platten wurden nun für 3 Stunden wieder bei 37° C in den Inkubator gestellt. Anschließend wurde 50  $\mu\text{l}$  EDTA (34 mM) in die unteren Kammer hinzugefügt und sie für 10 Min. auf einem Schüttelgerät leicht durchgeschüttelt, um die noch locker in der Endothelschicht hängenden Zellen zu gewinnen. Die Inhalte der oberen und unteren Kammern wurden abzentrifugiert und die Überstände bei -80° C für die ELISA (siehe 3.4) eingefroren. Das Zellpellet der unteren Kammer wurde in 100  $\mu\text{l}$  PBS/FCS aufgenommen. 10  $\mu\text{l}$  der Eosinophilen wurden mit FDA (Cell Concept, Umkirch) gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt.

### **3.4 ELISA**

Der Nachweis von MMP-9 erfolgte mittels ELISA (Quantikine, human MMP-9 total, R&D, Wiesbaden). Diese Methode weist mit Hilfe des „Sandwich“ Verfahrens schon geringste Spuren von MMP-9 in der Probe nach. Die verwendete Mikrotiterplatte war mit einem spezifischen Antikörper gegen MMP-9 überzogen. War MMP-9 in der Probe vorhanden, wurde es an den Antikörper gebunden. Es wurden 100 µl der zu untersuchenden Zellsuspension verwendet (Inkubation: 2 Stunden; Raumtemperatur; Mikroplattenschüttler: 500 rpm). Nach einem ersten Waschschriff mit Wasch-Puffer (400 µl) sollten alle Stoffe der Suspension entfernt sein, so dass nur noch das an den Antikörpern gebundene MMP-9 übrig blieb. Darauf wurde ein weiterer Antikörper gegen MMP-9 zugefügt, an dem ein Enzym gekoppelt war (Inkubation: 1 Stunde, Mikroplattenschüttler: 500 rpm). Ein zweiter Waschschriff sollte das MMP-9 entfernen, das sich nicht in diesem Antikörper –„Sandwich“ befand. Hierauf setzte dieses Enzym ein Substrat (200 µl, Inkubation: 30 Min auf der Labortisch) in einem farbreaktiven Prozeß um, der mit einem Photometer (EL-800; Bio-Tek-Instruments, Boston, USA) bei 450 nm Wellenlänge gemessen werden konnte. So ließen sich Rückschlüsse auf die Konzentration von MMP-9 in der ursprünglichen Probe ziehen.

Nach der Transmigration wurden die Überstände sowohl der oberen als auch der unteren Kammer der Transwell-Platten abgenommen und für den ELISA verwendet. Die Zellen waren zuvor mit den Medikamenten und als positiv-Kontrolle mit Eotaxin stimuliert worden. Das genaue methodische Vorgehen beim ELISA erfolgte gemäß der Beschreibung des Herstellers.

### **3.5 Total-RNA-Extraktion**

Die Extraktion wurde nach einer von Kodavanti 1996 und Yousefi 1995 etablierten Methode durchgeführt. Die pro Ansatz benötigten  $2 \times 10^6$  Eosinophilen wurden in RNase-freien, sterilen Reaktionsgefäße abzentrifugiert und das Pellet in 800 µl TriPure (Boehringer Mannheim, Mannheim) mit 0,8 µl RNase Block Ribonuclease Inhibitor (End-Konz. 40 U/ml, Stratagene, Düsseldorf) und 0,25 µl Glycogen (20 mg/ml, Gentra, New Jersey, USA) aufgenommen. Es folgte die Lyse der eosinophilen Granulozyten bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur 5 Minuten stehen gelassen um die Nukleinsäure-Protein-Komplexe zu lösen. Danach wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt und der Inhalt der Caps durch wiederholtes Wenden gemischt. Hierauf wurden die Zellen bei 4° C für 15 Min. inkubiert und anschließend zentrifugiert. Die obere wässrige RNA-haltige Phase wurde in

neue sterile Reaktionsgefäße überführt und die gleiche Menge an TriPure und 1/5 des Volumens an Chloroform zugegeben. Die Zellen wurden wieder für 15 Min. im 4° C Kühlschrank inkubiert und anschließend zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde wieder vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol, worauf das Reaktionsgefäß nach gutem Mischen für 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach Zentrifugation (12000g, 15 Min., 4° C) wurde das Isopropanol abgenommen und die RNA im Pellet gelassen. 1 ml Ethanol (75%) wurde dazugegeben und nach kurzem Vortexen zentrifugiert. Hierauf wurde das Ethanol abgenommen, und das Pellet luftgetrocknet.

### **3.6 Reverse Transkription**

Die „Reverse Transkription“ wurde mit dem Display-Systems-Biotech-Kit (Display Systems Biotech, Kopenhagen, Dänemark) und der displayTHERMO-RT (Display Systems Biotech, Kopenhagen, Dänemark) durchgeführt.

18 µl von der im Kit angegebenen Mischung wurden jeweils zu der getrockneten Total-RNA gegeben und resuspendiert. Es folgte eine Inkubation bei 65° C für 10 Min. Anschließend wurde zu jeder Probe 2,0 µl displayTHERMO-RT Terminator Mix (Display Systems Biotech, Kopenhagen, Dänemark) gegeben und für 40 Min bei 42° C inkubiert. Danach wurde die Total-RNA wieder bei 65° C für 15 Min. inkubiert. Nun konnten die cDNA Proben entweder bei –80° C gelagert oder direkt für die PCR verwendet werden.

### **3.7 Polymerase-Ketten-Reaktion**

Der für die PCR benötigte Mastermix berechnete sich aus  $n \times$  den cDNA-Proben +  $1 \times 10x$  cDNA(Positiv-) kontrolle +  $1 \times$  Wasser (Negativ-) kontrolle +  $0,5 \times$  Pipettierverluste.

Pro Ansatz wurden 25µl mit folgender Zusammensetzung verwendet:

- 13,37 µl DEPC-Wasser
- 2,5 µl 10 x PCR-Puffer; 15 mmol MgCl<sup>2</sup> (Perkin-Elmer, , New Jersey, USA)
- 2 µl dNTP-Mixture; 2,5 mmol/l, 28ml (Takara, Otsu, Japan)
- 0,13 µl Ampli Taq DNA Polymerase; 5 Units/ml (Perkin Elmer, New Jersey, USA)
-

- 1µl Primer, 10µmol; Sense (CAC TGT CCA CCC CTC AGA GC, CellConcept, Umkirch)
- 1µl Primer, 10µmol; Antisense (GCC ACT TGT GGG CGA TAA GG, CellConcept, Umkirch)

25 µl Mastermix wurden nun zu den 5 µl cDNA, Positiv- und Negativkontrollen pipettiert. Anschließend wurde die PCR im Perkin Elmer Cyclor 9600 nach folgendem Schema nach Giambernadi durchgeführt:

1. Hauptphase I:	00:30 min	94° C
(1x)	01:00 min	58° C
	01:50 min	72° C
2. Hauptphase II:	00:20 min	94° C
(45x)	01:00 min	58° C
	01:50 min	72° C
3. Elongationsphase:	10:00 min	70° C
(1x)	05:00 min	25° C

### **3.8 Gelelektrophorese:**

Wir verwendeten ein Agarose-Gel (2,5 %, Boehringer Mannheim, Mannheim) mit pH-Wert von 8,0. Die PCR-Produkte wurden mit dem Auftragspuffer gemischt, in die Geltaschen pipettiert und anschließend in einem Elektrophoresebad bei 120 V und 0,20 A für 90 Min. laufen gelassen (Bio-Rad, München). Danach wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt. Aufgenommen wurde das Gel mit einem Gelelektrophorese Dokumentationssystem (Biostep) und ausgewertet mit Phoretix 1D Advanced-Software.

### **3.9 Statistische Methoden**

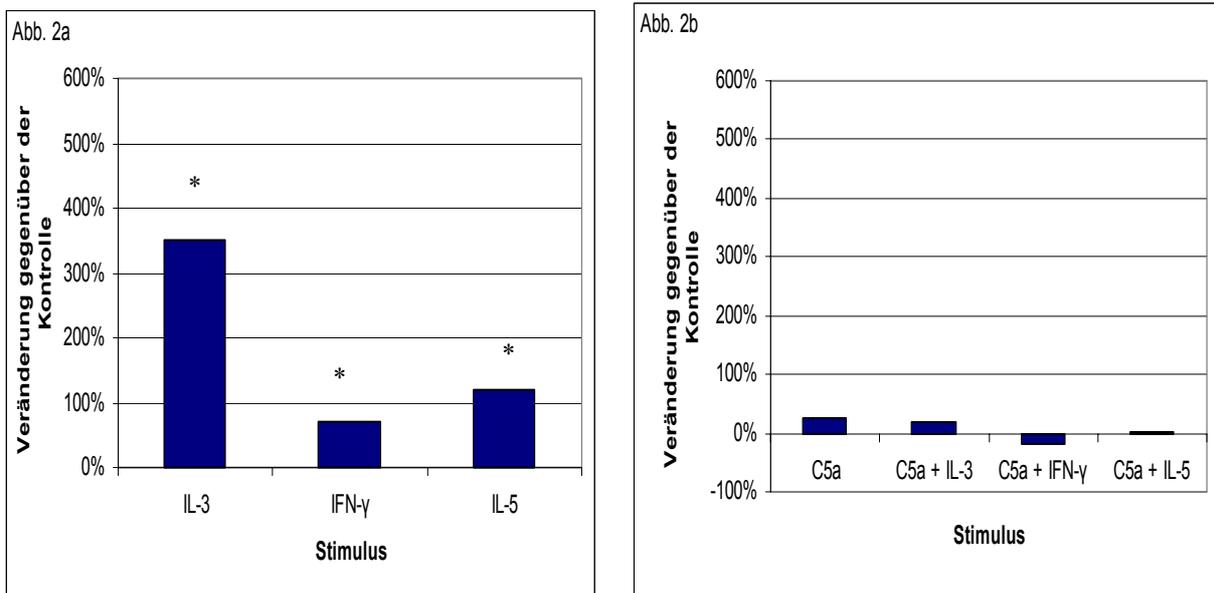
Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Daten als prozentuale Abweichung von unstimulierten Eosinophilen (Kontrolle) beschrieben. Die Daten wurden mit Hilfe von SPSS (8.0 für Windows) ausgewertet und der Wilcoxon Test für nicht parametrische verbundene Stichproben verwendet. Eine Signifikanz wurde bei  $p < 0,05$  angenommen und graphisch durch ein Kreuzchen „\*“ dargestellt. Grenzwertig signifikante Ergebnisse zeigten eine Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,1$  und sind am geklammerten Kreuzchen „(\*)“ erkennbar.

## 4. Resultate

### 4.1 Modulation des Phänotyps eosinophiler Granulozyten

#### 4.1.1 CD11b

Das Oberflächenantigen CD11b wird auf unstimulierten eosinophilen Granulozyten exprimiert. Die Expression steigt bei Inkubation mit IL-3 um 350 % ( $p < 0,05$ ). IFN- $\gamma$  und IL-5 erhöhten die CD11b Expression auf etwa das Zweifache ( $p < 0,05$ ) (Abb. 2a). C5a alleine oder in Gegenwart der Zytokine bleibt ohne Einfluß auf die Expression des Antigens (Abb. 2b).

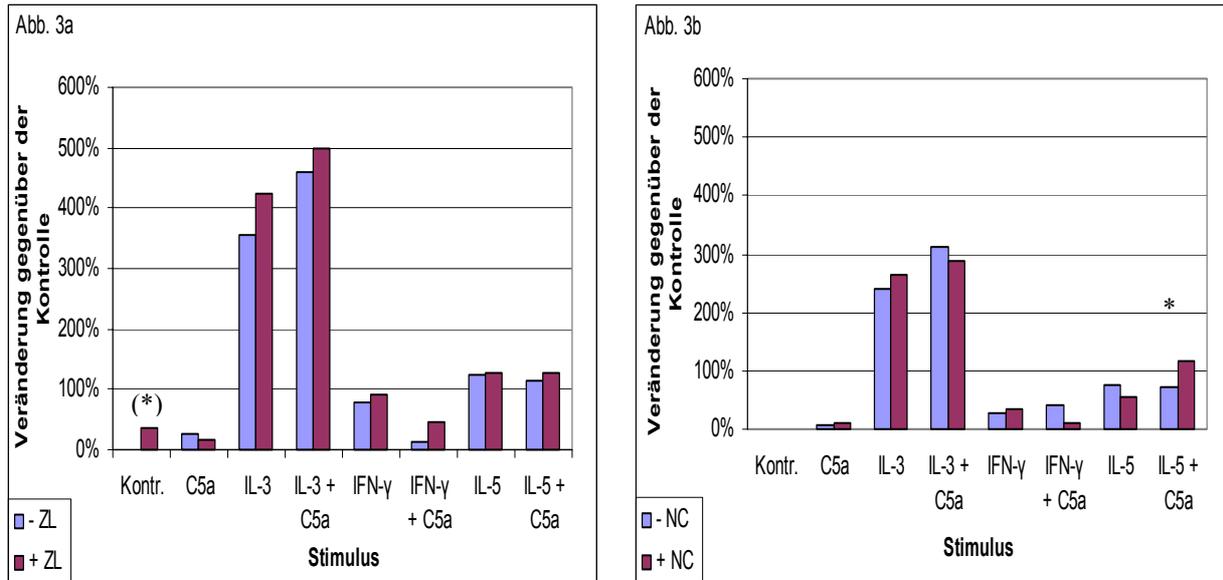


**Abbildung 2:** Oberflächenexpression von CD11b. Stimulation mit IL-3, IFN- $\gamma$  und IL-5 (2a;  $n=5$ ), Kombination mit C5a (2b,  $n=3$ ); Inkubation über 24h.

Montelukast (ML) zeigt keinen Unterschied in der CD11b Antigen Expression im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Fexofenadin (FF) zeigt weder alleine noch in Kostimulation mit C5a, IL-3 und IL-5 einen Einfluß auf die CD11b Antigen Expression.

In Gegenwart von Zafirlukast (ZL) wird die Expression von CD11b tendentiell ( $p < 0,1$ ) gesteigert. Bei Kombination mit C5a, IL-3, IFN- $\gamma$  und IL-5 lässt sich keine signifikante Abweichung von der Inkubation ohne der Substanz erkennen (Abb. 3a).

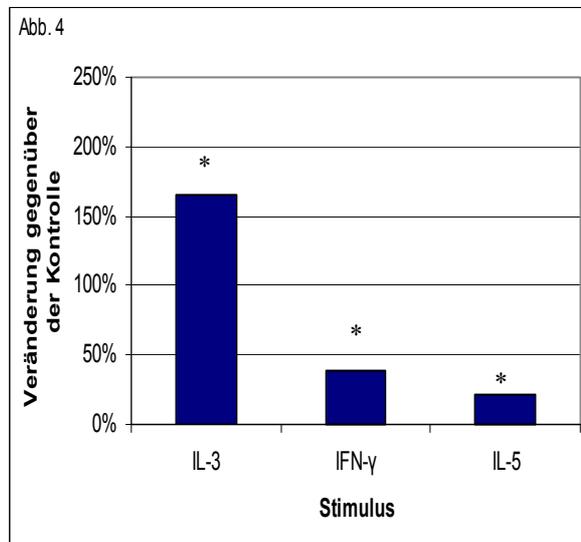
Nedocromil (NC) zeigt keinen relevanten Einfluß auf den Oberflächenmarker mit und ohne Zytokine. Bei Kombination von C5a und IL-5 zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Expression von CD11b nach Stimulation mit NC ( $p < 0,05$ ) (Abb. 3b).



**Abbildung 3:** *Oberflächenausdrück von CD11b. Stimulation mit Zafirlukast (3a; n=4) und Nedocromil (3b; n=6) mit und ohne Zugabe von C5a, IL-3, IFN- $\gamma$  und IL-5. Inkubation über 24h.*

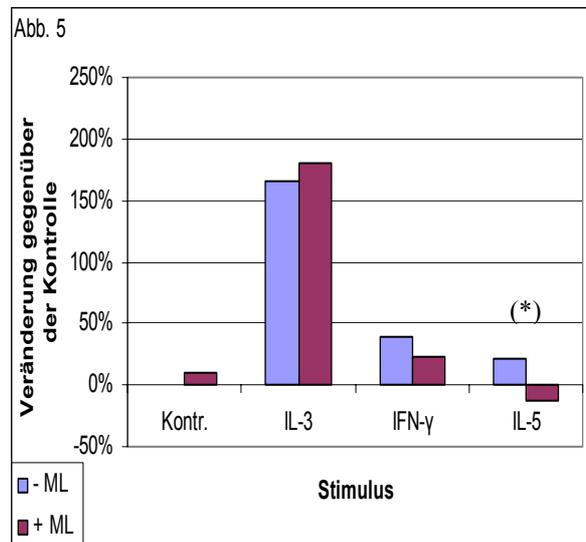
### 3.1.2 CD13

Die Expression der Aminopeptidase N (CD13) wird nach 24 h Inkubation mit IL-3 um 170 % ( $p < 0,05$ ), mit IFN- $\gamma$  um 40 % und mit IL-5 um 20 % signifikant hochreguliert (Abb.4).



**Abbildung 4:** *Oberflächenausdrück von CD13. Stimulation mit IL-3, IFN $\gamma$  und IL-5 (n=7). Inkubation über 24h.*

ML alleine oder in Gegenwart von IL-3 und IFN- $\gamma$  bewirkt keine Veränderung der CD13 Expression. Die Kostimulation mit IL-5 zeigt eine tendentiell verminderte Expression von CD13 ( $p < 0,1$ ) (Abb. 5).

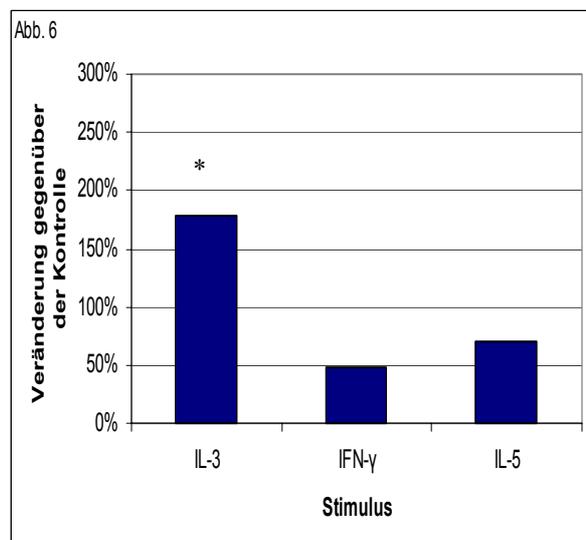


**Abbildung 5:** *Oberflächenexpression von CD13. Stimulation mit Montelukast und IL-3, IFN- $\gamma$  und IL-5 (n=7). Inkubation über 24h.*

ZL, FF und NC beeinflussen weder als alleinige Stimuli noch in Kombination mit den ausgewählten Zytokinen die CD13-Expression des Eosinophilen.

#### 4.1.3 CD26

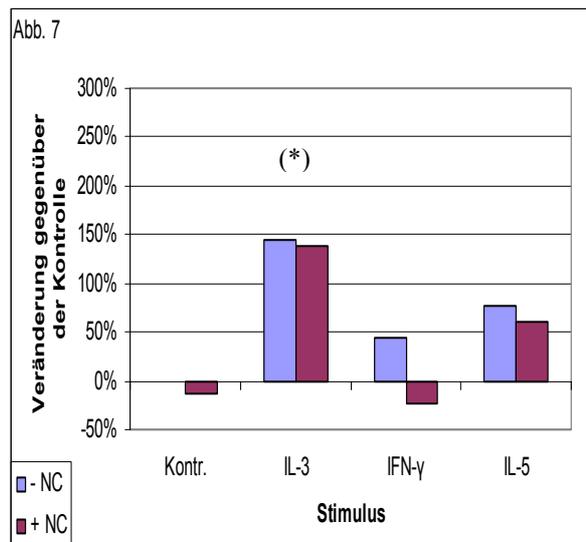
Die Expression des Oberflächenantigens CD26 wird durch die Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-5 nicht signifikant beeinflusst. IL-3 erhöht die Dichte von CD26 auf dem Eosinophilen um 180 % ( $p < 0,05$ ) (Abb. 6).



**Abbildung 6:** *Oberflächenexpression von CD26. Stimulation mit IL-3, IFN- $\gamma$  und IL-5 (n=5). Inkubation über 24h.*

Bei Inkubation der Zellen mit ML, ZL und FF zeigen sich keine Effekte der Medikamente sowohl auf unstimulierte als auch auf stimulierte Zellen.

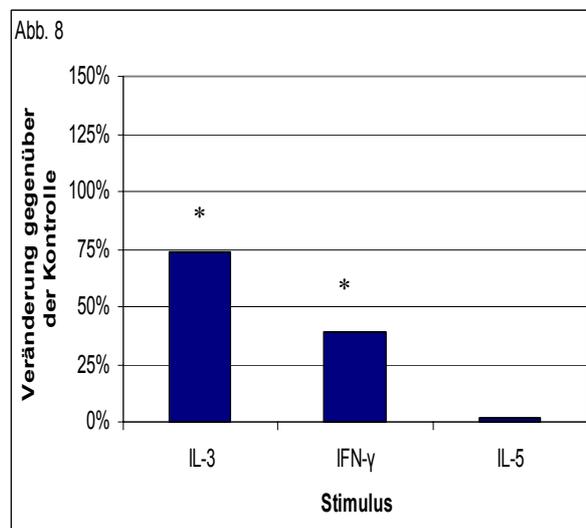
NC alleine hat ebenfalls keinen Einfluß auf die Expression des CD26 Antigens. Bei Inkubation der Zellen gemeinsam mit IL-3 und NC zeigt sich eine tendentielle Abnahme der CD26 Expression ( $p < 0,1$ ). Die Kombination mit IFN- $\gamma$  und IL-5 mit NC ergibt keine statistisch signifikante Veränderung der Expressionsdichte, verglichen mit der Stimulation ohne NC (Abb. 7).



**Abbildung 7:** *Oberflächenexpression von CD26. Stimulation mit Nedocromil ( $n=5$ ) in Kombination mit IL-3, IFN- $\gamma$  und IL-5. Inkubation über 24h.*

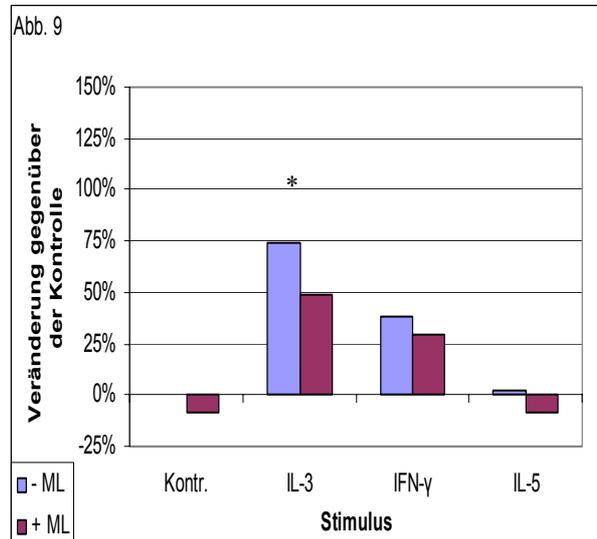
#### 4.1.4 CD32

Die Expression des CD32 Antigens lässt sich durch IL-3 um 75 %, sowie durch IFN- $\gamma$  um 40 % steigern ( $p < 0,05$ ) (Abb. 8). IL-5 und C5a haben keinen Effekt auf die Expression des Fc $\gamma$ -RII Rezeptors.



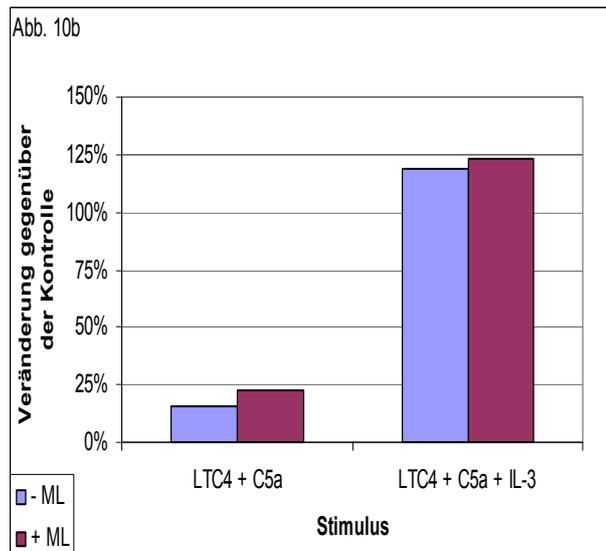
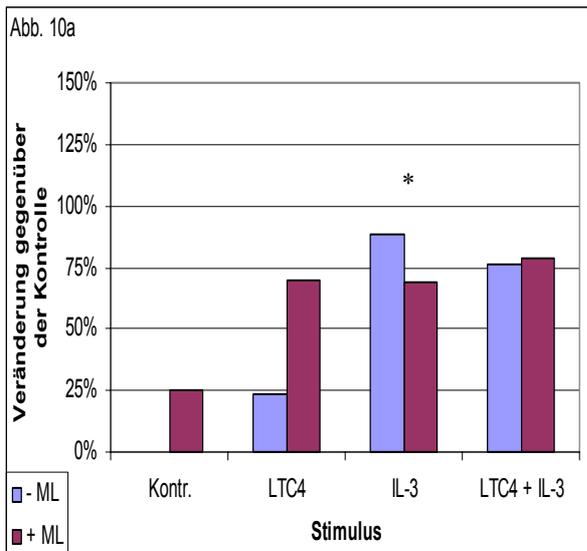
**Abbildung 8:** *Oberflächenexpression von CD32. Stimulation mit IL-3, IFN- $\gamma$  und IL-5 ( $n=14$ ). Inkubation über 24h;*

Bei Inkubation des eosinophilen Granulozyten mit IL-3 und ML verringert ML den Effekt von IL-3 um 15 % ( $p < 0,05$ ). ML hat keinen Einfluß auf den Effekt von C5a, IFN- $\gamma$  und IL-5. ML alleine zeigt keine Auswirkung auf die CD32 Expression (Abb. 9).



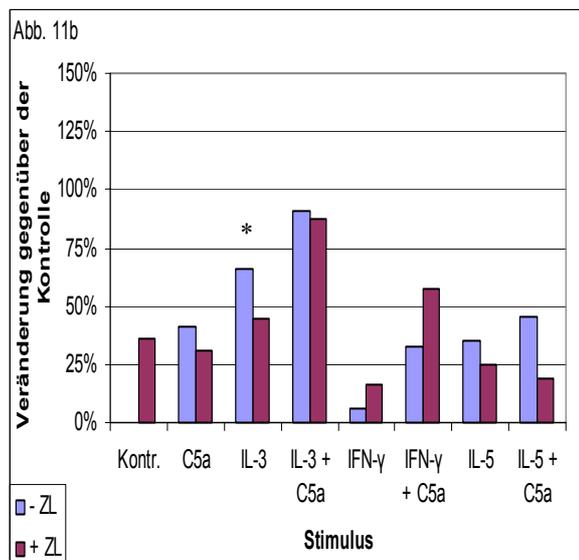
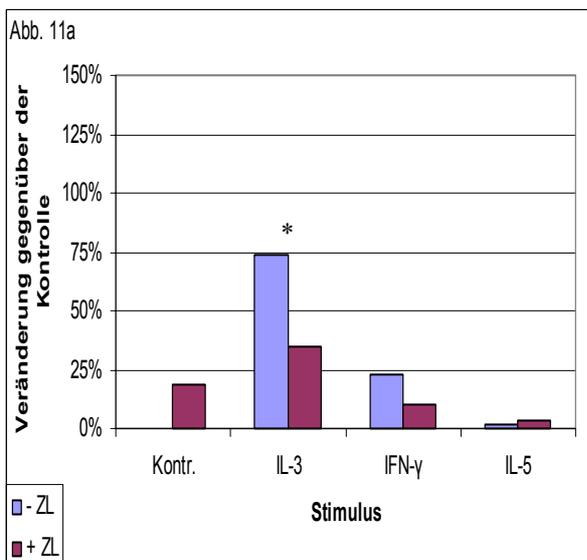
**Abbildung 9:** *Oberflächenexpression von CD32. Stimulation mit Montelukast in Kombination mit IL-3, IFN- $\gamma$ , IL-5 (n=14). Inkubation über 24h.*

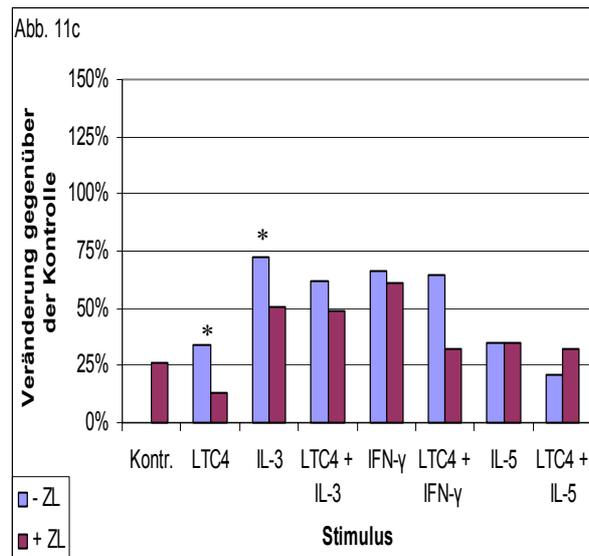
Um den Effekt auf die Expression von CD32 zu demonstrieren, werden die Eosinophilen mit LTC<sub>4</sub> für 24 Stunden inkubiert. Unter diesen Bedingungen lässt sich die signifikante Verminderung der CD32 Expression durch ML nicht mehr nachweisen und die Werte sind miteinander vergleichbar: LTC<sub>4</sub> + IL-3: 12,00 SMF; LTC<sub>4</sub> + IL-3 + ML: 12,17 SMF. LTC<sub>4</sub> hat keinen Effekt auf die Wirkung der Zytokine (Abb. 10a). Anschließend wird LTC<sub>4</sub> mit C5a kombiniert und die Zellen für 24 h inkubiert. ML in Kostimulation von LTC<sub>4</sub> und C5a reduziert den Effekt von IL-3 nicht (Abb. 10b).



**Abbildung 10:** *Oberflächenexpression von CD32. Stimulation mit Montelukast in Kombination mit LTC<sub>4</sub> (10a; n=5), C5a, IL-3, IFN- $\gamma$  und IL-5 (10b; n=5). Inkubation über 24h.*

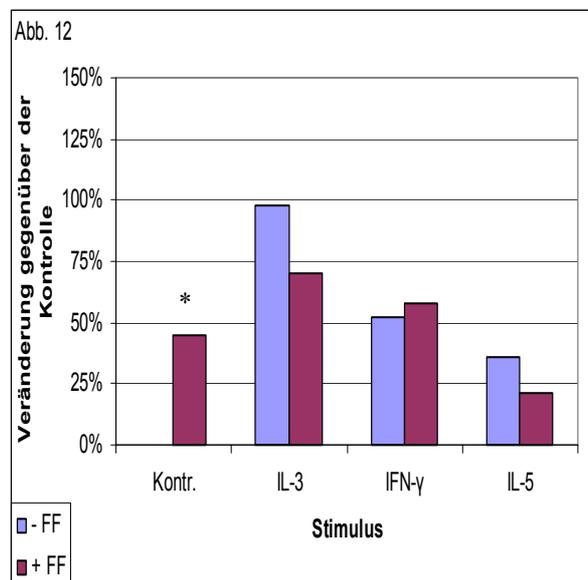
Bei Inkubation von IFN- $\gamma$  und IL-5 mit ZL kann keine statistische Veränderung festgestellt werden (Abb. 11a). In Kombination mit IL-3 zeigt ZL eine Abnahme der CD32 Expression um 21 % ( $p < 0,01$ ). Bei Inkubation der Zellen zusätzlich mit C5a, nimmt die Expression von CD32 nur um 3 % ab. In Kombination mit IFN- $\gamma$  und IL-5 führt C5a zu keiner wesentlichen Änderung (Abb. 11b). In Gegenwart von LTC<sub>4</sub> bewirkt ZL eine Abnahme der CD32 Expression um 16 % ( $p < 0,05$ ). Bei Inkubation mit LTC<sub>4</sub> wird die signifikante Abnahme der CD32 Expression durch IL-3 und ZL aufgehoben. Auf die Stimulation von IFN- $\gamma$  und IL-5 hat LTC<sub>4</sub> keinen Effekt (Abb. 11c).





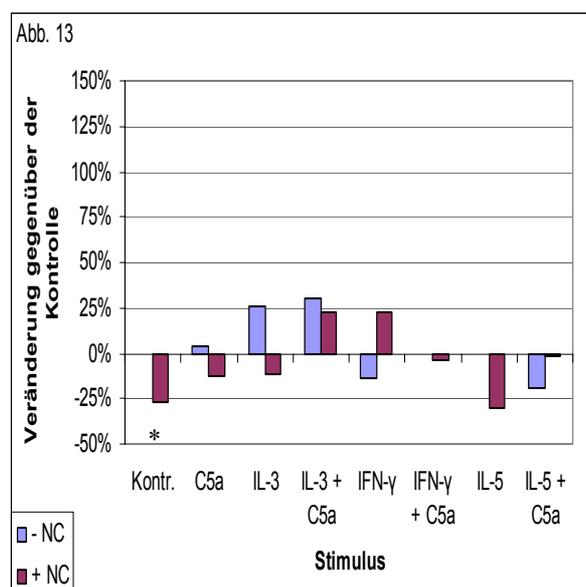
**Abbildung 11:** *Oberflächenexpression von CD32. Stimulation mit Zafirlukast in Kombination mit IL-3, IFN-γ und IL-5 (11a; n=12), C5a (11b; n=8) und LTC<sub>4</sub> (11c; n=6). Inkubation über 24h.*

FF alleine steigert die Expression von CD32 um 45 % ( $p < 0,05$ ). Mit den Zytokinen hat FF keinen weiteren fördernden oder abschwächenden Einfluß (Abb. 12). C5a hat in Kombination mit allen Zytokinen keine Auswirkung auf die Expression von CD32.



**Abbildung 12:** *Oberflächenexpression von CD32. Stimulation mit Fexofenadin in Kombination mit IL-3, IFN-γ und IL-5 (n=9). Inkubation über 24h.*

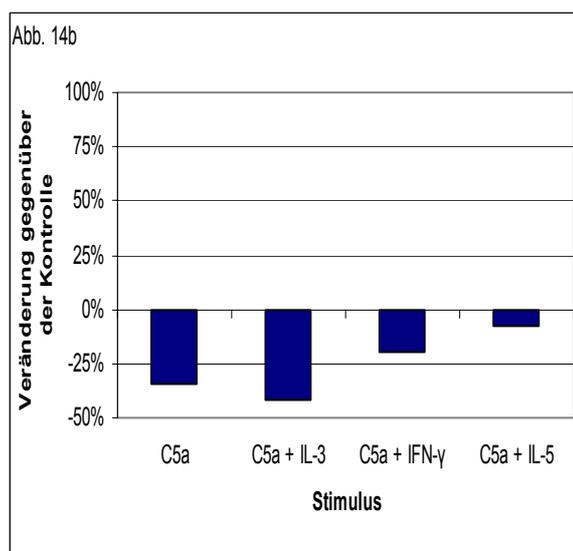
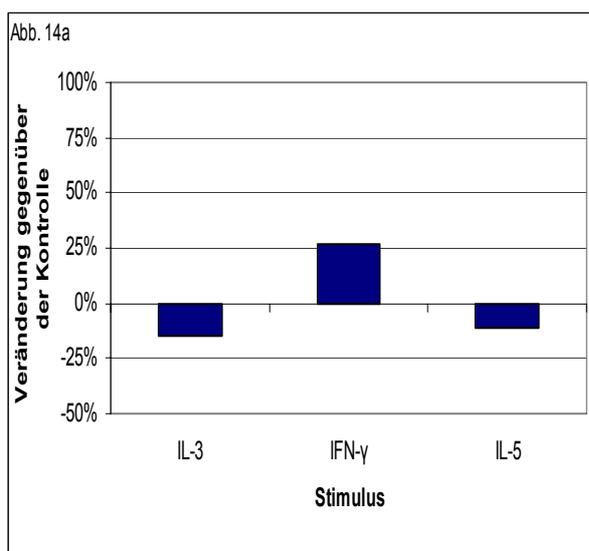
NC alleine reduziert die Expression von CD32 um 27 % ( $p < 0,05$ ). Bei der Inkubation mit den Zytokinen und NC lassen sich keine weiteren Veränderungen erkennen. (Abb.13).



**Abbildung 13:** Oberflächenexpression von CD32. Stimulation mit Nedocromil in Kombination mit IL-3, IFN- $\gamma$ , IL-5 und C5a (n=5). Inkubation über 24h.

#### 4.1.5 CD49d

Der Oberflächenrezeptor CD49d ist auf unstimulierten eosinophilen Granulozyten nachweisbar. IL-3, IFN- $\gamma$  oder IL-5 haben keinen statistischen Einfluß auf die Expression, wobei bei Stimulation mit IFN- $\gamma$  ein Anstieg der CD49d Expression zu erkennen ist.



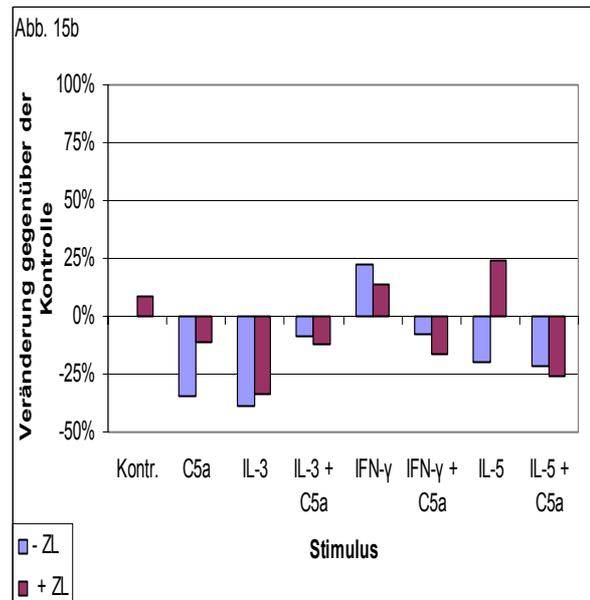
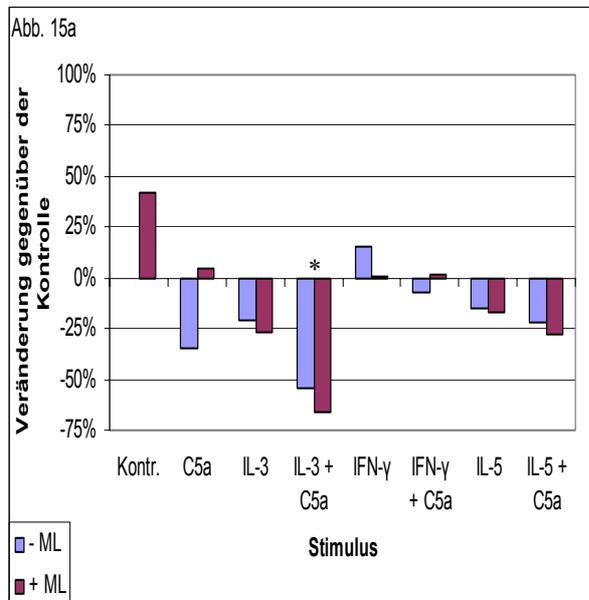
**Abbildung 14:** Oberflächenexpression von CD49d. Stimulation mit IL-3, IFN- $\gamma$  IL-5 (14a; n=5) und C5a (14b; n=8). Inkubation über 24h.

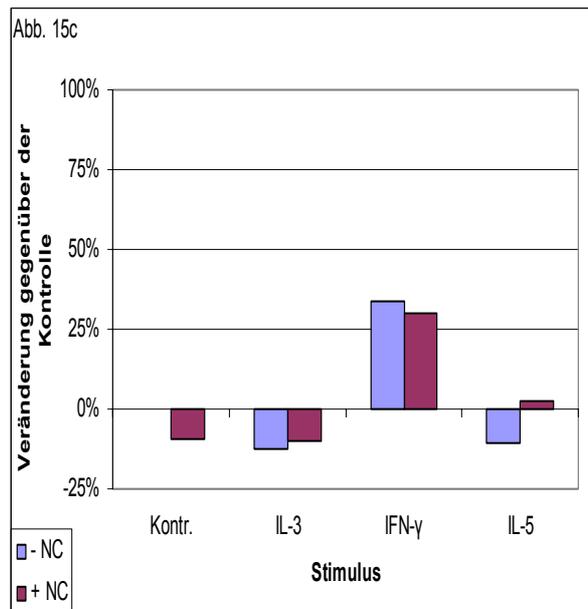
ML fördert die CD49d-Expression um 42 %, während C5a die Expression um 34 % reduziert. Die C5a induzierte Reduktion der CD49d Expression kann durch ML ausgeglichen werden.

Bei Kombination von C5a und ML steigt die CD49d Expression im Vergleich zur alleinigen C5a Stimulation um 40 % an. In Kombination von IL-3 mit C5a und ML, fällt die Dichte von CD49d um 12 % im Vergleich zur Stimulation ohne den Leukotrien-Rezeptorantagonisten ( $p < 0,05$ ) (Abb. 14b, 15a).

Auch bei Inkubation mit ZL wird die Hochregulation von CD49d ersichtlich. Wie ML kann ZL den Effekt von C5a auf die Expression von CD32 abschwächen. (Abb. 15b). Die Kombination von ZL mit den Zytokinen IFN- $\gamma$  und IL-5 bewirken keine Veränderung der Expression.

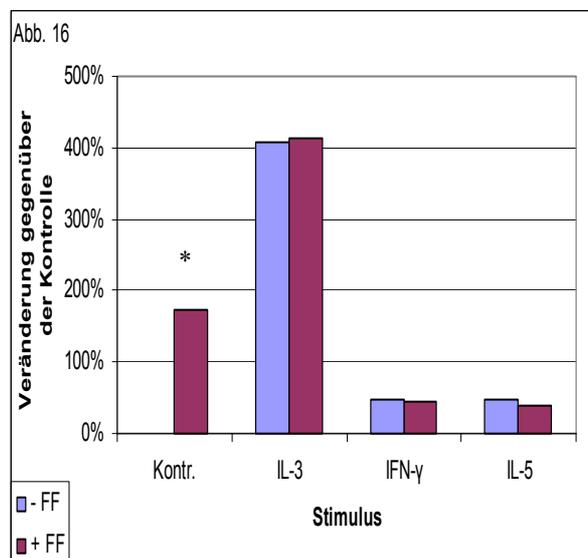
NC alleine zeigt keinen Effekt auf die Expression von CD49d. C5a, IL-3 und IL-5 führen bei Inkubation mit NC zu keiner weiteren Veränderung in der Expression des Oberflächenmarkers (Abb. 15c).





**Abbildung 15:** *Oberflächenexpression von CD49d. Stimulation mit Montelukast (15a; n=8), Zafirlukast (15b; n=7), Nedocromil (15c; n=5) in Kombination mit IL-3, IFN- $\gamma$ , IL-5 und C5a. Inkubation über 24h.*

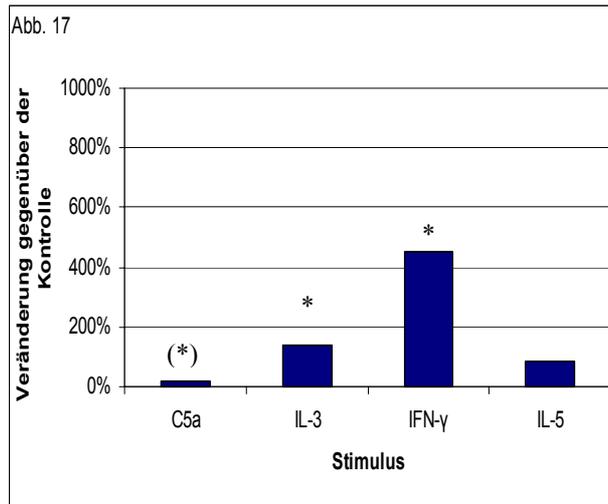
Werden die Zellen mit FF inkubiert, lässt sich erkennen, dass FF die Expression von CD49d um 174 % erhöht ( $p < 0,05$ ). FF in Kombination mit C5a, IL-3, IFN- $\gamma$  und IL-5 zeigt keinen signifikanten Unterschied (Abb. 16a).



**Abbildung. 16:** *Oberflächenexpression von CD49d. Stimulation mit Fexofenadin (n=5) in Kombination mit IL-3, IFN- $\gamma$ , IL-5 und C5a. Inkubation über 24h.*

#### 4.1.6 CD54

CD54 wird durch IL-3 und IFN- $\gamma$  signifikant hochreguliert, wobei die Dichte des Oberflächenantigens bei IL-3 um 140 % und bei IFN- $\gamma$  um 450 % ansteigt. IL-5 bewirkt keine Veränderung der Expression von CD54. C5a vermag die Expression von CD54 tendentiell zu erhöhen ( $p < 0,1$ ) (Abb. 17).

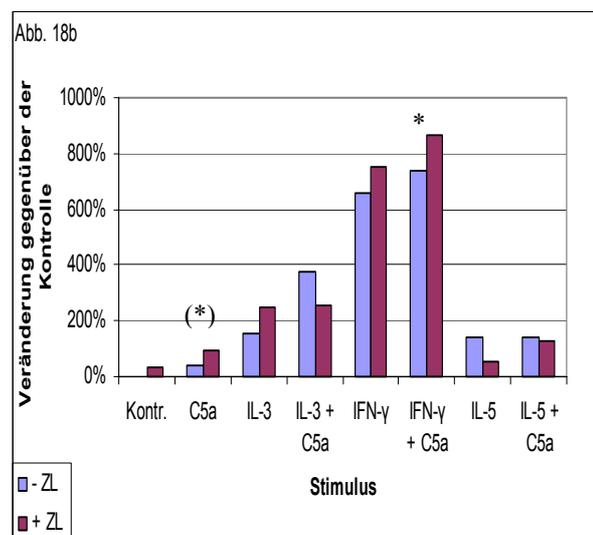
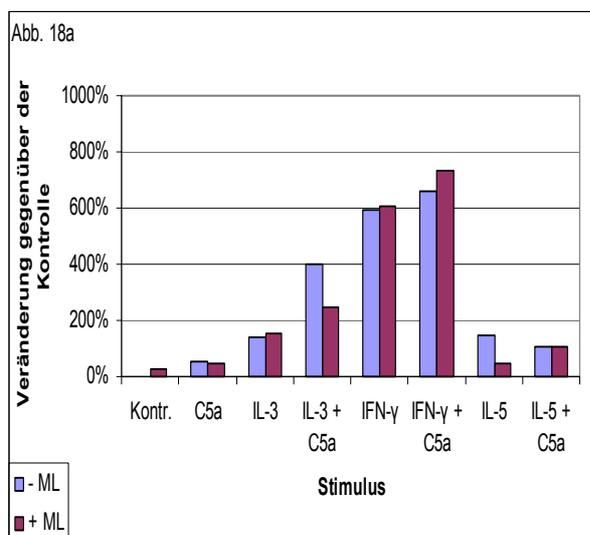


**Abbildung 17:** Oberflächenexpression von CD54. Stimulation mit IL-3, IFN- $\gamma$ , IL-5 und C5a (n=6). Inkubation über 24h.

ML hat keine Auswirkungen auf die Expression von CD54, sowohl bei unstimulierten, als auch bei durch Zytokine oder C5a stimulierten Eosinophilen. Trotz scheinbarer abschwächenden Tendenz von ML auf die Expression des CD54 Antigens bei Kostimulation sowohl mit IL-3 und C5a als auch mit IL-5, ist der Unterschied nicht signifikant (Abb. 18a).

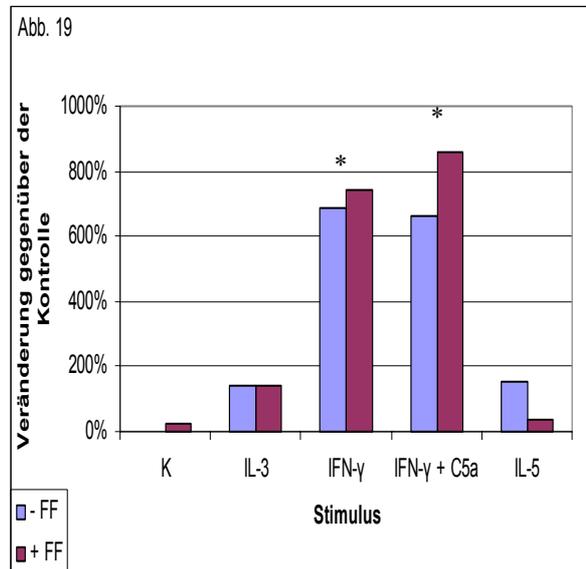
ZL mit und ohne Chemokine zeigt ebenfalls keinen Effekt auf die Expression von CD54. ZL bewirkt in Kostimulation mit C5a im Vergleich zur alleinigen C5a-Inkubation einen grenzwertig signifikanten Anstieg der CD54 Expression um 38 %.

In Kombination mit IFN- $\gamma$  und C5a erhöht ZL die ICAM-1 Expression um 15 %, im Vergleich zur Stimulation ohne ZL ( $p < 0,05$ ). Wie auch ML zeigt ZL einen nicht signifikanten abschwächenden Effekt auf die Expression des CD54 Antigens bei Kostimulation mit IL-3 und C5a, sowie mit IL-5 (Abb.18b).



**Abbildung 18:** Oberflächenexpression von CD54. Stimulation mit Montelukast (18a; n=6) und Zafirlukast (18b; n=6) in Kombination mit IL-3, IFN- $\gamma$ , IL-5 und C5a. Inkubation über 24h.

FF alleine, mit IL-3 und IL-5 zeigen keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle. Bei Kombination von FF mit IFN- $\gamma$  steigt die Expression um 55 % ( $p < 0,05$ ). Bei Inkubation der Zellen zusätzlich mit C5a, steigt die Expression von CD54 um 195 % ( $p < 0,05$ ) (Abb.19).

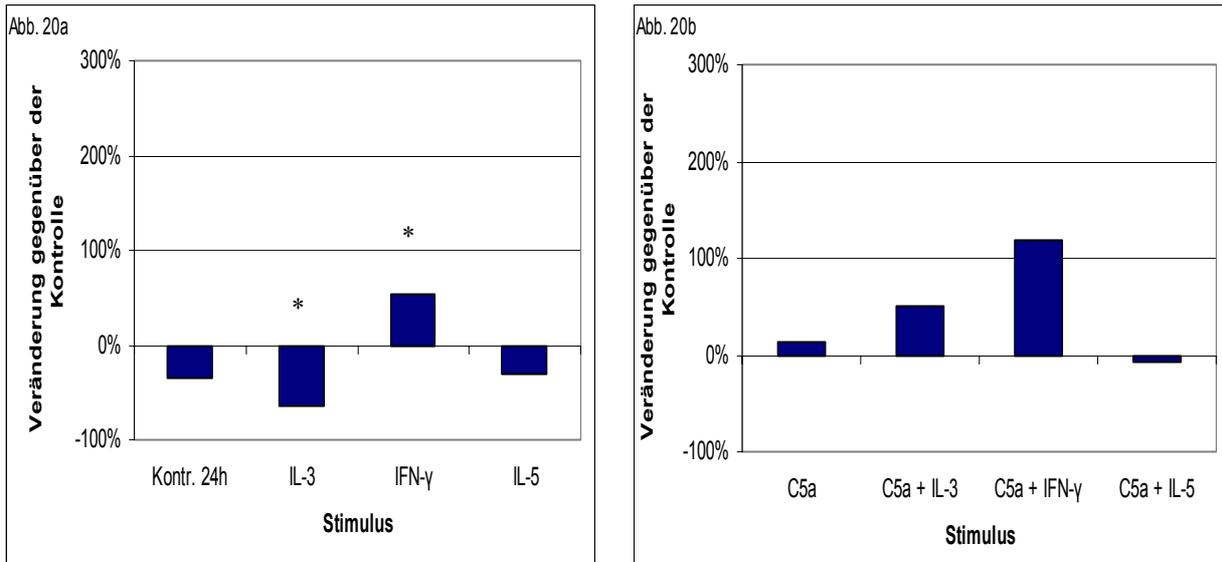


**Abbildung 19:** Oberflächenexpression von CD54. Stimulation mit Fexofenadin in Kombination mit IL-3, IFN- $\gamma$ , IL-5 und C5a ( $n=6$ ). Inkubation über 24h.

NC hat sowohl alleine und in Kombination mit IL-3, IFN- $\gamma$  und IL-5 keinen Einfluß auf die Expression von CD54.

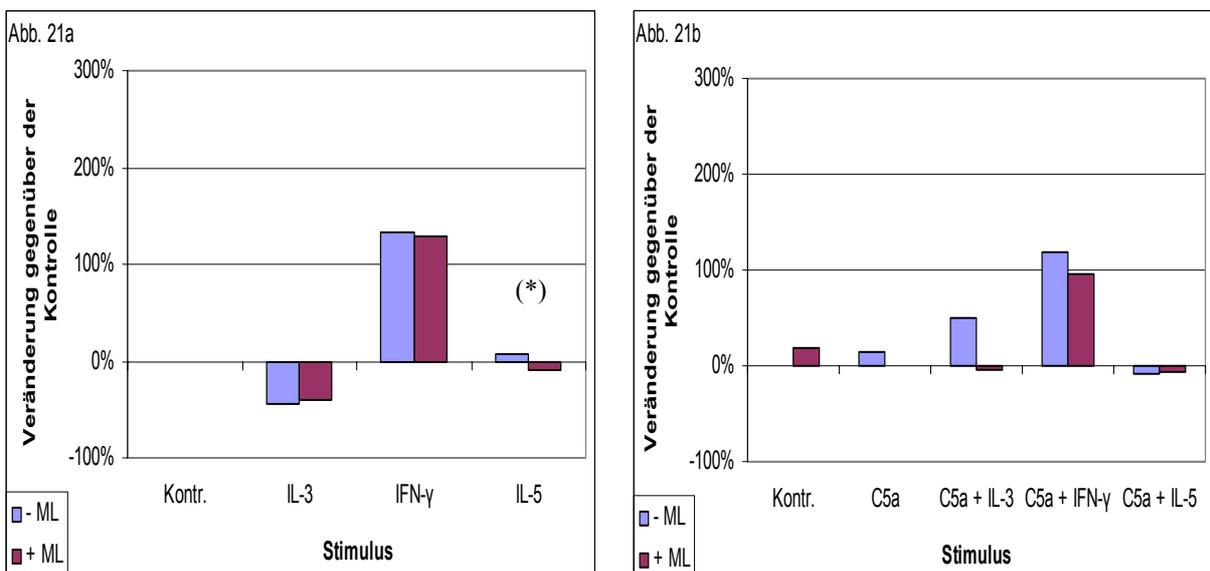
#### 4.1.7 CD62L

Der Oberflächenantigen CD62L (L-Selektin) kann auf naiven eosinophilen Granulozyten mit einer Fluoreszenz von 5,98 SMF nachgewiesen werden. Nach 24h Inkubation in Medium vermindert sich die Expression von L-Selektin ohne weiteren Stimulus auf eine durchschnittliche Dichte von 2,93 SMF, das einer Reduktion von 34 % gegenüber der 0h-Kontrolle entspricht. In Gegenwart von IL-3 wird die Reduktion der Expression von L-Selektin beschleunigt und parallel dazu die Dichte von CD62L signifikant um 63 % vermindert ( $p < 0,01$ ). Im Gegensatz dazu erhöht sich die Expression durch Stimulation mit IFN- $\gamma$  um 53 % verglichen mit der 24 h Kontrolle ( $p < 0,01$ ) (Abb. 20a). IL-5 und C5a beeinflussen die Expression von CD62L nicht (Abb. 20b).



**Abbildung 20:** Oberflächenexpression von CD62L. Stimulation mit IL-3, IFN- $\gamma$ , IL-5 (20a; n=11) und C5a (20b; n=6) Inkubation über 24h.

ML bewirkt außer einer tendentiellen Abnahme der Expression bei Kombination mit IL-5 ( $p < 0,1$ ) keine statistischen Veränderungen mit den Stimuli IL-3, IL-5, IFN- $\gamma$  und C5a (Abb. 21a,b).

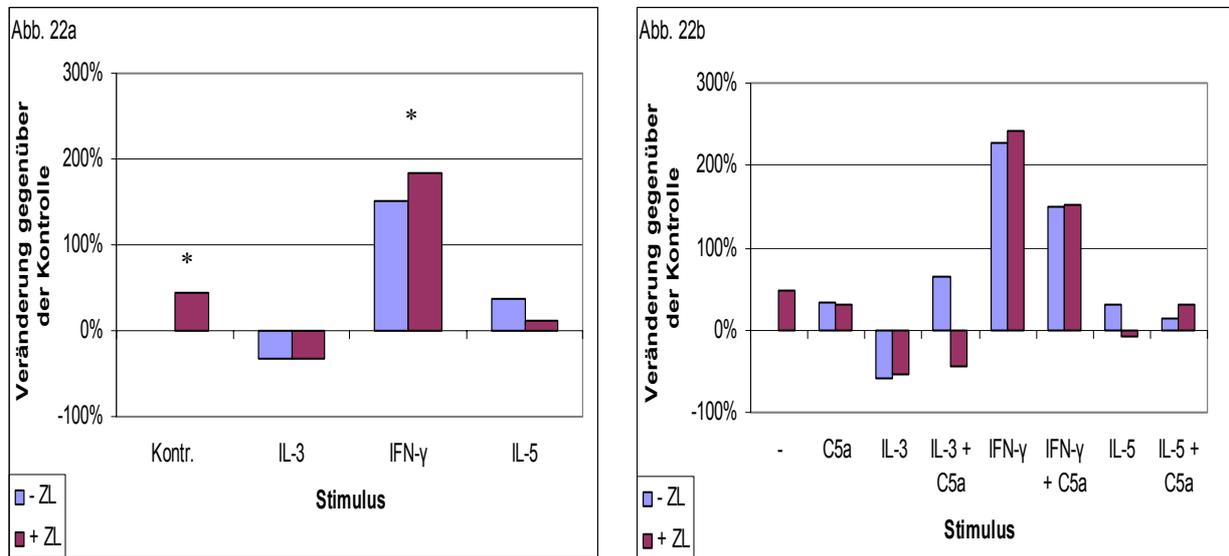


**Abbildung 21:** Oberflächenexpression von CD62L. Stimulation mit Montelukast in Kombination mit IL-3, IFN- $\gamma$  und IL-5 (21a; n=11), sowie in Kombination mit C5a (21b; n=6). Inkubation über 24h.

ZL wirkt der Herunterregulation des Rezeptors signifikant entgegen und erhöht somit die Dichte des Oberflächenmarkers um 45% im Vergleich zu den unstimulierten Zellen ( $p < 0,05$ ). Unter Stimulation mit C5a bleibt dieser Effekt aus und die Werte mit und ohne ZL unterscheiden sich nicht mehr. IFN- $\gamma$  mit ZL lassen eine weiter steigende Tendenz auf die Expression von CD62L erkennen ( $p < 0,1$ ). IL-3 und IL-5 mit ZL zeigen keine Unterschiede zu

den Ansätzen ohne ZL. Der starke Abfall bei Stimulation mit IL-3, C5a und weiterer ZL Gabe ist statistisch nicht signifikant. (Abb. 22a, 22b).

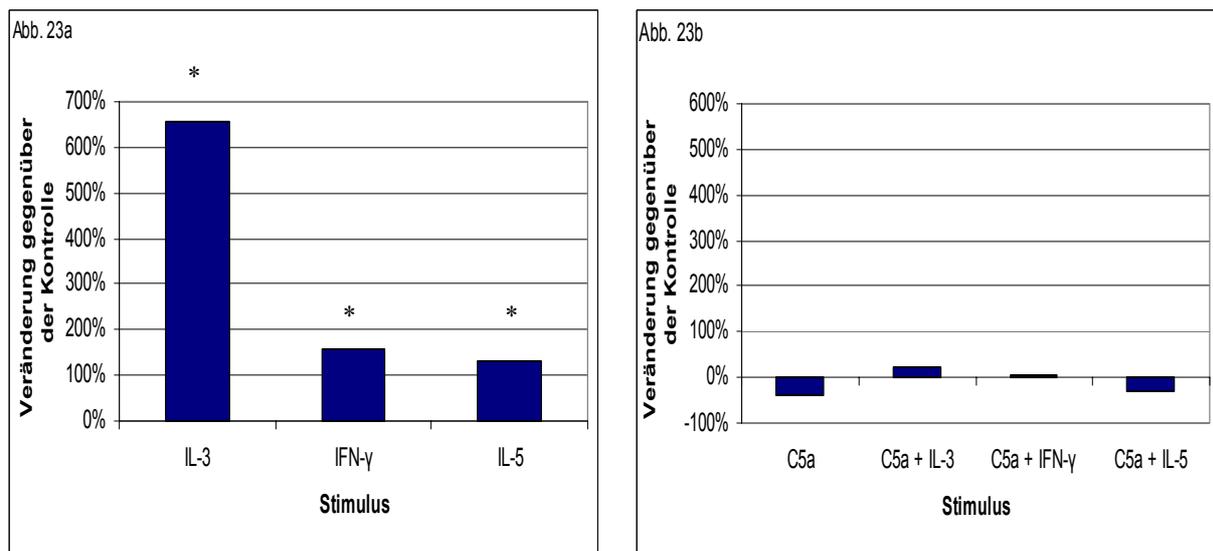
FF und NC zeigen alleine, sowie in Kombination mit C5a, IL-3, IFN- $\gamma$  und IL-5 keine Änderung in der CD62L Expression.



**Abbildung 22:** Oberflächenexpression von CD62L. Stimulation mit Zafirlukast (22a, 22b; n=11), in Kombination mit IL-3, IFN- $\gamma$ , IL-5 und C5a. Inkubation über 24h.

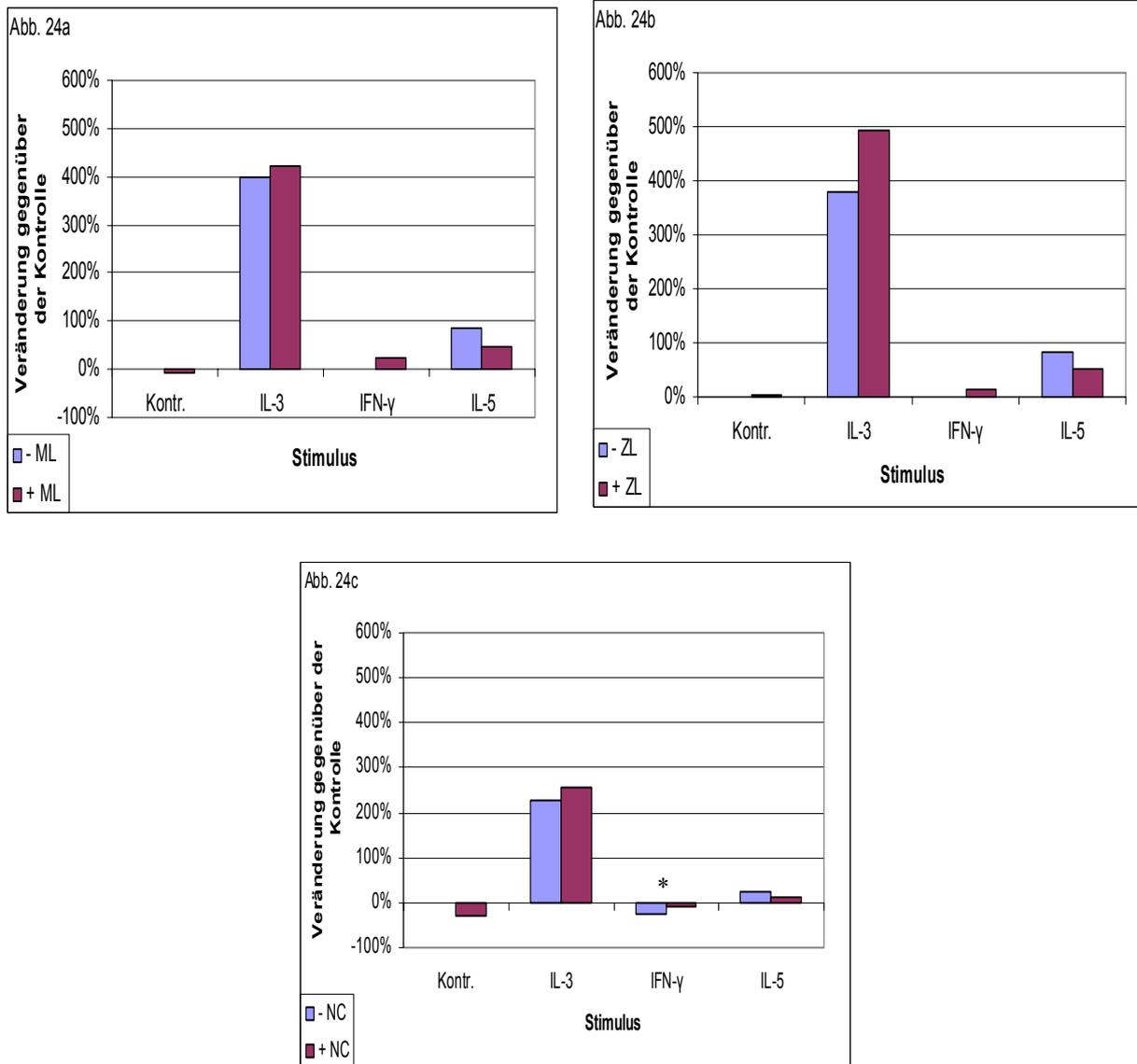
#### 4.1.8 CD69

CD69 wird auf den eosinophilen Granulozyten durch IL-3, IFN- $\gamma$  und IL-5 signifikant hochreguliert. IL-3 bewirkt eine 7,5-fach vermehrte Expression, IFN- $\gamma$  erhöht CD69 um das 2,6-fache und IL-5 um den Faktor 2,3 ( $p < 0,05$ ) (Abb. 23a). C5a hat keinen Effekt auf die Dichte des CD69 Antigens (Abb. 23b).



**Abbildung 23:** Oberflächenexpression von CD69. Stimulation mit IL-3, IFN- $\gamma$ , IL-5 (23a; n=5) und C5a (23b; n=5). Inkubation über 24h.

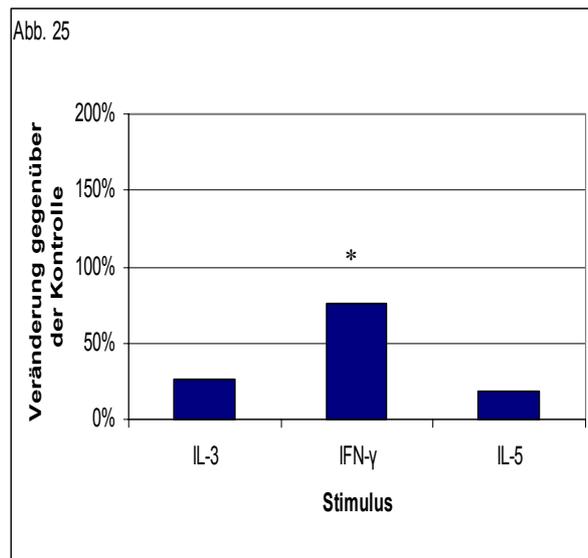
ML und ZL alleine haben keinen Einfluß auf die Expression von CD69. In Kombination mit C5a, IL-3, IFN- $\gamma$  und IL-5 führen die zwei Medikamente zu keinen abweichenden Ergebnissen (Abb. 24a, b). Auch FF beeinflusst weder mit noch ohne Zytokine die CD69 Expression. NC alleine und in Kombination mit IL-3, IL-5 und C5a zeigt keinen Einfluß auf die Expression von CD69. NC mit IFN- $\gamma$  erhöht die Expression des Oberflächenmarkers um 20% ( $p < 0,05$ ) (Abb. 24c).



**Abbildung 24:** Oberflächenexpression von CD69. Stimulation mit Montelukast (24a; n=5), Zafirlukast (24b; n=6), Nedocromil (24c; n=5) in Kombination mit IL-3, IFN- $\gamma$ , IL-5 und C5a. Inkubation über 24h.

#### 4.1.9 CD95

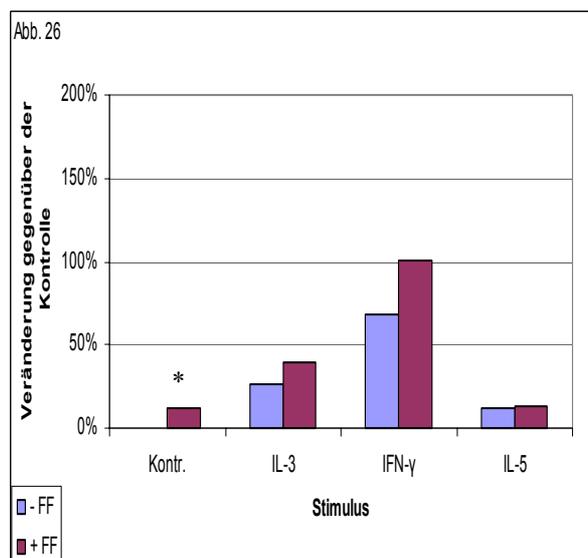
Der Oberflächenrezeptor CD95 wird von IFN- $\gamma$  um 76% hochreguliert ( $p < 0,01$ ), während die übrigen Zytokine keinen Einfluß auf die CD95 Expression haben. Sowohl die Kostimulation mit C5a, als auch mit LTC<sub>4</sub> hat keinen weiteren Einfluß auf die Expression von CD95 (Abb. 25).



**Abbildung 25:** Oberflächenexpression von CD95. Stimulation mit IL-3, IFN- $\gamma$ , IL-5 ( $n=5$ ). Inkubation über 24h.

ML, ZL und NC zeigen keinen Effekt auf die Expression des CD95-Antigens auf eosinophilen Granulozyten.

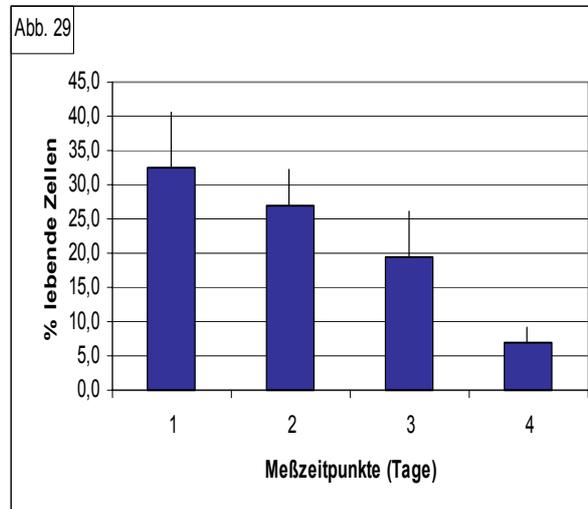
In Gegenwart von FF nimmt die Expression von CD95 um 26% zu ( $p < 0,05$ ), zeigt aber in Kombination mit IL-3, IFN- $\gamma$  und IL-5 keine weiteren Effekte (Abb. 26).



**Abbildung 26:** Oberflächenexpression von CD95. Stimulation mit Fexofenadin (26;  $n=9$ ) in Kombination mit IL-3, IFN- $\gamma$ , IL-5 und C5a. Inkubation über 24h.

## 4.2 Modulation der Viabilität des eosinophilen Granulozyten

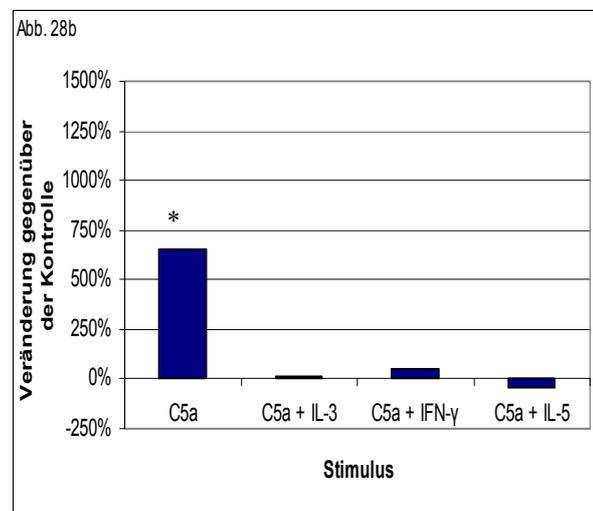
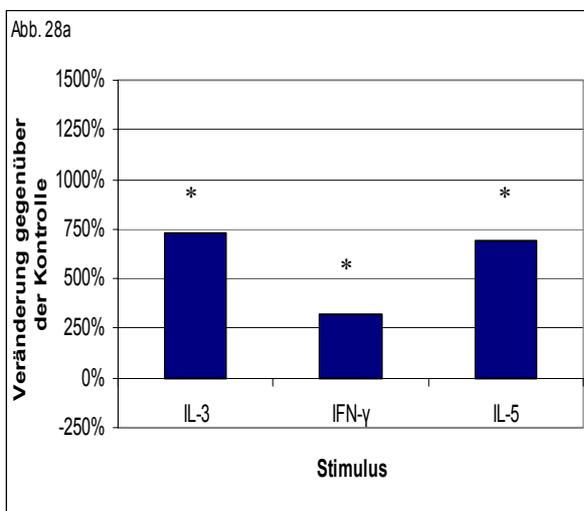
Die Viabilität unstimulierter Eosinophiler beträgt nach einem Tag Inkubation noch 33 %, nach zwei Tagen 27 %, am dritten Tag noch 19 % und am vierten Tag 3 % (Abb. 27).



**Abbildung 27:** Überlebenskurve naiver eosinophiler Granulozyten über einen Zeitraum von einem bis vier Tagen.

Der Einfluß der verschiedenen Stimuli auf die Anzahl der lebendigen Zellen wurde am vierten Tag gemessen, da hier der Großteil der eosinophilen Granulozyten schon avital war und so ein Effekt der Modulatoren auf die Zellen am besten zu beurteilen war.

IL-3 erhöht den Anteil der lebenden Zellen am vierten Tag um das 8,3-fache ( $p < 0,01$ ). IFN- $\gamma$  schafft es, die Viabilität der Eosinophilen um den Faktor 4,2 zu erhöhen ( $p < 0,01$ ) und IL-5 um das 7,9 fache ( $p < 0,01$ ) (Abb. 28a). C5a alleine erhöht die Anzahl der lebenden Zellen um den Faktor 7,5 ( $p < 0,05$ ). Die Kombination von C5a mit den Zytokinen zeigt ebenfalls einen überlebenssteigernden Effekt, der sich allerdings nicht statistisch von den Versuchen ohne C5a unterschied (Abb. 28b). LTC<sub>4</sub> hat keine Auswirkung auf die Viabilität der Zellen.



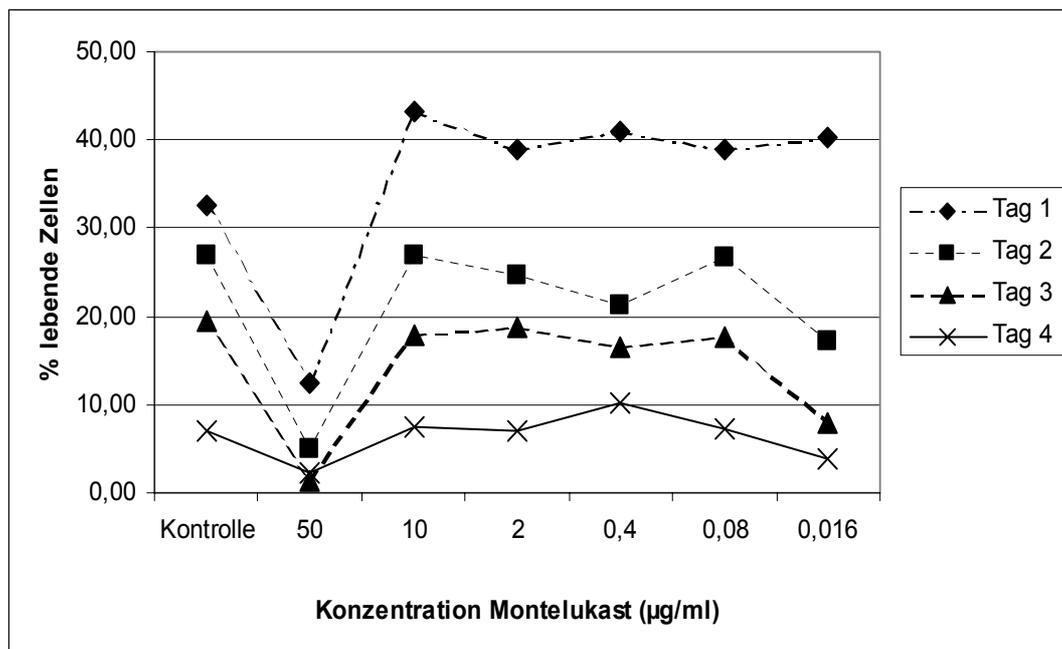
**Abbildung 28:** Viabilität eosinophiler Granulozyten. Stimulation mit IL-3, IFN- $\gamma$  und IL-5 (28a;  $n=11$ ), sowie C5a (28b;  $n=6$ ). Inkubation über 24h.

Um die Konzentration von ML zu bestimmen, die das Überleben der Eosinophilen am meisten beeinflusst, wurde eine Konzentrationsreihe erstellt und am ersten bis vierten Tag die Propidiumjodid-negativen Zellen gemessen. Unstimulierte Eosinophile leben nach einem Tag Inkubation noch zu ca. 33 %. ML in einer Konzentration von 50 ng/ml senkt das Überleben der Zellen am ersten Tag deutlich auf 13 % lebende Zellen ( $p < 0,05$ ). In niedrigeren (0,16 – 10  $\mu\text{g/ml}$ ) zeigt sich eine leichte Steigerung des Anteils viabler Zellen. (Abb. 29, Tag 1).

Am zweiten Tag liegt die Zahl unbehandelter viabler Zellen bei 25 %. Bei der Konzentration von 50 ng/ml ist wiederum ein signifikanter Abfall zu beobachten ( $p < 0,05$ ). Die anderen Konzentrationen zeigen keinen Einfluß auf das Überleben der Zellen (Abb. 29, Tag 2).

Die Anzahl der lebenden Zellen beträgt am dritten Tag ca. 20 %. ML in einer Konzentration von 50 ng/ml fällt weiterhin durch eine signifikant niedrigere Viabilität ab. Die anderen Konzentrationen zeigen keinen signifikanten Unterschied zu der Kontrolle (Abb. 29, Tag 3).

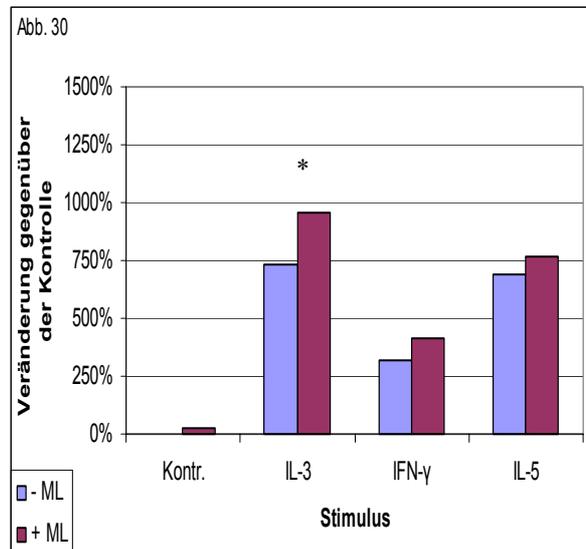
Am vierten Tag ist die Anzahl der noch lebenden Zellen auf ca. 7% gefallen. Ein Effekt von ML in niedriger Konzentration lässt sich nicht beobachten (Abb. 29, Tag 4).



**Abbildung 29:** Viabilität eosinophiler Granulozyten. Stimulation mit Montelukast in verschiedenen Konzentrationen ( $n=6$ ). Inkubation über einen Zeitraum von 24h bis 96h.

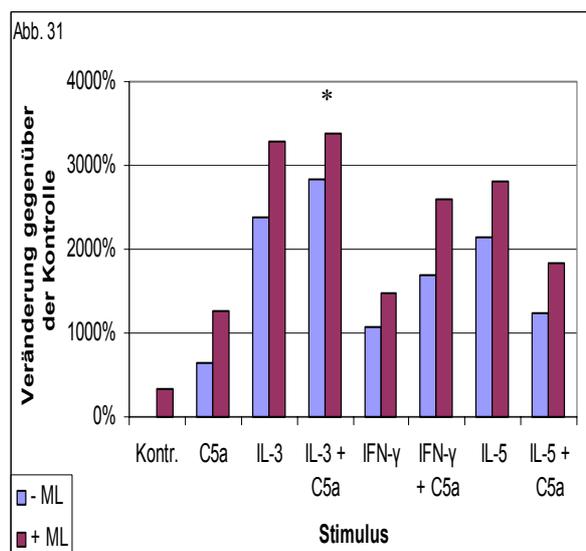
Aufgrund dieser Konzentrationsreihen wurde nun eine Konzentration für ML ausgewählt (0,08  $\mu\text{g/ml}$ ), die für den Rest der Versuche als Standardkonzentration dienen soll. Durchschnittlich überleben ca. 3 % der Zellen die 4 Tage Inkubation. Wie bereits in den Konzentrationsreihen deutlich wird, hat ML alleine keine überlebenssteigernde Wirkung auf die Zellen bei einer Konzentration von 0,08  $\mu\text{g/ml}$ . IL-3 bewirkt einen starken Anstieg ( $p < 0,01$ ) der lebendigen Zellen auf 28 %. In Gegenwart von ML, lässt sich ein weiterer

signifikanter Anstieg ( $p < 0,05$ ) um 27 % auf einen durchschnittlichen Anteil von 36 % lebenden Zellen erkennen. ML sorgt in beiden Fällen für keinen weiteren Anstieg oder Abfall der Viabilität (Abb. 30).



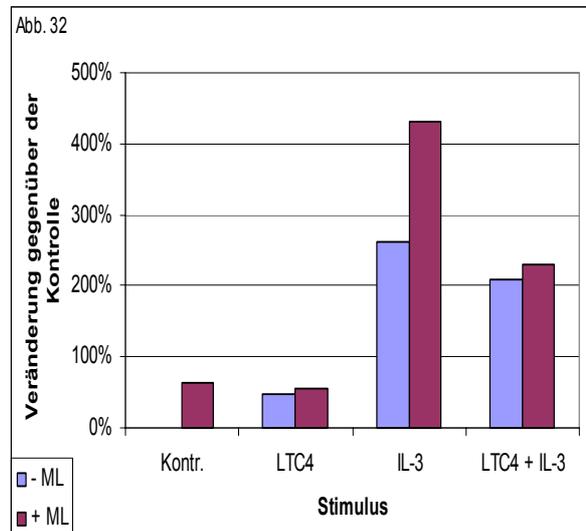
**Abbildung 30:** Viabilität eosinophiler Granulozyten. Stimulation mit IL-3, IFN- $\gamma$ , IL-5 und Montelukast ( $n=11$ ). Inkubation über 4 Tage.

C5a erhöht die Rate der lebenden Zellen nach 4 Tagen Inkubation signifikant ( $p < 0,05$ ). ML bewirkt zusammen mit C5a keine statistische Veränderung. Bei alleiniger Stimulation mit dem LTRA lässt sich zwar ein Anstieg der Viabilität erkennen, der jedoch nicht signifikant ist. ML führt in Kombination mit IL-3 und C5a zu einer 1,2-fachen Steigerung des Überlebens im Vergleich zur Kontrolle ohne ML ( $p < 0,05$ ). Bei Kostimulation mit IFN- $\gamma$  und IL-5 zeigt C5a mit und ohne ML keine signifikante Veränderung bezüglich der Überlebensrate (Abb. 31).



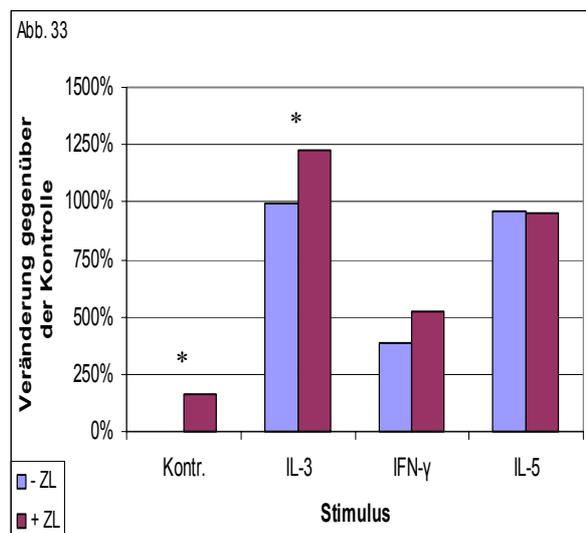
**Abbildung 31:** Viabilität eosinophiler Granulozyten. Stimulation mit C5a in Kombination mit IL-3, IFN- $\gamma$ , IL-5 und Montelukast ( $n=6$ ). Inkubation über 4 Tage.

LTC<sub>4</sub> erhöht das Überleben der Eosinophilen alleine um 50% im Vergleich zur Kontrolle. In Kombination mit IL-3 wurde die viabilitätssteigernde Wirkung von ML durch LTC<sub>4</sub> aufgehoben (Abb. 32).



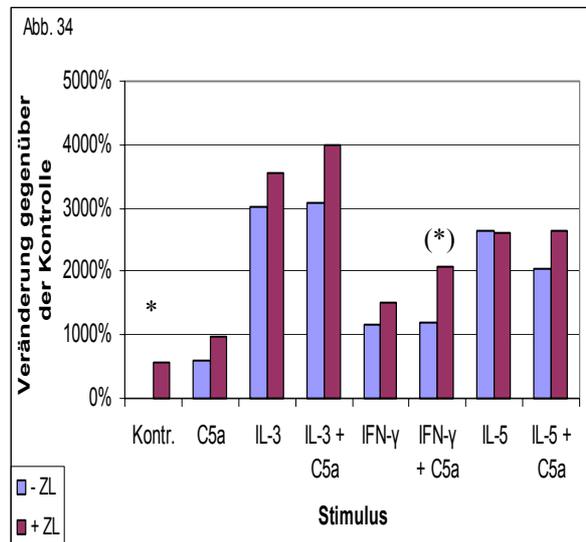
**Abbildung 32:** Viabilität eosinophiler Granulozyten. Stimulation mit LTC<sub>4</sub> in Kombination mit IL-3, IFN- $\gamma$ , IL-5 und Montelukast (n=5). Inkubation über 4 Tage.

In Gegenwart von ZL kommt es zu einem signifikanten Anstieg der lebenden Zellen (n=12) um 160 % nach 4 Tagen ( $p < 0,05$ ). IL-3 wirkt auch hier höchst signifikant viabilitätssteigernd ( $p < 0,01$ ) und erhöht die Zahl der lebenden Zellen um das 11 fache. Die Kombination mit ZL zeigt einen weiteren signifikanten Anstieg der lebenden Eosinophilen um 230 % ( $p < 0,05$ ). IFN- $\gamma$  und IL-5 erhöhen die Zahl der lebenden Zellen, wobei beide Zytokine damit einen höchst signifikanten Unterschied zu den unstimulierten Zellen beweisen ( $p < 0,01$ ). ZL nimmt wie ML in Kombination mit IFN- $\gamma$  und IL-5 keinen signifikanten Einfluß auf das Überleben der Eosinophilen (Abb. 33).



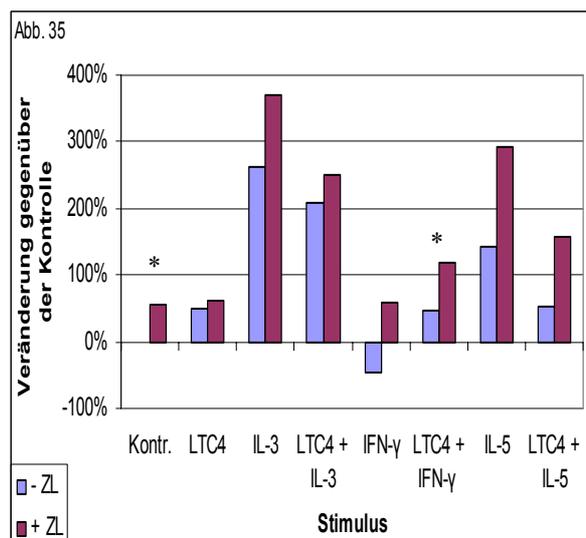
**Abbildung 33:** Viabilität eosinophiler Granulozyten. Stimulation mit IL-3, IFN- $\gamma$ , IL-5 und Zafirlukast (n=12). Inkubation über 4 Tage.

In Gegenwart von C5a wird der viabilitätsfördernde Effekt von ZL ( $p < 0,05$ ) durch C5a aufgehoben. Die Kombination von C5a mit IL-3 und IL-5 verändert ZL das Überleben nicht. Eine Inkubation der Zellen mit IFN- $\gamma$  und C5a zeigt bei Zugabe von ZL einen tendentiell steigenden Effekt dieser Substanz auf die Zahl der lebenden Zellen ( $p < 0,1$ ) (Abb. 34).



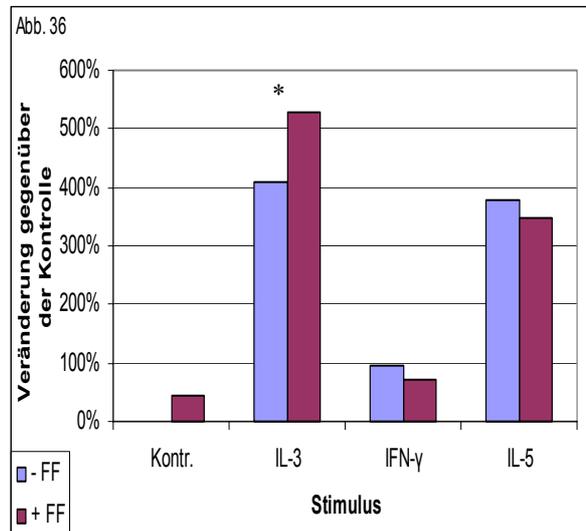
**Abbildung 34:** Viabilität eosinophiler Granulozyten. Stimulation mit C5a in Kombination mit Zafirlukast und IL-3, IFN- $\gamma$  und IL-5 ( $n=7$ ). Inkubation über 4 Tage.

In Gegenwart von LTC<sub>4</sub> wird die viabilitätserhöhende Wirkung von ZL ( $p < 0,1$ ) aufgehoben. Die beiden Werte gleichen sich durch die Wirkung von LTC<sub>4</sub> an. Darüber hinaus erhöht LTC<sub>4</sub> in Kombination mit IFN- $\gamma$  und ZL signifikant das Überleben des Eosinophilen (Abb. 35).



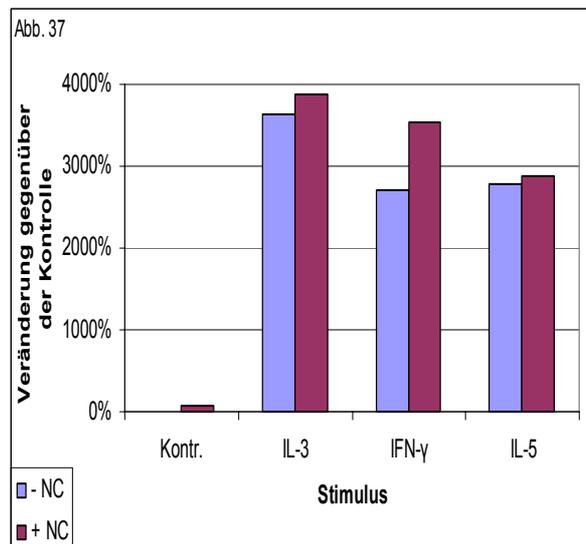
**Abbildung 35:** Viabilität eosinophiler Granulozyten. Stimulation mit LTC<sub>4</sub> in Kombination mit Zafirlukast und IL-3, IFN- $\gamma$  und IL-5 ( $n=6$ ). Inkubation über 4 Tage.

FF erhöht mit IL-3 den Prozentsatz der lebenden Zellen um weitere 100 % ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu den Zellen ohne FF Stimulation. Mit C5a, IL-5 oder IFN- $\gamma$  hat es keine Auswirkung auf die Viabilität eosinophiler Granulozyten (Abb. 36).



**Abbildung 36:** Viabilität eosinophiler Granulozyten. Stimulation mit Fexofenadin in Kombination mit IL-3, IFN- $\gamma$ , IL-5 ( $n=5$ ). Inkubation über 4 Tage.

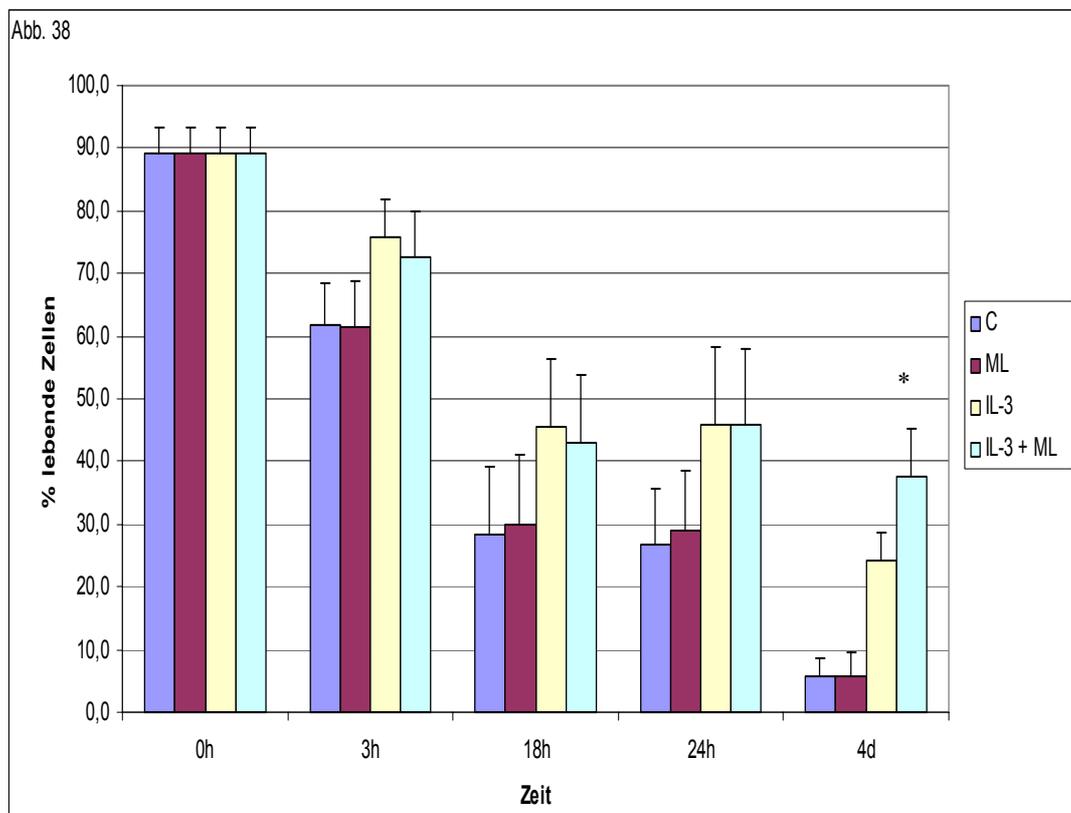
Nedocromil verändert weder alleine, noch in Kombination mit den Zytokinen und C5a die Viabilität der Zellen. Mit IL-5 hat es eine tendentielle viabilitätssteigernde Wirkung ( $p < 0,1$ ) (Abb. 37).



**Abbildung 37:** Viabilität eosinophiler Granulozyten. Stimulation mit Nedocromil in Kombination mit IL-3, IFN- $\gamma$ , IL-5 ( $n=5$ ). Inkubation über 4 Tage.

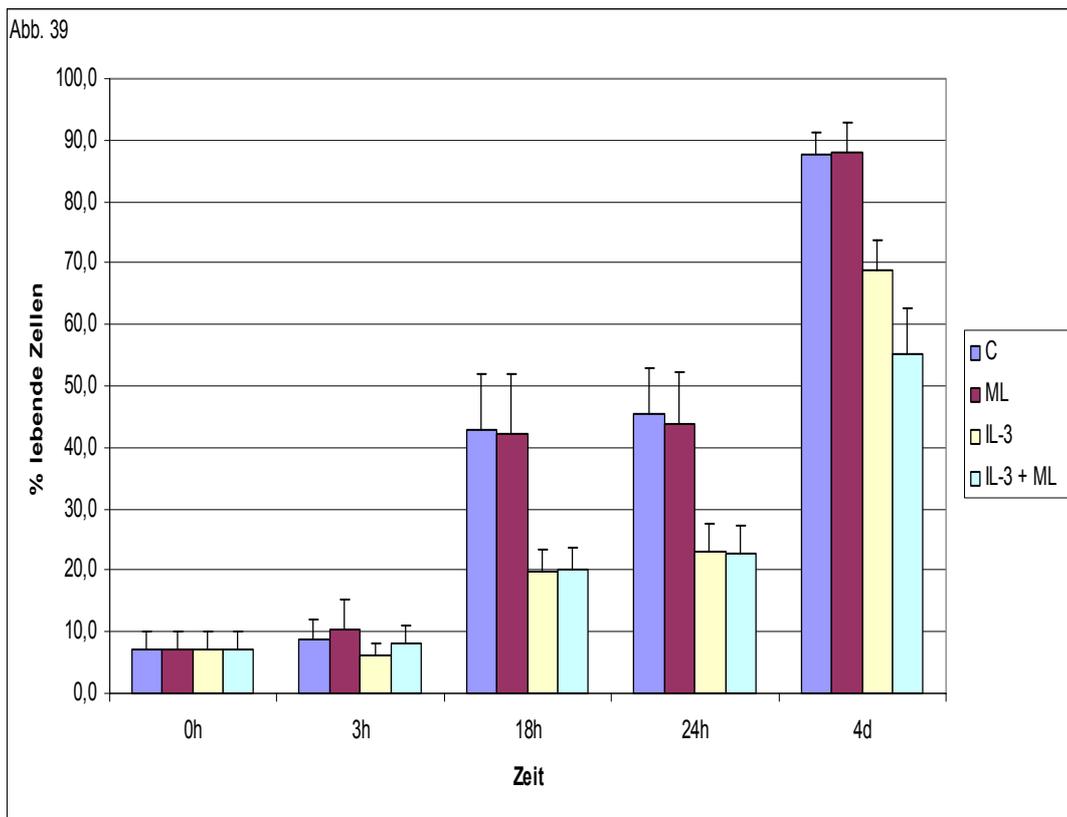
### 4.2.1 Modulation der Apoptose durch Montelukast

Dieses Kapitel beruht auf den obigen Ergebnissen. Dort wurde gezeigt, dass eosinophile Granulozyten durch Zytokine und Medikamente in ihrer Überlebenszeit beeinflussbar sind. Nun soll im Speziellen auf das Zytokin IL-3 und die Substanz Montelukast eingegangen werden. Es sollte untersucht werden, ob die veränderte Überlebenszeit auf Apoptose zurückzuführen ist. Zuerst werden die Zellen betrachtet, die Propidiumjodid negativ und zugleich Annexin V negativ sind. Dabei handelt es sich um viable Eosinophile, die noch nicht in Apoptose gegangen sind. Der Anteil lebender Zellen reduziert sich von 89 % zum Zeitpunkt 0 auf 6 % nach vier Tagen. Bei einer Stimulation mit IL-3 über 3 h zeigt sich eine Verlangsamung dieses Prozesses mit einem um 15 % höheren Anteil viabler Zellen. Nach vier Tagen ist der Unterschied zwischen mit IL-3 exponierten (24 %) und unstimulierten Zellen (6 %) am deutlichsten. ML in Gegenwart von IL-3 erhöht die Viabilität eosinophiler Granulozyten am vierten Tag und vergrößert den Anteil viabler Zellen auf 37 %, was dem 6,4-fachen Wert der unstimulierten Zellen entspricht, sowie dem 1,4-fachen Wert der mit IL-3 stimulierten Zellen ( $p < 0.05$ ). ML alleine besitzt keinen Einfluß auf das Überleben der Zellen (Abb. 38).



**Abbildung 38:** *Modulation der Apoptose durch Montelukast. Darstellung von Propidiumjodid und Annexin V negativen eosinophilen Granulozyten bei unterschiedlicher Stimulation zu verschiedenen Zeitpunkten (n=5).*

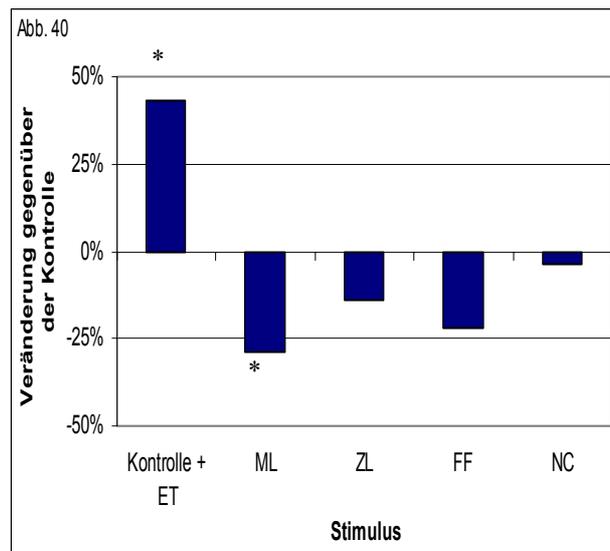
In einem zweiten Ansatz wird die Variabilität der eosinophilen Granulozyten mittels Annexin-V Färbung analysiert. Hierbei handelt es sich um einen Ansatz, bei dem apoptotische Zellen durchflußzytometrisch dargestellt werden können (Material & Methoden). Naive eosinophile Granulozyten weisen einen Anteil von 7,5 % Annexin positiver Zellen auf, der sich am vierten Tag auf 87 % erhöht. IL-3 reduziert den Anteil der apoptotischen Zellen um 21 %, am vierten Tag auf 69 %. Die zusätzliche Exposition mit ML führt zu einer weiteren 37 %igen Reduktion des Anteils Annexin-V positiver Zellen. ML alleine hat keinen Effekt auf die Apoptose der eosinophilen Granulozyten (Abb. 39).



**Abbildung 39:** *Modulation der Apoptose durch Montelukast. Darstellung der Annexin V und Propidiumjodid positiven Eosinophilen bei unterschiedlicher Stimulation zu verschiedenen Zeitpunkten (n=5).*

### **4.3 Modulation der Transmigration eosinophiler Granulozyten**

In einem weiteren experimentellen Ansatz wird die funktionelle Variabilität eosinophiler Granulozyten anhand der Transmigration durch endotheliale Zellen untersucht. Naive, unbehandelte Zellen migrieren spontan durch IL-1 aktivierte HUVECs ( $11,8 \times 10^3$  Zellen). Nach Zugabe von Eotaxin (ET) in die untere Kammer migrieren  $16,89 \times 10^3$  Zellen durch die HUVEC-Schicht (Abb. 40). Verglichen mit der Kontrolle, entspricht das der Transmigrationsrate von 43 % ( $p < 0,05$ ). Werden die Zellen mit ML exponiert, wandern nur noch  $8,38 \times 10^3$  Eosinophile durch die HUVECs, was einer Inhibition der Transmigrationsrate um 28 % entspricht ( $p < 0,05$ ). Auch der zweite LTRA ZL reduziert entsprechend einer Inhibition von 14 % verglichen mit den unbehandelten Zellen die Zahl migrierender Zellen ( $10,2 \times 10^3$  Zellen). Schließlich reduziert auch FF die Transmigrationsrate ( $9,2 \times 10^3$  Zellen) um 21 %. Dagegen hat NC keinen Einfluß auf die Modulation. Für den Effekt von ZL, FF, NC errechnet sich keine statistische Signifikanz. (Abb. 40).

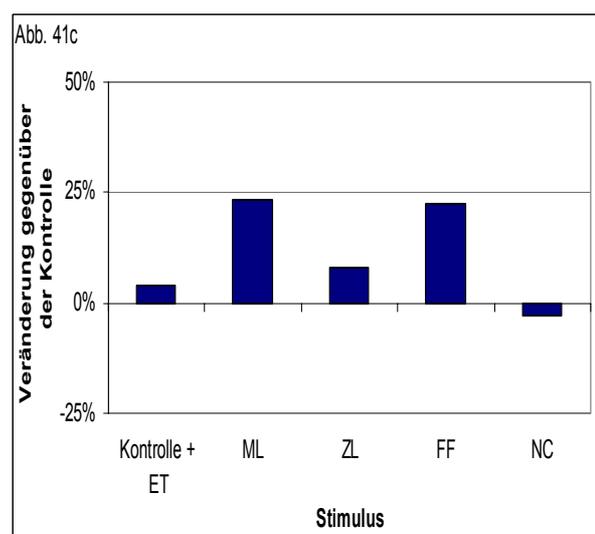
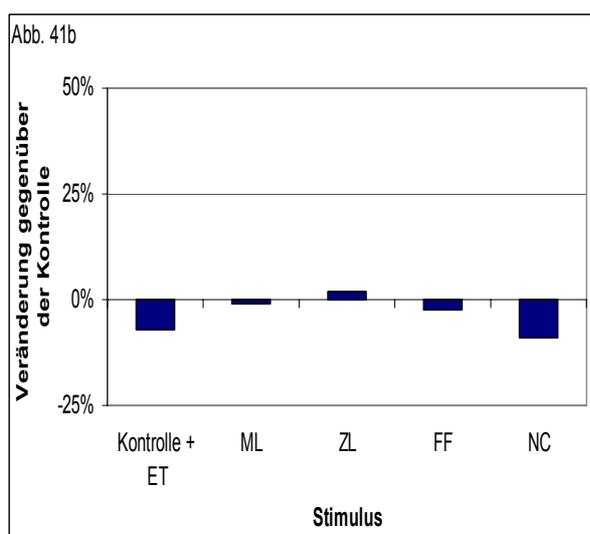
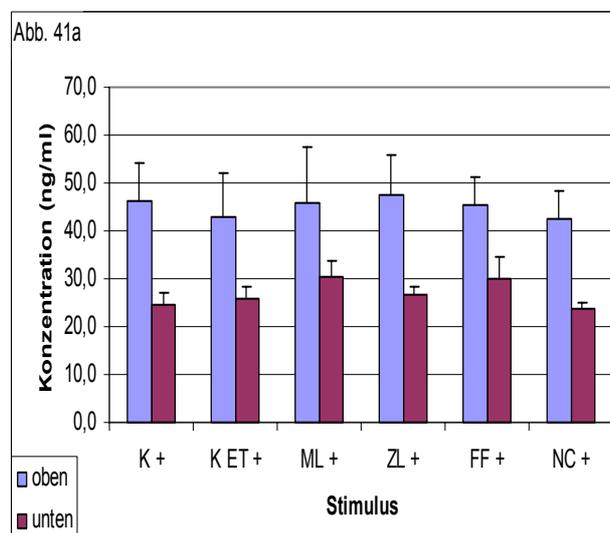


**Abbildung 40:** *Modulation der Transmigration des eosinophilen Granulozyten. Darstellung der Zahl der transmigrierten Eosinophilen unter dem Einfluß von Eotaxin, Montelukast, Zafirlukast, Fexofenadin und Nedocromil nach Inkubation mit IL-1 $\beta$  für 3h (n=5)*

#### **4.4 Sekretion von Metalloproteinase 9**

In einem weiteren Zugang wird die funktionelle Variabilität mittels der Sekretion von MMP-9 aus eosinophilen Granulozyten bestimmt. Die Metalloproteinasen sowohl der migrierten Zellen aus der unteren Kammer der Transwell Platten, als auch die der nicht-migrierten Zellen aus der oberen Kammer werden mit Hilfe der ELISA Technik bestimmt. Es ist ersichtlich, dass in der unteren Kammer 40% weniger MMP-9 nachweisbar ist, als in der oberen Kammer (Abb. 41a).

Die Inkubation mit ML, ZL, FF und NC zeigt keine statistische Auswirkung auf die Expression von MMP-9. ML und FF scheinen jedoch die Expression von MMP-9 mRNA in der unteren Kammer zu erhöhen (Abb. 41b,c).

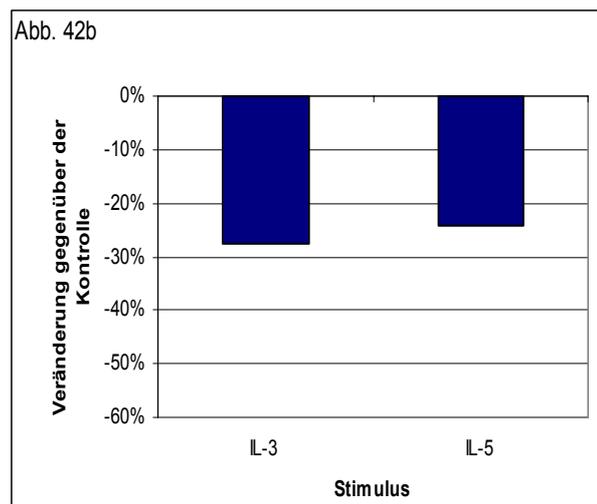
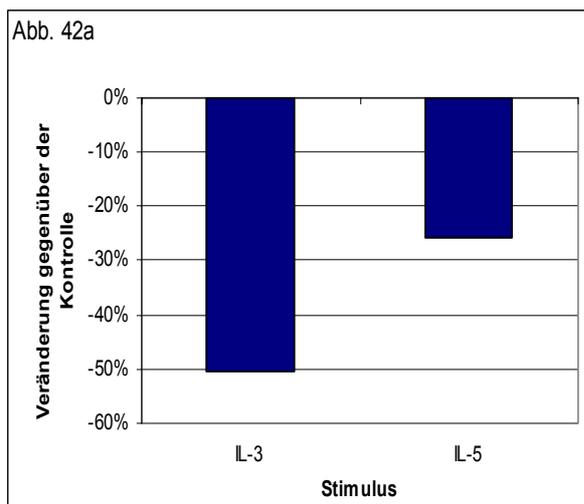


**Abbildung 41:** Sekretion von MMP-9 nach Transmigration. Gemeinsame Darstellung der beiden Kammern der Transwell Platten (41a; n=5) und Vergleich der Sekretion bei unterschiedlicher Stimulation in oberer (41b) und unterer (41c) Kammer.

## **4.5 Expression von Metalloproteinase-9**

Die Eosinophilen werden nach Isolation für 3h und 24h mit IL-3 und IL-5 inkubiert. Die Expression von MMP-9 wird in Bezug zur Expression des Haushaltsproteins GAPDH gesetzt, um den Einfluß unterschiedlicher RNA-Mengen auszugleichen.

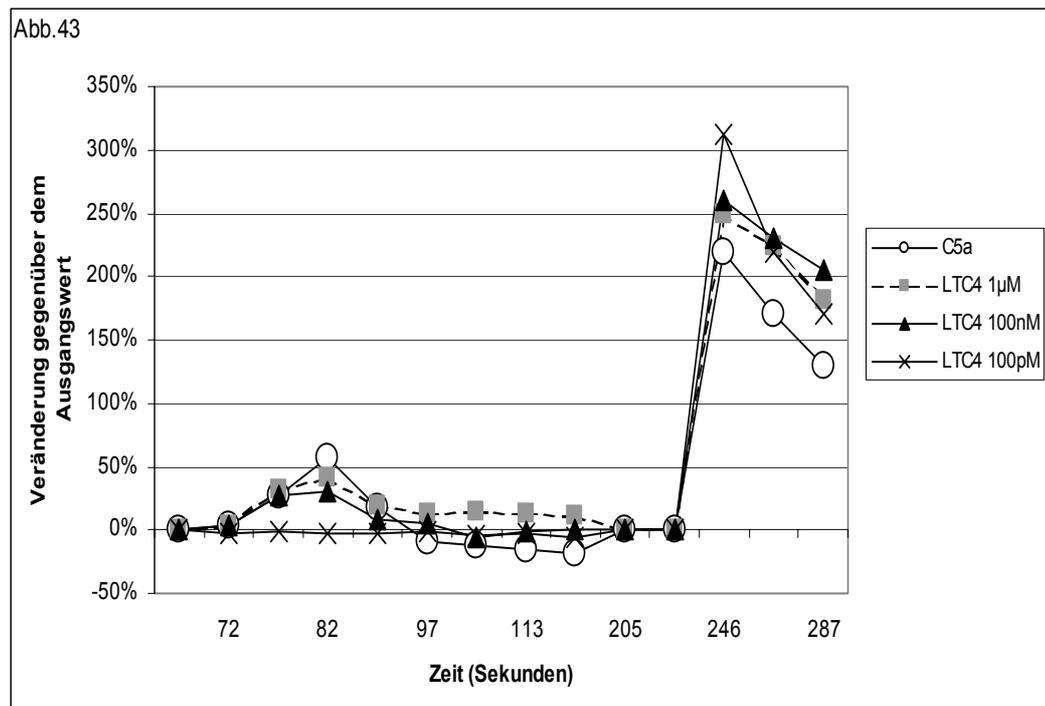
3 h nach Exposition mit IL-3 zeigt sich eine Reduktion der MMP-9-mRNA Expression um 50%. In Gegenwart von IL-5 wird die mRNA Expression von MMP-9 um 25 % reduziert (Abb. 42a). IL-3 bewirkt nach 24 h eine Reduktion der MMP-9 Reduktion um 27 % verglichen mit unstimulierten Eosinophilen, die ebenfalls für 24 h inkubiert werden. IL-5 hat einen vergleichbaren Effekt und inhibiert die MMP-9-mRNA um 24% (Abb. 42b). Bei einer Inkubationsdauer von 24h steigt die MMP-9-mRNA Expression unstimulierter Eosinophiler um das 6,7-fache gegenüber dem Wert von 3 h. Über denselben Zeitraum kann bei Inkubation mit IL-3 die MMP-9-mRNA Expression um das 9,8-fache, sowie mit IL-5 um das 6,8-fache gesteigert werden.



**Abbildung 42:** Expression von MMP-9-mRNA nach Inkubation für 3 h (42a) und 24 h (42b). Inkubation mit IL-3 und IL-5 (n=4).

## 4.6 Modulation des $Ca^{2+}$ -Einstroms in die Zelle

Die Fluoreszin-3 Messung soll den Einfluß der verwendeten Substanzen auf den Kalziumeinstrom in den Eosinophilen als Zeichen einer zellulären Antwort darstellen. Als Stimuli werden C5a und LTC<sub>4</sub> verwendet, da Zytokine eine vergleichsweise träge Antwort der  $Ca^{2+}$  Flüsse bewirken.



**Abbildung 43:** *Fluoreszin-3 Messung als Indikator des Kalzium-Ausstrom beim eosinophilen Granulozyten nach Stimulation mit C5a und LTC<sub>4</sub>. Darstellung der Stimulation mit C5a und von verschiedenen Konzentrationen von LTC<sub>4</sub>: 100 pM; 100 nM; 1 µM.*

Nach einer Minute wird das FACS-Röhrchen aus dem Gerät genommen und die Substanz zugegeben. Der Zeitpunkt ist durch den Rückgang der mittleren Fluoreszenz nach 70 Sekunden auf Null zu erkennen.

C5a führt zu einer Erhöhung des Kalziumeinstroms um 71 %. Auch mit LTC<sub>4</sub> in Konzentrationen von 100nM und 1µM kommt es zu einem vermehrten Kalziumeinstrom um 30 % bzw. 42 %. Bei LTC<sub>4</sub> in der Konzentration von 100 pM lässt sich kein Effekt auf die Zellen erkennen. Nach ca. 4 Minuten wird durch die Zugabe von Ionomycin der maximale Kalziumeinstrom ersichtlich.

## **5. Diskussion**

Das Ziel dieser Arbeit war, die natürlich vorkommende Variabilität, Adaptation und Plastizität des humanen eosinophilen Granulozyten im Experiment zu demonstrieren und zu studieren. Es sollten die phänotypische und funktionelle Wandelbarkeit der Zelle unter Stimulation mit verschiedenen Zytokinen und moderner Asthma-Therapeutika untersucht werden und so seine zellbiologische Plastizität zum Ausdruck kommen.

### **5.1 Effekt von Zytokinen**

Unter IL-3 exprimiert der Eosinophile signifikant vermehrt CD11b, CD13, CD26, CD32, CD54 und CD69. Die Expression anderer Oberflächenantigene wie beispielsweise CD62L nehmen ab und einige werden durch das Zytokin gar nicht beeinflusst, zum Beispiel CD49d und CD95. Unter IL-3 Stimulation kommt es zu einer Zunahme der Viabilität mit einer Abnahme apoptotischer Zellen. IL-3 reduziert darüber hinaus die mRNA Expression von MMP-9.

IL-5 allein erhöht die Expression von CD11b, CD13 und CD69 und hat keine weitere Auswirkung auf den Phänotyp des eosinophilen Granulozyten. Die Viabilität des Eosinophilen wird durch IL-5 erhöht. Wie auch IL-3 reduziert IL-5 die Expression von MMP-9 mRNA.

IFN- $\gamma$  wirkt sich steigernd auf die Expression der Oberflächenstrukturen CD11b, CD13, CD32, CD54, CD62L, CD69 und CD95 aus. Es besteht keine Korrelation von IFN- $\gamma$  zu der Expression von CD26 und CD49d. IFN- $\gamma$  steigert ebenfalls die Viabilität des Granulozyten.

### **5.2 Effekt von Lipidmediatoren (LTC<sub>4</sub>)**

Phänotyp sowie Viabilität des Eosinophilen wird durch LTC<sub>4</sub> alleine in der verwendeten Konzentration von 10 nM/ml nicht beeinflusst. Eine zellbiologische Wirksamkeit wurde durch intrazelluläre Ca<sup>2+</sup> Erhöhung dargestellt. Bei Kombination mit IL-3 verhindert LTC<sub>4</sub> die durch LTRA ML und ZL induzierte Abnahme der CD32 Expression.

### **5.3 Effekt von Proteinen (C5a)**

Das Antigen CD49d wird durch den Einfluß von C5a auf Eosinophilen vermindert exprimiert. Der Komplementfaktor hebt darüber hinaus die Wirkung von ML und ZL auf die Expression von CD62L auf. Weiterhin bewirkt es keine Veränderung am Phänotyp des Eosinophilen,

kann aber wie auch LTC<sub>4</sub> den durch die LTRA induzierten Effekt auf die CD32 Expression antagonisieren. Es erhöht zudem die Viabilität der untersuchten Zellen und löst einen zellulären Ca<sup>2+</sup>-Einstrom aus.

#### **5.4 Effekt der Leukotrien-Rezeptorantagonisten (ML und ZL)**

Von den LTRA ist bis heute bekannt, dass sie klinisch eine Verbesserung der asthmatischen Symptomatik bewirken. Insbesondere werden durch ML und ZL die FEV<sub>1</sub>-Werte verbessert, subjektive Beschwerden reduziert, sowie die Eosinophilenzahl im Vollblut, im Sputum und in den Atemwegen reduziert (Pizzichini et al., 1999). Mittels LTRA lassen sich  $\beta_2$ -Sympatomimetika- und Kortikoiddosen und den damit verbundenen Nebenwirkungen reduzieren. Der Stufenplan der deutschen Atemwegsliga enthält Montelukast nur als Alternative. Man empfiehlt eine Konsultation mit dem Pneumologen und eine eventuelle Medikation bei Schweregrad 2 und 3 der Krankheit. Zafirlukast ist in Deutschland nicht zugelassen. Man diskutiert weiterhin, dass bei einer herabgesetzten Kortikoiddosis autoimmune Prozesse, wie zum Beispiel das Churg-Strauss-Syndrom vermehrt zum Vorschein kommen und so der Eindruck entstehe, dass das Syndrom durch die LTRA anstatt durch fehlende Suppression produziert wird (Franco and Artes, 1999).

In dieser Arbeit bewirken ML und ZL alleine am Eosinophilen eine vermehrte Expression von CD49d und vermindern den Effekt von IL-3 und C5a auf seine Expression signifikant. Die Viabilität der Zellen kann bei Stimulation mit IL-3 durch ML weiter gesteigert werden. Die Transmigration von Eosinophilen wird durch ML signifikant und ZL tendentiell gehemmt. ZL erhöht die Expression von CD62L, fördert mit IFN- $\gamma$  und C5a die Expression von CD54 und kann alleine die Viabilität des Eosinophilen Granulozyten erhöhen. In Kombination mit dem Zytokin IL-3 bewirken beide LTRA eine Abnahme der durch IL-3 induzierten Erhöhung der CD32 Expression signifikant. Beide LTRA bewirken keine Änderung der MMP-9 Sekretion.

#### **5.5 Effekt von Antihistaminika (FF)**

Die Rolle von Histamin-Antagonisten bei der Therapie des Asthma bronchiale ist bis heute umstritten. Ketokifen, ein H<sub>1</sub>-Rezeptorantagonist der ersten Generation, zeigte im Tiermodell neben der anti-histaminischen Wirkung einige anti-entzündliche Eigenschaften, die in klinischen Studien nicht bestätigt werden konnten.

H<sub>1</sub>-Rezeptoren der 2. Generation sind aufgrund ihrer geringeren Liquorgängigkeit besser verträglich als die Substanzen der ersten Generation. Neben ihrer symptomatischen Wirkung

als Histamin<sub>1</sub>-Rezeptorantagonist besitzen sie offenbar eine nicht H<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelte anti-entzündliche Wirkkomponente, auch wenn die hier zugrunde liegenden Mechanismen noch nicht im Detail bekannt sind.

Die Indikation zur Behandlung mit H<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten der 2. Generation umfaßt die allergische Rhinokonjunktivitis sowie die atopische und chronisch idiopathische Urtikaria. Für die entzündungshemmende Therapie beim Asthma bronchiale haben sich die Substanzen bisher in der empfohlenen Dosierung jedoch nicht qualifiziert (Kroegel, 1998). Meltzer beschrieb in seiner Placebo-kontrollierten Doppel-Blind Studie mit 845 Teilnehmern, dass sich die Lebensqualität von Patienten mit allergischer Rhinitis bei FF-Therapie signifikant verbessert hat (Meltzer et al., 1999).

Aus der vorliegenden Arbeit wird deutlich, dass FF die Expression von CD32, CD49d und CD95 auf dem eosinophilen Granulozyten erhöht und eine Zunahme der Expression von CD54 bei Kostimulation mit IFN- $\gamma$  bewirkt. Weiterhin fördert FF in Kombination mit IL-3 die Viabilität des Eosinophilen. Die MMP-9 Sekretion wird nicht beeinflusst.

### **5.6 Effekt von Chloridionenhemmer (NC)**

Nedocromil ist eine nichtsteroidale, anti-inflammatorische Substanz mit noch unbekanntem Wirkmechanismus. Die deutsche Atemwegsliga empfiehlt seine Einnahme bei leichtem Asthma bis zur Stufe 2 des Stufenplans. Die diesem Medikament ursprünglich zugeschriebene Degranulationshemmung ("Degranulationshemmer") reicht nicht aus, um alle pharmakologischen Beobachtungen zu erklären. Neuere Untersuchungen sprechen für eine Interferenz dieser Substanz mit der Produktion bestimmter Zytokine in Makrophagen bzw. für die Beeinflussung anderer Entzündungszellen und/oder sensorischen Nerven. Eine gewisse Rolle scheint auch ein Einfluß auf die Funktion zellulärer Chlorkanäle zu spielen. Verschiedene experimentelle und klinische Studien belegten nicht nur eine Hemmung der frühen und verzögerten asthmatischen Reaktion, ohne diese vollständig aufheben zu können. Darüber hinaus inhibiert NC auch die zelluläre Infiltration mit Rückbildung der bronchialen Hyperaktivität. Beim irritativen und belastungsinduzierten Asthma ist es weniger zuverlässig, beim intrinsischen Asthma weitgehend wirkungslos (Kroegel, 1998).

In diesen Experimenten exprimiert der eosinophile Granulozyt bei Stimulation mit NC alleine vermindert das Antigen CD32. Zudem steigert NC bei Kombination mit IL-5 und C5a die Expression von CD11b signifikant. Es erhöht bei Stimulation mit IFN- $\gamma$  und NC die Expression von CD49d und CD69. Viabilität und MMP-9 Sekretion der Zellen wird durch den Mastzellstabilisator nicht beeinflusst.

## **5.7 Variabilität des Phänotyps**

In der Arbeit wurden das von CD4<sup>+</sup> Lymphozyten TH<sub>1</sub> gebildete IFN- $\gamma$  und die von CD4<sup>+</sup> Lymphozyten TH<sub>2</sub> sezernierten IL-3 und IL-5 verwendet. Von IL-3 und IL-5 ist bekannt, dass sie bei der Differenzierung aus der multipotenten Stammzelle zum ausgereiften Eosinophilen eine eosinophilopoetische Rolle spielen. Weiterhin gelten sie als chemotaktisch, aktivieren und primen den Eosinophilen und verlängern seine Überlebenszeit. Die Dichte von CD4<sup>+</sup> Lymphozyten ist in Atemwegen von asthmatischen Patienten erhöht. Somit besteht eine Korrelation zwischen TH<sub>2</sub> Zellen und Asthma, weshalb man annimmt, dass TH<sub>2</sub> Zellen bei der Entstehung der Krankheit eine entscheidende Rolle spielen. Eine gesteigerte mRNA-Expression von IFN- $\gamma$  ist in der Bronchiallavage von Asthmatikern nicht zu finden und man schreibt den TH<sub>1</sub>-Zellen deshalb keine große Rolle bei der Pathogenese des Asthma bronchiale zu.

IL-3 und IL-5 sind Aktivierungszytokine des eosinophilen Granulozyten und fördern die Expression einer Vielzahl von Oberflächenantigenen. Dieses „Priming“ ermöglicht der Zelle Interaktionen mit der Umgebung aufzunehmen, indem sie vermehrt Adhäsionsmoleküle (CD11b, CD54) ausbildet. Sie sind auch verantwortlich für die Expression von apoptotisch wirksamen Oberflächenantigenen (CD69) und führen auf der anderen Seite zu einer Erhöhung der Viabilität. Möglich wäre eine bessere Steuerbarkeit der Zellen, die am Ort des Entzündungsgeschehens ein erhöhtes Überleben zeigen, beim Verlassen des inflammatorischen Geschehens oder bei Regression der Entzündung einer apoptotischen Regulation unterliegen werden und so dem Körper durch ihre Degranulationsprodukte (EPO, MCP, ECP, EPX) keinen Schaden anrichten können.

Dass die verwendeten Zytokine einen direkten Einfluß auf den eosinophilen Granulozyten haben war bekannt. Untersucht wurde in dieser Arbeit auch die phänotypische Veränderung durch die Leukotrien-Rezeptorantagonisten Montelukast und Zafirlukast.

Spada beschrieb 1994, dass LTD<sub>4</sub> die Chemotaxis peripherer Blutlymphozyten stimuliert, was sich durch Probilukast hemmen ließ (Spada et al., 1994, Turner et al., 1994). Anti-IL-5-Antikörper hemmten ebenfalls die Leukotrien-induzierte Eosinophilie. So schloß er, dass Leukotriene die Zahl im Gewebe akkumulierender eosinophiler Granulozyten indirekt über die Aktivierung von Lymphozyten und die Freisetzung von IL-5 steigern. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass zur Hemmung der Transmigration, der Veränderungen des

Phänotyps und der Viabilität keine Lymphozyten notwendig sind, sondern ML und ZL direkt am Eosinophilen angreifen.

Fördern ML und ZL durch die erhöhte Viabilität die Persistenz der Eosinophilen im Körper und auch in den Atemwegen?

Mehrere Studien zeigen, dass die Eosinophilenzahl in Atemwegen asthmatischer Patienten bei Medikation mit LTRA abnahmen (Pizzichini et al., 1999). Entscheidend könnte der Effekt der verminderten Transmigration von Eosinophilen bei Stimulation mit LTRA sein. Dazu sollten mögliche Wirkungen der LTRA auf andere Immunzellen in den Wirkmechanismus einbezogen werden. Die Transmigration könnte also sowohl durch eine LTRA-induzierte direkte Wirkung am Eosinophilen als auch durch indirekte Veränderungen über Freilassung von Zytokinen reguliert werden.

Auch FF bewirkte eine phänotypische Veränderung am Eosinophilen und führte zu einem Anstieg der Expression der Oberflächenantigene CD32, CD49d und CD95. Da bei diesen Versuchen nur Eosinophile und keine anderen Zellen beteiligt waren, kann man daraus schließen, dass FF wie die LTRA einen direkten Einfluß auf eosinophile Granulozyten ausübt. Viabilität und Transmigration wird ebenfalls von FF beeinflusst und so erkennt man eine direkte Beziehung zwischen Phänotypvariabilität und Funktionalität der Zelle.

NC induzierte eine verminderte Expression von CD32 auf Eosinophilen. Eine Veränderung der Viabilität konnte nicht festgestellt werden. CD49d und CD69 wurden bei Kostimulation mit IFN- $\gamma$  durch NC signifikant hochreguliert. Bei CD54 zeigte die Kombination C5a und IFN- $\gamma$  eine NC-abhängige Hochregulation des Antigens. Weiterhin bewirkte die Stimulation mit IL-5 und C5a in Kombination mit NC eine statistische relevante Erhöhung von CD11b im Vergleich zur alleinigen Kombiatiion mit IL-5 und C5a.

Da IFN- $\gamma$  ein Zytokin ist, das hauptsächlich von TH<sub>1</sub>-Zellen, die beim Asthma bronchiale keine entscheidene Rolle spielen, exprimiert wird, stehen diese Ergebnisse nicht im direkten Zusammenhang mit dem Asthma bronchiale, sondern könnten Auswirkungen von NC auf den nicht-allergischen Entzündungsvorgang widerspiegeln.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass NC als einziger Parameter die Expression von CD32 auf eosinophilen Granulozyten reduziert.

## **5.8 Variabilität der Viabilität**

Ein weiteres wesentliches Ergebnis der Arbeit war die Darstellung der LTRA induzierten Reduktion des CD32-Antigens, sowie die erhöhte Viabilität eosinophiler Granulozyten in Gegenwart von IL-3.

Kim et al. beschrieben 1999 den Zusammenhang zwischen der Expression von CD32 und der Viabilität beim eosinophilen Granulozyten. Sie zeigten ein gesteigertes Überleben und eine verminderte Apoptose *in vitro* bei Ligation von CD32 durch lösliche anti-CD32 Antikörper auf. Wurden anti-CD32 Antikörper auf Gewebekulturflaschen immobilisiert, trat das Gegenteil auf und die Zellen erfuhren eine verkürzte Viabilität, selbst unter Stimulation mit IL-5. Kim schloss daraus, dass für ein gesteigertes Überleben nicht nur die CD32 Expression notwendig war, sondern auch Adhäsionsmoleküle ( $\beta_2$  Integrine) eine große Rolle spielen (Kim et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass IL-3 sowohl die Expression von CD32 signifikant erhöht, als auch die Viabilität der Zelle fördert und den Anteil apoptotischer Zellen senkt. So wäre es denkbar, dass IL-3 durch die erhöhte Dichte des Antigens CD32 auf dem Eosinophilen die Wahrscheinlichkeit seiner Ligation erhöht und so zum gesteigerten Überleben führt. Dieser Mechanismus würde allerdings nur *in vivo* gelten, da anti-CD32 dem Eosinophilen *in vitro* nicht angeboten wurde.

Im Vergleich zu IL-3 alleine, reduzieren LTRA die Expression von CD32 signifikant, erhöhen dabei aber die Viabilitätsrate des Eosinophilen und verringern den Anteil apoptotischer Zellen. Dieser viabilitätssteigernde Effekt der LTRA lässt sich durch direkte Gabe von LTC<sub>4</sub> hemmen. Es ist denkbar, dass die LTRA und LTC<sub>4</sub> um den CysLT(1) Rezeptor konkurrieren. Es ist bekannt, dass ML und ZL spezifische CysLT(1) Rezeptor Antagonisten sind und den natürlichen Liganden LTD<sub>4</sub> antagonisieren. *In vitro* wird LTC<sub>4</sub> in LTD<sub>4</sub> umgewandelt und kann so an den Rezeptor binden (Back et al., 2001). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass LTRA für die Erhöhung der zellulären Überlebenszeit verantwortlich sind. Der Mechanismus ist unklar. Jedoch könnte IL-3 LTC<sub>4</sub> freisetzen, was durch LTRA antagonisiert werden kann (Laviolette et al., 1995). Wenn dieser Wirkmechanismus zutrifft, muss man annehmen, dass eosinophile Granulozyten LT-Rezeptoren besitzen. Um zu zeigen, dass das eingesetzte LTC<sub>4</sub> (wie auch C5a) eine direkte Wirkung auf die Zellen hatte, wurde der Kalziumeinstrom nach Exposition mit LTC<sub>4</sub> gemessen. Tatsächlich konnte eine Dosis-abhängige intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Erhöhung innerhalb weniger Minuten nach Zusatz von LTC<sub>4</sub>

gemessen werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass LTC<sub>4</sub>-Rezeptoren von Eosinophilen exprimiert werden oder LTC<sub>4</sub> in LTD<sub>4</sub> umgewandelt wird, das an den CysLT Rezeptor bindet.

Lee et al. beschrieben 1999 eine verminderte Viabilität bei mit LTRA kostimulierten Neutrophilen. Weiterhin ist bekannt, dass Leukotriene die Viabilität von Eosinophilen steigern können. Bei den Versuchen dieser Arbeit blieb der viabilitätssenkende Effekt der LTRA aus und kehrte sich sogar in eine Überlebenssteigerung um. ZL alleine hatte einen viabilitätsfördernden Einfluß auf die Eosinophilen, den man bei Stimulation mit ML nicht deutlich sehen konnte. Bei der Dosis-Wirkungs-Kurve mit ML fiel allerdings auf, dass bei der Konzentration von 50 µg/ml, die Viabilität der Eosinophilen signifikant reduziert wurde. Dieses Ergebnis deutet am ehesten auf eine toxische Dosis der Substanz hin.

Weiterhin war bei ML zu beobachten, dass es in Kombination mit IL-3 den Anteil der apoptotischen Zellen um 37 % signifikant im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen reduziert. Bei alleiniger Stimulation mit IL-3 sieht man eine 21%ige Abnahme dieser Zellen. Dieser Unterschied zwischen IL-3 und IL-3/ML zeigt sich allerdings erst am vierten Tag. Davor wird zwar auch eine Reduktion der apoptotischen Zellen ersichtlich, jedoch differieren die Stimulationen IL-3 und IL-3/ML nicht voneinander (Abb. 44).

Anscheinend müssen die Zellen erst über einen gewissen Zeitraum mit IL-3 geprimt werden, dass ML wirken kann. Stimuliert man die Eosinophilen mit LTC<sub>4</sub> kann man eine erhöhte Viabilität der Zellen nach 4 Tagen feststellen. Mit IL-3 löst ML nach 4 Tagen eine Steigerung der Viabilität aus, die durch weitere Zugabe von LTC<sub>4</sub> aufgehoben werden kann.

Korreliert die CD32 Expression in diese Arbeit mit der Viabilität des Eosinophilen?

IL-3 erhöht die Expression von CD32 und die Viabilität des eosinophilen Granulozyten. Bei Kombination von IL-3 mit den LTRA oder FF nimmt der Expression des FcγRII Rezeptors ab, dagegen die Überlebensrate zu. IFN-γ alleine zeigt eine Korrelation zwischen Expression und Viabilität. Die Zugabe von ML, ZL oder FF erniedrigt hier, genau wie bei IL-3, die CD32 Expression und fördert gleichzeitig die Viabilität. IL-5 hat keinen Einfluß auf die Expression von CD32, führt aber zu einer gesteigerten Viabilität. Unter C5a kommt es zu einer Abnahme der CD32 Expression und gleichzeitig zu einer Zunahme der Viabilität. ZL alleine fördert die CD32 Expression und die Viabilität. FF alleine verhält sich in seinen Wirkungen wie die LTRA. NC erniedrigt signifikant die CD32 Expression, zeigt jedoch keinen Einfluß auf die Viabilität des Eosinophilen.

Die inhomogenen Auswirkungen der verschiedenen Stimulationen auf die Expression von CD32 und Viabilität lassen keine Schlussfolgerung auf Korrelation dieser beiden Faktoren bei Stimulation mit allen benutzten Substanzen zu.

Zusammenfassend läßt sich feststellen:

- Das gesteigerte Überlebenzeit *in vitro* steht in keinem Zusammenhang mit der CD32 Expression.
- Für die erhöhte Viabilität bei Stimulation mit den LTRA ist wahrscheinlich ein Mechanismus verantwortlich, der im Zusammenhang mit dem zellulären LTC<sub>4</sub> steht.
- Dabei könnte IL-3 zu einem Mechanismus führen, der sich durch ML hemmen läßt.
- Der apoptosehemmende Effekt von ML ist erst nach 24 h ersichtlich.

FF fördert die Expression von CD32 und hat ferner einen viabilitätssteigernden Einfluß auf die Zelle, wenn man sie mit IL-3 aktiviert. Möglich wäre, dass FF *in vivo* die Viabilität der Eosinophilen ebenfalls fördert. Einerseits durch die Hochregulation von CD32 und die damit verbundene erhöhte Wahrscheinlichkeit einer Kreuzvernetzung mit anti-CD32 und andererseits durch einen zu IL-3 additiven überlebensfördernden Effekt, dessen Mechanismus allerdings nicht geklärt ist.

Ein weiteres Oberflächenantigen, das durch FF hochreguliert wird, ist CD95. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, kann durch Kreuzvernetzung des Antigens eine durch IL-5 induzierte Steigerung der Viabilität antagonisiert werden. Dies würde bedeuten, dass FF durch Erhöhung der Expression von CD95 die Viabilität der Eosinophilen vermindert. Diese Hypothese steht im Widerspruch zu der oben genannten, die den Zusammenhang der Expression von CD32 und der Viabilität zu erklären versucht. Allerdings ist die anti-CD95-Aktivität *in vitro* nicht gegeben.

Es ist bisher nicht bekannt, über welchen Mechanismus FF den Eosinophilen im Bezug auf die Viabilität beeinflusst.

### **5.9 Variabilität der Transmigration**

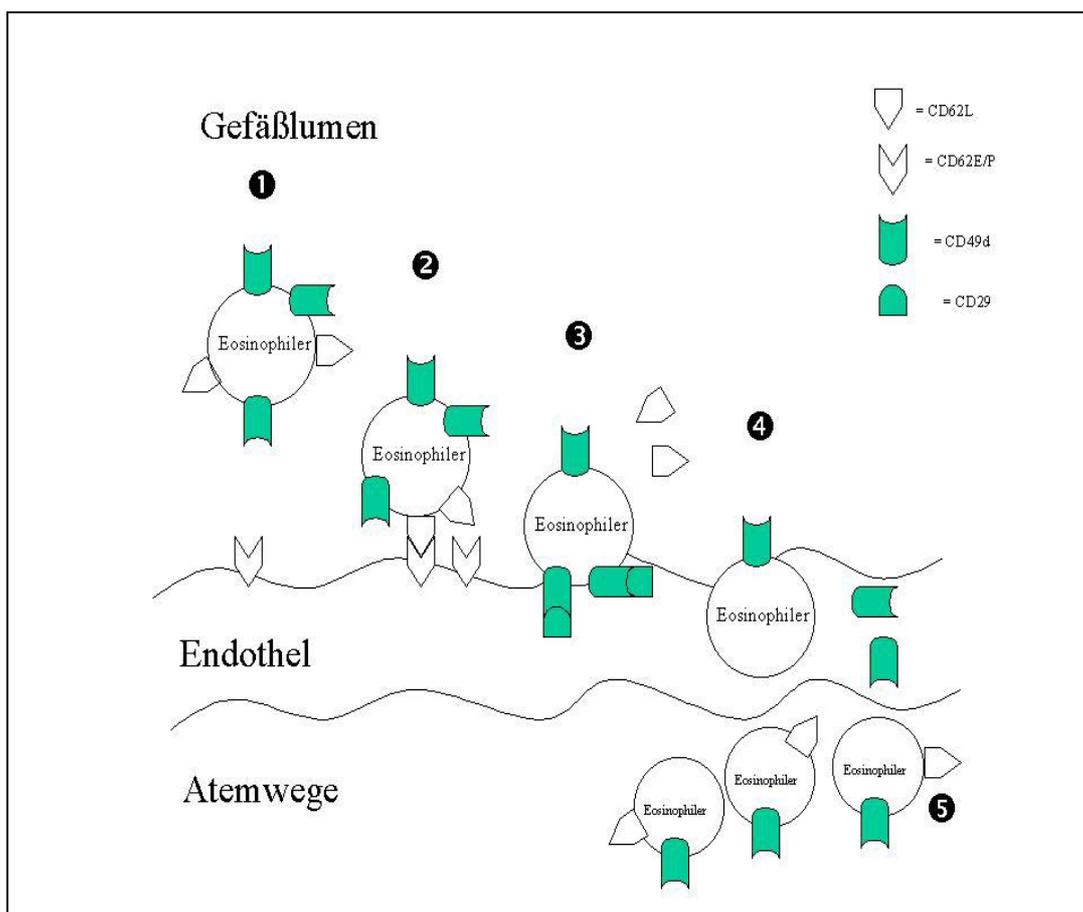
Die Ergebnisse bei den transendothelialen Migrationsversuchen zeigen, dass ML und ZL, wie auch FF, im Gegensatz zu NC einen transmigrationshemmenden Effekt auf die Eosinophilen besitzen.

Das Selektin CD62L, das bei der Phase des "rolling" für die Transmigration eine entscheidende Rolle spielt, wird durch ZL hochreguliert. Da dieses Antigen später abgespalten werden muss, um ein weiteres Vordringen in das perikapilläre Gewebe zu ermöglichen, könnte ZL die Transmigration durch ein zu starkes "Kleben" an den Endothelzellen behindern. Die Hochregulation von CD62L ließ sich in den Versuchen durch die Gabe von C5a antagonisieren. Da C5a zur Degranulation, also zur Freisetzung unter anderem von LTC<sub>4</sub> führt, könnte durch diesen Mechanismus der ZL Effekt aufgehoben werden.

Ähnlich könnte der Ablauf bei der Expression von CD49d gestört sein. Die Expression von CD49d, das mit CD29 den VLA Komplex bildet und vermehrt beim "sticking" der Zelle eine Rolle spielt, wird durch die LTRA induziert. Ebenso heben die LTRA die hemmende Wirkung von C5a auf die Expression von CD49d auf. Denkbar wäre auch hier eine Hemmung der Transmigration der eosinophilen Granulozyten durch einen behinderten Abbau von CD49d.

Betrachtet man die Transmigration, so könnte folgendes vereinfachtes Schema gelten:

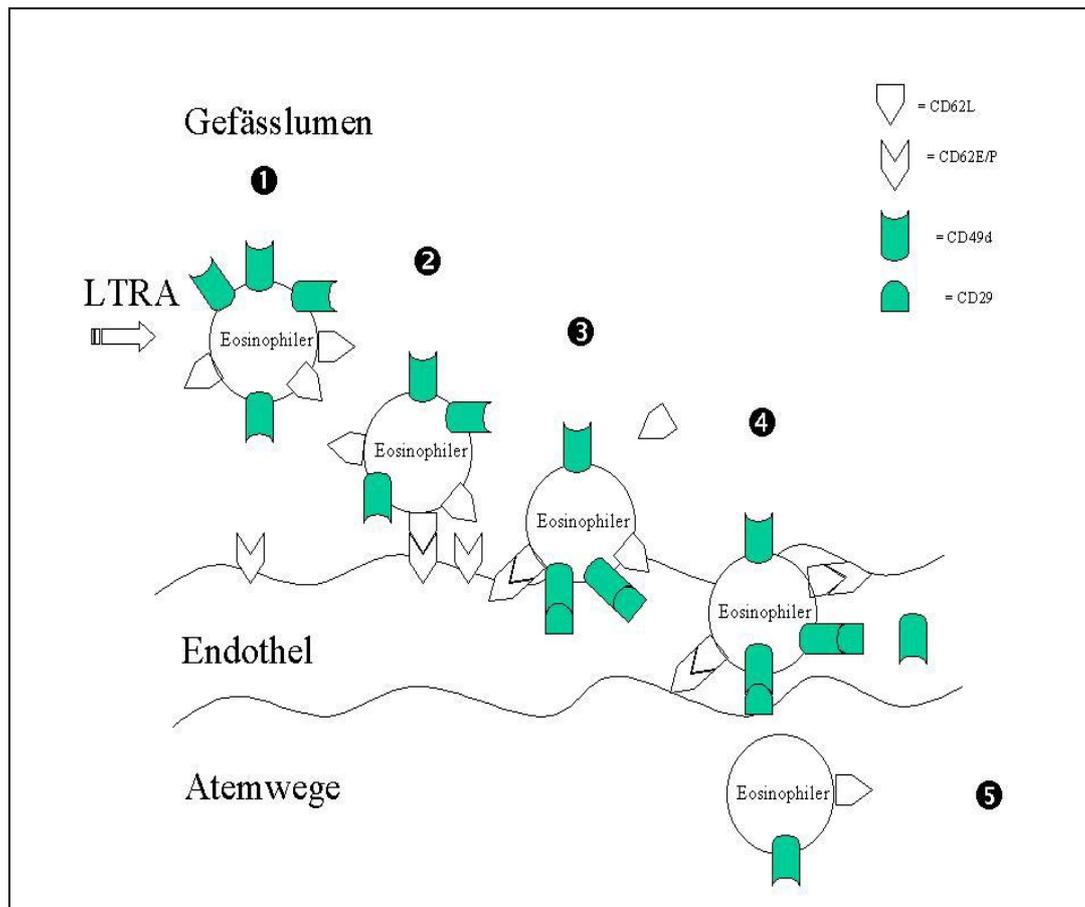
- ❶ Im Vollblut ist die Dichte von CD62L und CD49d ungefähr gleich groß.
- ❷ Beim “rolling” wird durch CD62L der Kontakt zum Endothel hergestellt.
- ❸ CD49d dient dem weiteren Anheften, dem “sticking” der Zelle am Endothel während CD62L abgespalten wird.
- ❹ Auf dem Weg zu den Atemwegen verliert die Zelle auch noch CD49d und hat so, ❺ in den Atemwegen angekommen, eine signifikant geringere Rezeptordichte für CD62L und CD49d als im Vollblut.



**Figur 1:** Rolle von CD62L und CD49d bei der Transmigration des eosinophilen Granulozyten.

Die Auswirkungen bei Stimulation mit den LTRA zeigt folgendes Schema:

- ❶ Unter dem Einfluß der LTRA exprimieren die Eosinophilen eine höhere Dichte von CD49d und CD62L.
- ❷,❸,❹ Die frühe Transmigration wird dadurch nicht beeinflusst. Die Zellen bleiben jedoch durch den fehlenden Abbau der Adhäsionsmoleküle am Endothel hängen und können nicht vollständig durch die Membran transmigrieren, so dass sich am Ende weniger Eosinophile im perikapillären Gewebe befinden ❺.



**Figur 2:** *Rolle von CD62L und CD49d bei der Transmigration des eosinophilen Granulozyten. Auswirkungen der Stimulation mit LTRA.*

Munoz hat 1999 beschrieben, dass bei Eosinophilen durch Adhäsion an HUVEC-Zellen sowohl die Sekretion von EPO und LTC<sub>4</sub> induziert wird, als auch eine Aktivierung der Zellen stattfindet. Der Effekt des von der Zelle sezernierten LTC<sub>4</sub>, das die Gefäßpermeabilität erhöht und so die Transmigration erleichtert, könnte durch die LTRA abgeschwächt werden (Drazen et al., 1980, Dahlen et al., 1981).

So könnte die Transmigration einerseits durch den Antagonismus des permeabilitätsfördernden Effekts von LTC<sub>4</sub> reduziert werden und/oder durch direkte

Förderung der Expression von Adhäsionsmolekülen wie CD49d und CD62L, deren fehlender Abbau der Diapedese entgegenwirkt.

Es ist nach wie vor strittig, ob moderne H<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten der 2. Generation, wie Fexofenadin, auf Leukozyten einen Einfluß haben (De Vos, 1999). Abdelaziz und Mitarbeiter beschrieben 1998, dass FF die Permeabilität von humanen nasalen Epithelzellen (HNEC) erhöht und deren Freisetzung von Zytokinen fördert, so dass eosinophile Granulozyten vermehrt transmigrieren konnten. Die Schlußfolgerung war, dass FF einen antientzündlichen Einfluß durch Modulation der HNEC bewirkt (Abdelaziz et al., 1998). Paolieri et al. beobachteten 1998 bei Versuchen mit Terfenadin und Fexofenadin eine verminderte ICAM-1 (CD54) Expression auf humanen Epithelzellen der Konjunktiva (Paolieri et al., 1998).

In den hier durchgeführten Experimenten reduzierte FF die Zahl der transmigrierten Eosinophilen um 21 %. Dies deutet auf einen Effekt von FF auf die HUVEC oder direkt auf den eosinophilen Granulozyten hin. Weiterhin wurde in Gegenwart von FF ein signifikanter Anstieg der Expression der Oberflächenantigene CD32, CD49d und CD95 beobachtet. Die Expression von CD54 auf Eosinophilen wird durch FF um 25% erhöht. Möglich wäre ein unterschiedlicher Effekt von FF auf konjunktivalen Epithelzellen und Eosinophile. Da bei den Versuchen zur Messung der Oberflächenantigene nur Eosinophile und keine anderen Zellen beteiligt waren, kann man daraus schließen, das FF einen direkten Einfluß auf eosinophile Granulozyten ausübt. Die Transmigration könnte durch die Epithelzellen mit beeinflusst werden.

Der signifikant erhöhte Anstieg von CD49d in Gegenwart von FF könnte mit der verminderten Transmigration der Eosinophilen korrelieren. Der hypothetische Mechanismus könnte wie bei den LTRA auf ein verzögertes Abspalten der Adhäsionsmoleküle beruhen und damit einem „Klebenbleiben“ am Gefäßendothel.

*In vitro* reduziert NC die Expression von ICAM-1 (CD54) auf humanen bronchialen Endothelzellen und vermindert die Chemotaxis eosinophiler Granulozyten (Abdelaziz et al., 1997). Ein Einfluß auf die Transmigration oder der CD54 Expression durch NC konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

### **5.10 Variabilität der Funktionalität**

Unter dem Aspekt der funktionellen Variabilität entzündlicher Zellen wurden die Auswirkungen der verwendeten Substanzen auf die Sekretion und mRNA Expression von MMP-9 beobachtet.

Matrix Metalloproteinasen (MMPs) gehören zur großen Gruppe der Zink-bindenden Enzyme, deren Substrat extrazelluläre Matrix Proteine sind. Es gibt vier Subklassen, wovon die MMP-9 zu den Gelatinasen (früher TYP IV Kollagenase) gehört. Gelatinasen interagieren hauptsächlich mit Basalmembrankollagen, Matrixproteoglykane und Gelatinose. MMPs spielen eine Rolle sowohl bei physiologischen als auch pathologischen Prozessen, zum Beispiel Embryogenese, Tumordinvasion, Tumornekrose, Umbau des Bindegewebes („remodelling“) und Infiltration von Entzündungszellen. Weiterhin scheinen sie wichtige Mediatoren bei Entstehung der allergischen Entzündung zu sein. Ihre Genexpression wird streng durch Zytokine und Wachstumsfaktoren reguliert. IL-1, TNF $\alpha$ , TGF $\alpha$ , EGF, FGF oder PDGF erhöhen und TGF $\beta$  und IL-4 erniedrigen die Transkription von MMPs.

Bei einigen asthmatischen Patienten wurde in den Atemwegen eine Überexpression von MMP-9 mRNA auf Eosinophilen beobachtet. Fujisawa et al. konnten jedoch keinen Unterschied der MMP-9 Sekretion Eosinophiler von Asthmatikern und Nicht-Asthmatikern feststellen. Auch eine 4 tägige Inkubation mit IL-5 rief keine Änderung der Produktion hervor. Wahrscheinlich waren komplexere Mechanismen für eine Überexpression von MMP-9 bei Asthmatikern verantwortlich (Fujisawa et al., 1999).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Expression von MMP-9 mRNA sowohl durch IL-5 als auch durch IL-3 vermindert wird. Inkubation mit IL-5 reduzierte die MMP-9 mRNA Expression um ca. 25 % im Vergleich zur Kontrolle. IL-3 reduzierte sie um ca. 50 % bei einer Inkubation von 3 Stunden. Inkubierte man die Zellen 24 Stunden so verringerte IL-3 die Protease nur noch um 27 %.

Außer Nedocromil wurde der Einfluß von den in dieser Arbeit benützten Medikamenten auf die MMP-9 Expression noch nicht untersucht. Corbel et al. zeigten 1999, dass Nedocromil keinen Einfluß auf die MMP-9 Aktivität bei Mäusen hat. Die Ergebnisse konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Es waren weiterhin keine Veränderungen der MMP-9 Sekretion bei Stimulation mit den Medikamenten Montelukast, Zafirlukast und Fexofenadin festzustellen. Der einzige Unterschied bei den Versuchen mit den Transwell-Platten war der, dass in die oberen Kammern beträchtlich mehr MMP-9 sezerniert wurde als in die unteren. Anscheinend benötigen die Zellen zur Durchwanderung der Endothelzellschicht MMP-9. Die

Sekretionsprodukte bleiben also auf der Seite der HUVEC-Schicht, wo die Transmigration begonnen hat.

Es ist denkbar, dass Eosinophile nicht durch eine alleinige Stimulation mit den vier Medikamenten zu einer erhöhten Expression von MMP-9 angeregt werden, sondern einen Kostimulator brauchen. Hier sind noch mehr Versuche erforderlich, um diesen Zusammenhang besser erklären zu können.

### **5.11 Konzept der zellbiologischen Plastizität**

Der Begriff zelluläre Plastizität soll vermitteln, dass der eosinophile Granulozyt keineswegs ein statisches Erscheinungsbild trägt, sondern in vielerlei Hinsicht dynamisch ist. Aus dieser Arbeit wurde ersichtlich, dass sich abhängig von Zytokinart und -konzentration, Lipidmediatoren, Protein und moderne Asthmatherapeutika sein morphologisches Erscheinungsbild, seine Funktionalität, sein Phänotyp und seine Dichte verändern kann. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Zellen unter bestimmten Umständen auf dieselbe Konzentration an Zytokinen unterschiedlich stark reagieren, abhängig davon, ob man sie zuvor mit Zytokinen inkubiert hat oder nicht (Silberstein et al., 1989, Nathan et al., 1991). Dieses Vermögen einer verstärkten zellulären Reagibilität nach Kontakt mit einem stimulierenden Stoff nennt man Priming. Im Falle des Eosinophilen induziert Priming unter anderem Viabilität, Adhäsion, Transmigration und Degranulation. In der vorliegenden Arbeit konnte dies zum Beispiel anhand der Viabilität bei Stimulation mit den LTRA gezeigt werden. Hier zeigte sich ein anderes zelluläres Verhalten abhängig von der Kostimulation mit IL-3.

Der Zustand der Aktivierung ermöglicht dem Eosinophilen seine funktionelle Aufgaben, wie der Produktion und Degranulation von zelleigenen Mediatoren zu erfüllen. Die funktionellen Eigenschaften sind jedoch die einer normalen (normodensen) Zelle oder noch eingeschränkter (Prin et al., 1984). Ist die Zelle darüber hinaus geprimt, so ist seine Funktionalität um das Vielfache gesteigert.

Es gibt eine große Zahl von Substanzen, die den eosinophilen Granulozyten primen können. Physiologische Beispiele sind unter anderem Lipide (LTC<sub>4</sub>, PAF), Proteine, wie Zytokine (IL-3, IL-5), Komplementfaktoren (C5a) oder Immunglobuline (IgG) und Peptide (fMLP), aber auch Adhäsionsmoleküle ( $\beta_2$ -Integrine, CD62L, CD49d). *In vitro* lassen sich die Zellen mit PMA oder Calcimycin prä-aktivieren, die im Körper allerdings nicht vorkommen (Shindo et al., 1996). Zellen lassen sich sogar mit Second-messenger Analoga und auch mit bakteriellen Lipopolysacchariden primen. So ist die zellbiologische Konsequenz eines Agens, ob es nun

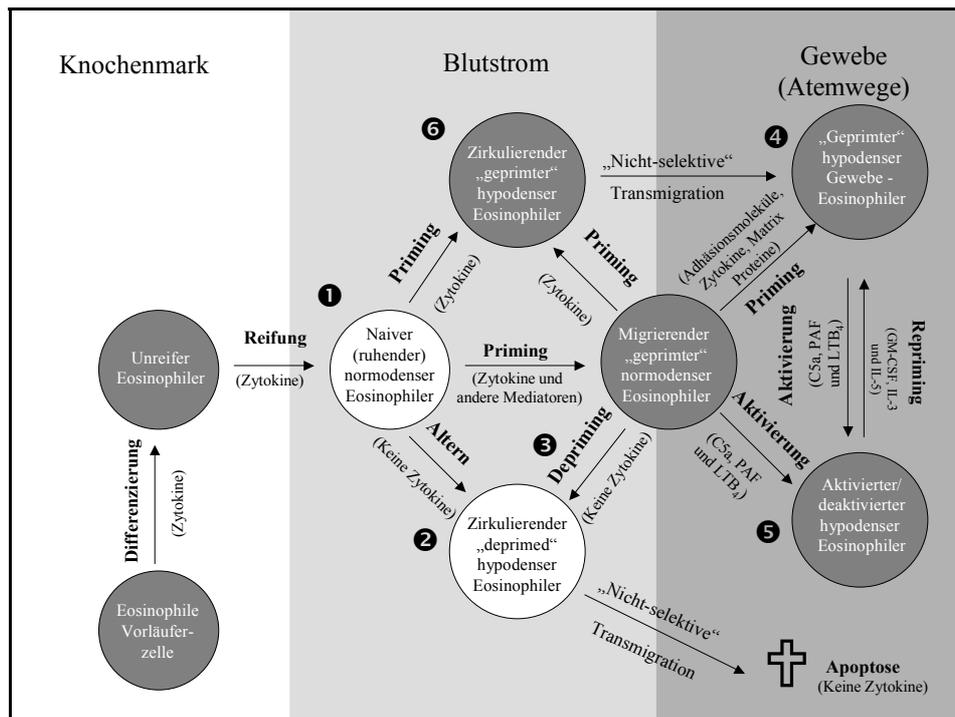
zum Priming oder zur Aktivierung der Zelle führt, eher abhängig von seiner Konzentration, als von seiner chemischen Natur. Faktoren wie kostimulierende Mediatoren, Medikamente, Adhäsionen mit anderen Zellen oder der extrazelluläre Matrix spielen dabei ebenfalls eine entscheidende Rolle. Deshalb spricht man heute nicht mehr von allein Primenden oder aktivierenden Substanzen.

Wie unterscheiden sich geprimte Eosinophile von nicht-geprimten Zellen?

Es besteht eine morphologische Heterogenität, die sich neben einem Auftreten von zytoplasmatischen Vakuolen in einer Veränderung der Zellgröße und -form, sowie der erhöhten Größe der Granula und einer erhöhten Anzahl von vesikotubulären Strukturen zeigt. Unter der Eosinophilen lassen sich im Sinne eines physikalischen Unterschiedes differierende Dichtetypen feststellen. In Pleura und im bronchoalveolären Lumen existieren hypodense Zellen, die größer sind als normale (normodense) Zellen, weniger und teilweise durchsichtige Granula in sich tragen, vermehrt Adhäsionsmoleküle exprimieren und eine gesteigerte Funktionalität aufweisen.

Phänotypisch unterscheidet sich der nicht-geprimte eosinophile Granulozyt aus dem Blut vom geprimten Eosinophilen aus der bronchoalveoläre Lavage (BAL) darin, dass einige Oberflächenrezeptoren hochreguliert, andere weniger exprimiert werden und einige erst dann entstehen, wenn eine Zelle geprimt ist.  $\beta_2$ -Integrine wie CD11b und CD11c, Aminopeptidase N (CD13), ICAM-1 (CD54), und einige mehr werden um 51-222 % hochreguliert. CD35, der VLA-4 Komplex (CD29/CD49d) und CD32 werden herunterreguliert und L-Selektin (CD62L) verschwindet vollständig von der Zelloberfläche. CD69 ist im Blut auf nicht geprimten Zellen kaum nachweisbar und wird erst auf geprimten Eosinophilen, z.B. in der BAL, exprimiert.

Auch funktionell unterscheidet sich der geprimte Eosinophile vom ungeprimten. Priming kann zu erhöhter Toxizität der Eosinophilen gegenüber eigenem Gewebe oder Parasiten durch vermehrte Ausschüttung von Sauerstoffradikalen und Lipidmediatoren, sowie Degranulation führen.



**Figur 3:** Darstellung der Differenzierung und des Priming des Eosinophilen (Kroegel et al., 2000).

Nach der Differenzierung, der Reifung und dem Verlassen des Knochenmarks hat die Zelle eine normale Dichte („normodens“) und ist funktionell passiv ❶. Wenn keine Krankheit vorliegt, wird die Zelle unselektiv in ein Gewebe einwandern und in die Apoptose gehen, ohne ihre Effektorfunktionen zu erfüllen („Altern“) ❷. Tritt jedoch eine Krankheit auf (z.B. Asthma bronchiale) führen die steigenden Konzentrationen an Zytokinen zum Priming der Zelle. Nun hat die Zelle eine Reihe von Möglichkeiten, sich zu entwickeln, je nach der Krankheitsaktivität und damit dem Mikromilieu. Wenn die Konzentration des aktivierenden Stimulus mit der Zeit abnimmt, kann der Priming-Phase eine Depriming-Phase folgen, die dazu führt, dass die Zelle areaktiv wird oder eine träge Reaktionsbereitschaft zeigt. In diesem Stadium kann sie durch Apoptose zugrunde gehen ❸. Andererseits können geprimte Zellen am Entzündungsort durch lokal freigesetzte Mediatoren zur transendothelialen Migration veranlasst werden. Die fortgesetzte Präsenz von primenden Stimuli (Adhäsionsmoleküle, extrazelluläre Matrixproteine) führt dazu, dass die Zelle ihren Zustand der gesteigerten Aktivität beibehält, während sie gleichzeitig einen hypodensen Phänotyp annimmt und noch weitere morphologische Veränderungen durchläuft ❹. Die Zelle nähert sich nun dem Entzündungsort, wo die höher werdende Konzentration an Zytokinen die vollständig zelluläre Aktivität induziert und damit die Freisetzung von Mediatoren und Effektormolekülen auslöst ❺. Dieser totalen Aktivierung folgt eine Desensitivierung, die die hypodense Zelle in einer funktionell inaktiven Phase verweilen lässt ❻. Jedoch können lokale Zytokine oder andere

Mediatoren die hyporeaktive deaktivierte Zelle reprimen, so dass sie somit teilweise oder volle Effektorfunktionen erhält ④. Wenn keine weiteren Mediatoren freigesetzt werden, zirkuliert die Zelle im Blutstrom, nimmt einen hypodensen Phänotyp an und wandert irgendwann unselektiv in das Gewebe ein ⑥. Dort setzt sie bei Kontakt mit extrazellulären Matrixproteinen oder anderen Rezeptoren aufgrund ihrer gesteigerten zellulären Aktivität ihre gespeicherten Effektormediatoren frei.

### **5.12 Bedeutung der Ergebnisse für das zellbiologische Verständnis**

Es ist wahrscheinlich, dass Priming eine Eigenschaft von allen Entzündungszellen, insbesondere dem eosinophilen Granulozyten ist, die durch eine Vielzahl von löslichen und nicht-löslichen Mediatoren getriggert wird. Jedoch ist Priming kein statischer Zustand einer Entzündungszelle, sondern entspricht eher einer temporären Phase in seinem Zyklus. Dieser Priming Phase könnte entweder eine komplette Zellaktivierung mit Erhöhung der zellulären Sensitivität, eine Unempfindlichkeit gegenüber Mediatoren oder einer Depriming Phase folgen. Weiterhin können hyporeaktive unempfindliche Zellen in einem entsprechenden Entzündungsmilieu einem Repriming untergehen. Diese Fähigkeit der Zelle einen Zyklus von Priming, Depriming und Repriming zu unterlaufen unterstreicht die Plastizität des Eosinophilen Granulozyten, die durch den Entzündungsvorgang und dem dadurch beeinflussten Mikromilieu getriggert wird.

Wie bereits erwähnt, ist Priming mit einer morphologischen, physikalischen und phänotypischen Veränderungen des Eosinophilen verbunden. Die Funktionalität der Zelle unterscheidet sich jedoch bei der desensitivierten, deprimten und reprimten Form. Deswegen kann auf die Funktionalität des Eosinophilen weder anhand seiner Umgebung noch anhand seiner morphologischen, physikalischen und phänotypischen Charakteristika geschlossen werden.

Der dynamische Prozess des Primings und die zelluläre Heterogenität sollten aus mehreren Gründen unter dem Begriff der Zellbiologischen Plastizität zusammengefasst werden.

Erstens impliziert der Begriff Heterogenität die Existenz definierter und statischer Subpopulationen des Eosinophilen, wohingegen zelluläre Plastizität die beobachteten Unterschiede der Zellen als dynamischen Prozess der Modulation von Oberflächenantigenexpression, Viabilität, Transmigration und Funktionalität beschreibt.

Zweitens bezieht der Begriff der zellulären Plastizität die Tatsache ein, dass Eosinophile nicht als statische biologische Einheiten betrachtet werden sollten, sondern eher also hoch dynamische Elemente, die sich ununterbrochen einer sich ändernden *in vivo* Situation

anpassen, die durch das umliegende Mikromilieu definiert wird. Dieses Mikromilieu wiederum wird durch benachbarte Zellen, wie Endothelzellen oder Lymphozyten, weiterhin der extrazellulären Matrix und lokal freigesetzten Mediatoren zusammengestellt.

Drittens unterstellt der Begriff zellbiologische Plastizität dem Eosinophilen die Eigenschaft, einen hyper-, hypo- und nicht-reaktiven funktionellen Status einzunehmen.

Viertens ist zelluläre Plastizität nicht auf die funktionelle Heterogenität beschränkt, sondern beschreibt auch nicht-funktionelle Eigenschaften, wie morphologische, physikalische und phänotypische Veränderungen am Eosinophilen.

Zusammenfassend stellen eosinophiles Priming und seine Heterogenität einen Teilaspekt einer größeren zellbiologischen Vorstellung dar, die auch andere zelluläre Eigenschaften, wie Depriming und Repriming einbezieht. Betrachtet man den eosinophilen Granulozyten von der Seite der eosinophilen Plastizität, so kann dies einem verbesserten Verstehen der Pathogenese von Asthma bronchiale dienen und der Entwicklung neuer Therapiestrategien dienen.

### **5.13 Limitationen der Arbeit**

Das in dieser Arbeit verwendete Blut wurde Patienten mit allergischer Rhinitis und mildem Asthma entnommen. Unter den Probanden fanden sich keine gesunden Patienten, damit eine Homogenität der Resultate sichergestellt werden konnte. Es wurde auf eine Kontrollgruppe mit gesunden Probanden verzichtet, weil die verwendeten Medikamente nur Asthmatikern verschrieben werden und hier die Auswirkungen am meisten interessierten. Unklar blieb, ob Eosinophile von Asthmatikern geprimt waren und sie deshalb gar nicht oder stärker bei bestimmter Stimulation reagierten (Kroegel et al., 2000).

Die dargestellte These zur Erklärung der verminderten Transmigration wird durch die Tatsache limitiert, dass die Expression von CD49d von ML signifikant gefördert wird, ZL jedoch keine statistisch signifikante Veränderung bewirkt. Weiterhin persistiert das Oberflächenantigen CD62L bei Stimulation mit ZL auf dem Eosinophilen, wohingegen ML keine Änderung der Expression von CD62L bewirkt. Beide Medikamente greifen am selben Rezeptor an und sollten eigentlich dieselbe zelluläre Wirkung zeigen. Erklären könnte man diesen Umstand damit, dass der jeweils andere LTRA zwar keinen klaren statistischen Erweis bringt, in der Tendenz aber den eosinophilen Granulozyten in dieselbe Richtung wie der andere LTRA beeinflusst.

Warum scheinen die LTRA in dieser Arbeit die Viabilität des eosinophilen Granulozyten zu erhöhen, wo doch in der Literatur beschrieben ist, dass Leukotriene die Viabilität erhöhen und ihre Rezeptor Antagonisten das Gegenteil tun (Lee et al., 1999)? Es ist denkbar, dass die

LTRA am durch IL-3 geprimten eosinophilen Granulozyten eine andere Wirkung haben, als am ungeprimten. Lees Ergebnisse zu LTRA bezogen sich nicht auf die Kombination mit IL-3. Er beschrieb einen eigenen viabilitätssenkenden Effekt der LTRA sowie einen antagonistischen Effekt der LTRA auf das überlebenssteigernde GM-CSF.

### **5.14 Zukünftige Arbeiten**

In zukünftigen Arbeiten sollte die Rolle der LTRA auf den geprimten eosinophilen Granulozyten im Rahmen der Transmigration und Viabilität genauer betrachtet werden. In diesem Zusammenhang sollten Leukotriene (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>) und ihre Auswirkungen auf Oberflächenantigen-Expression genauer studiert werden. Weiterhin ist es notwendig, die Rolle vom Histamin Antagonist Fexofenadin im allergischen Entzündungsgeschehen genauer zu untersuchen. Die in dieser Arbeit gezeigten direkten Einflüsse der Medikamente auf den Eosinophilen könnten in zukünftigen Arbeiten im Detail studiert werden.

Darüber hinaus interessiert der Einfluß der Medikamente auf die unterschiedlichen Zyklusphasen der zellulären Plastizität des Eosinophilen. Haben die Medikamente nur einen Effekt an der geprimten Zelle, können sie reprimen, oder gar deprimen?

Die Rolle des MMP-9 im asthmatischen Entzündungsgeschehen wurde in dieser Arbeit nur marginal geklärt und es bedarf hier ebenfalls weiterer Forschung.

Es bereitet noch Schwierigkeiten, den eosinophilen Granulozyten alleine sowie im Rahmen therapeutischer Alteration in die Gesamtheit der zellbiologischen Komplexizität einzuordnen. Klar ist, dass noch weitere Experimente zum besseren Verständnis seiner Funktion als Effektorzelle im allergischen Entzündungsgeschehen folgen müssen.

## 6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte die zellbiologische Plastizität humaner eosinophiler Granulozyten durch Stimulation mit physiologischen Mediatoren einerseits und Medikamenten der modernen Asthmatherapie dargestellt werden.

Es wurde mit Hilfe von Durchflußzytometrie, PCR, ELISA und Transmigrationsplatten Veränderungen des Eosinophilen beobachtet, die seine Plastizität im Rahmen des asthmatischen Entzündungsgeschehens verdeutlichen sollten.

Hierbei wurde festgestellt, dass die verwendeten Substanzen neben dem Phänotyp des eosinophilen Granulozyten seine Viabilität, Transmigration und Funktionalität verändern können. Zytokine wie IL-3, IL-5 und IFN- $\gamma$  zeigen allgemeine zellaktivierende Effekte und fördern Expression von Oberflächenantigene, Steigerung von Viabilität, sowie eine Abnahme von MMP-9 mRNA. Montelukast und Zafirlukast erhöhen beide die Expression des Adhäsionsmoleküls CD49d, wobei Zafirlukast darüber hinaus alleine eine vermehrte Expression von CD62L bewirkt. Möglicherweise wird dadurch die Transmigration des Eosinophilen gehemmt. Weiterhin erhöhen Leukotrien-Rezeptorantagonisten die Viabilität sowohl beim nativen als auch beim geprimten Eosinophilen. Es konnte ferner gezeigt werden, dass Leukotrien-Rezeptorantagonisten direkt auf den Eosinophilen wirken. Fexofenadin besitzt neben alterierender Effekte auf die Expression von Oberflächenstrukturen einen transmigrationshemmenden und viabilitätssteigernden Einfluß auf den eosinophilen Granulozyten. Bei Stimulation mit Nedocromil konnte gezeigt werden, dass die Substanz die Expression von CD32 reduziert. Die Matrix Metalloproteinase 9 Sekretion wird durch alleinige Stimulation mit LTRA, Antihistaminika und Chloridionenhemmer nicht beeinflusst. Es sind noch weitere Versuche notwendig, um den genauen Wirkmechanismus der verwendeten Substanzen im Geschehen des Asthma bronchiale einzuordnen.

## 7. Veröffentlichungen

Kuehl M, Foerster, Braun RK, Kroegel C. Modulation of human eosinophil phenotype by the leukotriene receptor antagonist montelukast. Effect of aminopeptidase N, Fc- $\gamma$ RII receptor and adhesion molecules. *AM J Respir Crit Care Med* 2000, 161: A334.

Kuehl M, Förster M, Braun RK, Zaune A, Kämena A, Kroegel C. Expression von Aminopeptidase N, Fc-RII Rezeptor und Adhäsionsmoleküle auf humanen eosinophilen Granulozyten. Modulation durch Montelukast. *Pneumologie* 2000, 54: S84.

Kuehl M, Förster M, Braun RK, Kroegel C. Modulation humaner eosinophiler Granulozyten durch Leukotrien-Rezeptorantagonisten (LTRA). Einfluß von Montelukast auf Phänotyp, Transmigration und Viabilität. *Pneumologie* 2001, 56: S76

## 8. Literaturverzeichnis

- Abdelaziz MM, Devalia JL, Khair OA, Bayram H, Prior AJ and Davies RJ (1998) Effect of fexofenadine on eosinophil-induced changes in epithelial permeability and cytokine release from nasal epithelial cells of patients with seasonal allergic rhinitis. *J.Allergy Clin.Immunol.* 101:410-420.
- Abdelaziz MM, Devalia JL, Khair OA, Rusznak C, Calderon M and Sapsford RJ (1997) The effect of nedocromil sodium on human airway epithelial cell-induced eosinophil chemotaxis and adherence to human endothelial cell in vitro *Eur.Respir.J.* 10:851-857.
- Abu GR, Fujisawa T, Mestecky J, Kyle RA and Gleich GJ. (1989) IgA-induced eosinophil degranulation. *J.Immunol.* 142:2393-2400.
- Alam R, Forsythe P, Stafford S and Fukuda Y (1994) Transforming growth factor beta abrogates the effects of hematopoietins on eosinophils and induces their apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 179:1041-1045.
- Anwar AR and Kay AB (1977) Membrane receptors for IgG and complement (C4, C3b and C3d) on human eosinophils and neutrophils and their relation to eosinophilia. *J.Immunol.* 119:976-982.
- Ayars GH, Altman LC, Gleich GJ, Loegering DA and Baker CB (1985) Eosinophil- and eosinophil granule-mediated pneumocyte injury. *J.Allergy Clin.Immunol.* 76:595-604.
- Back M, Kumlin M, Cotgreave IA and Dahlen SE (2001) An alternative pathway for metabolism of leukotriene D(4): effects on contractions to cysteinyl-leukotrienes in the guinea-pig trachea. *Br J Pharmacol.* Aug; 133(7):1134-44
- Capron M, Ameisen J and Capron A. (1989) Immunoglobulin receptors on eosinophil leukocytes. In: Kay AB *Eosinophils, Allergy and Asthma.* Oxford: Blackwell Scientific Publications 11-20.
- Capron M, Tomassini M, Torpier G, Kusnierz JP, MacDonald S and Capron A (1989). Selectivity of mediators released by eosinophils. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.* 88:54-58.
- Capron MPJ (1992) Eosinophil membrane receptor. Biological and clinical aspects. CRC Press.
- Cartier A, Thomson NC, Frith PA, Roberts R and Hargreave FE (1982) Allergen-induced increase in bronchial responsiveness to histamine: relationship to the late asthmatic response and change in airway caliber. *J.Allergy Clin.Immunol* 70:170-177.
- Changelian PS and Fearon DT. (1986) Tissue-specific phosphorylation of complement receptors CR1 and CR2. *J.Exp.Med.* 163:101-115.

- Clutterbuck EJ, Hirst EM and Sanderson CJ (1989) Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6, and GM-CSF. *Blood* 73:1504-1512.
- Corbel-M; Lagente-V; Theret-N; Germain-N; Clement-B and Boichot-E (1999) Comparative effects of betamethasone, cyclosporin and nedocromil sodium in acute pulmonary inflammation and metalloproteinase activities in bronchoalveolar lavage fluid from mice exposed to lipopolysaccharid *Pulm. Pharmacol. and Therap.* 12 (3): 165-171
- Dahlen SE, Bjork J, Hedqvist P, Arfors KE, Hammarstrom S and Lindgren JA (1981) Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78:3887-3891.
- Davis WB, Fells GA, Sun XH, Gadek JE, Venet A and Crystal RG (1984) Eosinophil-mediated injury to lung parenchymal cells and interstitial matrix. A possible role for eosinophils in chronic inflammatory disorders of the lower respiratory tract. *J.Clin.Invest.* 74:269-278.
- De Vos C (1999) H1-receptor antagonists: effects on leukocytes, myth or reality? *Clin.Exp.Allergy* 29 Suppl 3:60-63.
- Dibbert B, Daigle I, Braun D, Schranz C, Weber M and Blaser K (1998) Role for Bcl-xL in delayed eosinophil apoptosis mediated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5. *Blood* 92:778-783.
- Drazen JM, Austen KF, Lewis RA, Clark DA, Goto G and Marfat A (1980) Comparative airway and vascular activities of leukotrienes C1 and D in vivo and in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 77:4354-4358.
- Franco J and Artes MJ (1999) Pulmonary eosinophilia associated with montelukast *Thorax* 54:558-560.
- Frigas E, Loegering DA, Solley GO, Farrow GM and Gleich GJ (1981) Elevated levels of the eosinophil granule major basic protein in the sputum of patients with bronchial asthma. *Mayo Clin.Proc.* 56:345-353.
- Fujisawa T, Kato Y and Terada A (1999) Matrix metalloproteinase-9 in peripheral blood eosinophils *Int Arch Allergy Immunol.* 120 (Suppl 1):65-9
- Georas SN, Liu MC, Newman W, Beall LD, Stealey BA and Bochner BS (1992) Altered adhesion molecule expression and endothelial cell activation accompany the recruitment of human granulocytes to the lung after segmental antigen challenge. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 7:261-269.
- Gimbrone-MA J, Obin MS, Brock AF, Luis EA, Hass PE and Hebert CA (1989) Endothelial interleukin-8: a novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions. *Science* 246:1601-1603.

- Gleich GJ, Frigas E, Loegering DA, Wassom DL and Steinmuller D (1979) Cytotoxic properties of the eosinophil major basic protein. *J.Immunol.* 123:2925-2927.
- Gonzalez EB, Swedo JL, Rajaraman S, Daniels JC and Grant JA (1987) Ultrastructural and immunohistochemical evidence for release of eosinophilic granules in vivo: cytotoxic potential in chronic eosinophilic pneumonia. *J.Allergy Clin.Immunol.* 79:755-762.
- Hamada A and Greene BM (1987) Clq enhancement of IgG-dependent eosinophil-mediated killing of schistosomula in vitro. *J.Immunol.* 138:1240-1245.
- Hansel TT, Pound JD, Pilling D, Kitas GD, Salmon M and Gentle TA (1989) Purification of human blood eosinophils by negative selection using immunomagnetic beads. *J.Immunol.Methods* 122:97-103.
- Hartnell A, Moqbel R, Walsh GM, Bradley B and Kay AB (1990) Fc gamma and CD11/CD18 receptor expression on normal density and low density human eosinophils. *Immunology* 69:264-270.
- Holgate S (1993) Mediator and cytokine mechanism in asthma. *Thorax* 1993:103-109.
- Ingley E and Young IG (1991) Characterization of a receptor for interleukin-5 on human eosinophils and the myeloid leukemia line HL-60. *Blood* 78:339-344.
- Kay AB (1991) Asthma and inflammation. *J.Allergy Clin.Immunol.* 1991:893-910.
- Kim JT, Schimming AW and Kita H (1999) Ligation of Fc gamma RII (CD32) pivotally regulates survival of human eosinophils. *J.Immunol.* 162:4253-4259.
- Kroegel C (1998) *Asthma bronchiale Pathogenetische Grundlagen, Diagnostik und Therapie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York.
- Kroegel C, Braun RK, Haefner D, Kortsik C, Engelstätter R and Werner P (1993) Changes in T cell subsets and eosinophils in peripheral blood and BAL after segmental allergen provocation. *Am.Rev.Respir.Dis.* 147:A520-A520.
- Kroegel C, Foerster M, Hafner D, Grahmann PR, Warner JA and Braun R (2000) Putting priming into perspective - from cellular heterogeneity to cellular plasticity. *Immunol Today* 21:218-222.
- Kroegel C, Liu MC, Hubbard WC, Lichtenstein LM and Bochner BS (1994) Blood and bronchoalveolar eosinophils in allergic subjects after segmental antigen challenge: surface phenotype, density heterogeneity, and prostanoid production. *J.Allergy Clin.Immunol.* 93:725-734.
- Kroegel C, Liu MC, Lichtenstein LM and Bochner BS (1991) Antigen-induced eosinophil activation and recruitment in the lower airways. *J.Allergy Clin.Immunol* 87

- Kroegel C, Luttmann W, Zeck KG, Matthys H, Kapp A and Virchow JC (1994) Cell biology and function of eosinophilic granulocytes in immunologic inflammation. *Immun.Infekt.* 22:104-113.
- Kroegel C, Pleass R, Yukawa T, Chung KF, Westwick J and Barnes PJ (1989) Characterization of platelet-activating factor-induced elevation of cytosolic free calcium concentration in eosinophils. *FEBS Lett.* 243:41-46.
- Kroegel C, Virchow-JC J, Luttmann W, Walker C and Warner JA (1994) Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part I). *Eur.Respir.J.* 7:519-543.
- Kroegel C, Walker C and Haefner D (1994) Potential role of cytokines for eosinophil heterogeneity and function in asthma. Evidence to different functional states of BAL eosinophils in allergic airway inflammation following segmental antigen challenge. *J.Immunol.*;
- Kroegel C, Yukawa T, Westwick J and Barnes PJ (1989) Evidence for two platelet activating factor receptors on eosinophils: dissociation between PAF-induced intracellular calcium mobilization degranulation and superoxides anion generation in eosinophils. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 162:511-521.
- Lasky LA, Singer MS, Dowbenko D, Imai Y, Henzel WJ and Grimley C (1992) An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. *Cell* 69:927-938.
- Laviolette M, Ferland C, Comtois JF, Champagne K, Bosse M and Boulet LP (1995) Blood eosinophil leukotriene C4 production in asthma of different severities. *Eur.Respir.J.* 8:1465-1472.
- Lawrence MB and Springer TA (1991) Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 65:859-873.
- Lee E, Lindo T, Jackson N, Meng CL, Reynolds P and Hill A (1999) Reversal of human neutrophil survival by leukotriene B(4) receptor blockade and 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase activating protein inhibitors. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 160:2079-2085.
- Liu MC, Hubbard WC, Proud D, Stealey BA, Galli SJ and Kagey SA (1991) Immediate and late inflammatory responses to ragweed antigen challenge of the peripheral airways in allergic asthmatics. Cellular, mediator, and permeability changes. *Am.Rev.Respir.Dis.* 144:51-58.
- Lopez AF, Eglinton JM, Gillis D, Park LS, Clark S and Vadas MA (1989) Reciprocal inhibition of binding between interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to human eosinophils. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:7022-7026.
- Lopez AF, Eglinton JM, Lyons AB, Tapley PM, To LB and Park LS (1990) Human interleukin-3 inhibits the binding of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5 to basophils and strongly enhances their functional activity. *J.Cell Physiol.* 145:69-77.

- Lopez AF, Vadas MA, Woodcock JM, Milton SE, Lewis A and Elliott MJ (1991) Interleukin-5, interleukin-3, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor cross-compete for binding to cell surface receptors on human eosinophils. *J.Biol.Chem.* 266:24741-24747.
- Lucey DR, Nicholson WA and Weller PF (1989) Mature human eosinophils have the capacity to express HLA-DR. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86:1348-1351.
- Matsumoto K, Schleimer RP, Saito H, Iikura Y and Bochner BS (1994) Induction of apoptosis in human eosinophils by anti-Fas antibody treatment in vitro. *Blood* 86:1437-1443.
- Meltzer EO, Casale TB, Nathan RA and Thompson AK (1999) Once-daily fexofenadine HCl improves quality of life and reduces work and activity impairment in patients with seasonal allergic rhinitis. *Ann.Allergy Asthma Immunol.* 83:311-317.
- Migita M, Yamaguchi N, Mita S, Higuchi S, Hitoshi Y and Yoshida Y (1991) Characterization of the human IL-5 receptors on eosinophils. *Cell Immunol* 133:484-497.
- Motojima S, Frigas E, Loegering DA and Gleich GJ. (1989) Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea pig tracheal epithelium in vitro. *Am.Rev.Respir.Dis.* 139:801-805.
- Munoz NM, Hamann KJ, Rabe KF, Sano H, Zhu X and Leff AR (1999) Augmentation of eosinophil degranulation and LTC(4) secretion by integrin-mediated endothelial cell adhesion. *Am.J.Physiol.* 277:L802-L810
- Nathan C and Sporn M (1991) Cytokines in context. *J.Cell Biol.* 113:981-986.
- Nishikawa K, Morii T, Ako H, Hamada K, Saito S and Narita N (1992) In vivo expression of CD69 on lung eosinophils in eosinophilic pneumonia: CD69 as a possible activation marker for eosinophils. *J.Allergy Clin.Immunol.* 90:169-174.
- Ochiai K, Kagami M, Matsumura R and Tomioka H. (1997) IL-5 but not interferon-gamma (IFN-gamma) inhibits eosinophil apoptosis by up-regulation of bcl-2 expression. *Clin.Exp.Immunol* 107:198-204.
- Owen-WF J, Rothenberg ME, Silberstein DS, Gasson JC, Stevens RL and Austen KF (1987) Regulation of human eosinophil viability, density, and function by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in the presence of 3T3 fibroblasts. *J.Exp.Med.* 166:129-141.
- Paolieri F, Battifora M, Riccio AM, Bertolini C, Cutolo M and Bloom M (1998) Terfenadine and fexofenadine reduce in vitro ICAM-1 expression on human continuous cell lines. *Ann.Allergy Asthma Immunol.* 81:601-607.
- Pizzichini E, Leff JA, Reiss TF, Hendeles L, Boulet LP and Wei LX (1999) Montelukast reduces airway eosinophilic inflammation in asthma: a randomized, controlled trial *Eur.Respir.J.* 14:12-18.

- Plumas J, Gruart V, Aldebert D, Truong MJ, Capron M and Capron A (1991) Human eosinophils from hypereosinophilic patients spontaneously express the p55 but not the p75 interleukin 2 receptor subunit. *Eur.J.Immunol.* 21:1265-1270.
- Prin L, Charon J, Capron M, Gosset, Taelman H, Tonnel AB, Capron A. (1984) Heterogeneity of human eosinophils. II. Variability of respiratory burst activity related to cell density. *Clin. Exp. Immunol.* 57(3), 735-742
- Rand TH, Silberstein DS, Kornfeld H and Weller PF (1991) Human eosinophils express functional interleukin 2 receptors. *J.Clin.Invest.* 88:825-832.
- Resnick MB and Weller PF (1993) Mechanisms of eosinophil recruitment. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 8:349-355.
- Rothenberg ME, Owen-WF J, Silberstein DS, Woods J, Soberman RJ and Austen KF (1988) Human eosinophils have prolonged survival, enhanced functional properties, and become hypodense when exposed to human interleukin 3. *J.Clin.Invest.* 81:1986-1992.
- Saita N, Yamanaka T, Kohrogi H, Matsumoto M, Suga M and Ando M (1997) Expression of apoptosis-related antigen on eosinophils in chronic eosinophilic pneumonia. *Int.Arch Allergy Immunol.* 114 Suppl 1:64-66.
- Shindo K, Koide K, Hirai Y, Sumitomo M and Fukumura M (1996) Priming effect of platelet activating factor on leukotriene C4 from stimulated eosinophils of asthmatic patients. *Thorax* 51:155-158.
- Silberstein DS, Austen KF and Owen-WF (1989) Hemopoietins for eosinophils. Glycoprotein hormones that regulate the development of inflammation in eosinophilia-associated disease. *Hematol.Oncol.Clin.North Am.* 3:511-533.
- Sohei Makino TF (1995) Eosinophils and Allergy in Asthma. *Allergy Proc.* 16:13-21.
- Spada CS, Nieves AL, Krauss AH and Woodward DF (1994) Comparison of leukotriene B4 and D4 effects on human eosinophil and neutrophil motility in vitro. *J.Leukoc.Biol.* 55:183-191.
- Spry CFJ (1988) Eosinophils. A comprehensive review and guide to the scientific and medical literature. Oxford University Press.
- Stern M, Meagher L, Savill J and Haslett C (1992) Apoptosis in human eosinophils. Programmed cell death in the eosinophil leads to phagocytosis by macrophages and is modulated by IL-5. *J.Immunol.* 148:3543-3549.
- Tai PC and Spry CJ (1980) Enzymes altering the binding capacity of human blood eosinophils for IgG antibody-coated erythrocytes (EA). *Clin.Exp.Immunol.* 40:206-219.
- Testi R, D'Ambrosio D, De-Maria R and Santoni A (1994) The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today* 15:479-483.

- Thomas O. Wagner; Häufigkeitsangaben zum Asthma bronchiale; <http://yavivo.lifeline.de/Erkrankungen/Asthma/15Haeufigkeit.html>
- Turner CR, Smith WB, Andresen CJ, Swindell AC and Watson JW (1994) Leukotriene D4 receptor antagonism reduces airway hyperresponsiveness in monkeys. *Pulm.Pharmacol.* 7:49-58.
- Virchow JC, Jr., Braun RK, Kortsik C, Werner P, Matthys H and Blaser K (1993) In vivo activation of T lymphocytes and expression of surface antigens on eosinophils in blood and BAL in a case of eosinophilic pneumonia. *Am.Rev.Respir.Dis.* 147:A821-A821.
- Walsh GM, Sexton DW, Blaylock MG and Convery CM (1999) Resting and cytokine-stimulated human small airway epithelial cells recognize and engulf apoptotic eosinophils. *Blood* 94:2827-2835.
- Walsh GM, Williamson ML, Symon FA, Willars GB and Wardlaw AJ (1996) Ligation of CD69 induces apoptosis and cell death in human eosinophils cultured with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 87:2815-2821.
- Wedi B, Raap U, Lewrick H and Kapp A (1998) IL-4-induced apoptosis in peripheral blood eosinophils. *J.Allergy Clin.Immunol.* 102:1013-1020.
- Weller PF and Dvorak AM (1985) Arachidonic acid incorporation by cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. *Blood* 1985 65:1269-1274.
- Wenzel SE, Westcott JY, Smith HR and Larsen GL (1989) Spectrum of prostanoid release after bronchoalveolar allergen challenge in atopic asthmatics and in control groups. An alteration in the ratio of bronchoconstrictive to bronchoprotective mediators. *Am.Rev.Respir.Dis.* 139:450-457.
- Yang E and Korsmeyer SJ (1996) Molecular thanatopsis: a discourse on the bcl2 family and cell death. *Blood* 88:386-401.
- Yousefi S, Green DR, Blaser K and Simon HU (1994) Protein-tyrosine phosphorylation regulates apoptosis in human eosinophils and neutrophils. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:10868-10872.

## 9. Anhang

### 9.1 Danksagung

Die Arbeit wurde in dem pneumologischen Forschungslabor der Friedrich-Schiller Universität in Jena zwischen den Jahren 1997 und 2002 erstellt.

Mein Dank gilt zuerst Prof. Dr. Dr. C. Kroegel für die Themenstellung, die Begleitung, und die wissenschaftliche Betreuung meiner Promotionsarbeit.

Besonders danke ich dem Team des Labors, allen voran Yvonne Schlenker, Martin Förster und Ruedi Braun für die Motivation und Unterstützung während dieser Zeit.

Schließlich bedanke ich mich bei meiner Familie für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung. Hier möchte ich meine Mutter Charlotte Kühl hervorheben, die mir mit Rat und Tat bei der Lösung von Computerproblemen zur Seite stand.

## **9.2 Lebenslauf**

### Persönliche Daten

Name	Michael Kühl
Geburtstag	14.11.1976
Geburtsort	München

### Schulbildung

1982 - 1986	Grundschule Pullach im Isartal
1986 - 1995	Gymnasium Pullach
1995	Abitur

### Hochschulbildung

10/1995 - 04/2002	Medizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
08/1997	Physikum
08/1998	1. Staatsexamen
02/2001	2. Staatsexamen
04/2002	3. Staatsexamen

### Doktorarbeit

seit 10/1997	“Zellbiologische Plastizität humaner eosinophiler Granulozyten” unter Prof. Dr. Dr. Kroegel.
--------------	---

### Berufliche Tätigkeit

seit 08/2002	Arzt im Praktikum im Fach Herzchirurgie am Herzzentrum Leipzig
--------------	---

Ort, Datum

Michael Kühl

### **9.3 Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. Dr. C. Kroegel, Dr. R. Braun, Dr. M. Förster, Dipl. Ing. C. Kühl

Weiterhin erkläre ich, dass die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Michael Kühl