

**Charakterisierung allergeninduzierter immunologischer  
Reaktionen im Asthmodell und *ex vivo* in *Precision cut lung  
slices* (PCLS)**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochemikerin Maja Henjakovic

geboren am 04.06.1979 in Brcko, Bosnien und Herzegowina

-2008-

**Referent:** Prof. Dr. D. Steinhagen

**Korreferent:** PD Dr. A. Braun

**Prüfungstermin:** 18.09.2008

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde im Fraunhofer Institut für Toxikologie und experimentelle Medizin (Fraunhofer ITEM) unter Betreuung von PD. Dr. rer. nat. Armin Braun angefertigt.

Für die Möglichkeit diese Arbeit in der Abteilung Immunologie, Allergologie und Immuntoxikologie anfertigen zu können und sein stetes Interesse an wissenschaftlichen Fortschritten möchte ich herzlich Prof. Dr. Norbert Krug danken.

Mein besonderer Dank gilt Armin Braun für die interessante Themenstellung und die Schaffung großartiger Arbeitsbedingungen. Sein Bemühen über möglichst alle kleinen und großen wissenschaftlichen Ergebnisse dieser Arbeit informiert zu sein, seine Unterstützung diese Arbeit und seine ständige Diskussionsbereitschaft (auch Kritik) haben erheblich zum Fortschritt und Erfolg meiner Doktorarbeit beigetragen. Ich möchte ihm weiterhin danken, dass er mir im Rahmen dieser Arbeit viel Freiraum für eigene Ideen ließ, die Mitarbeit an Kooperationsprojekten ermöglichte und mich in politischen als auch bürokratischen Angelegenheiten in der Wissenschaft schulte.

Dr. rer. nat. Katherina Sewald, die diese Arbeit zusammen mit Armin Braun betreute, danke ich von ganzen Herzen für alles was sie in den letzten drei Jahren getan hat um mich zu unterstützen. Mit ihrer unkomplizierten Art hat sie mir bei vielen experimentellen Problemen geholfen und alle meine wissenschaftlichen Berichte mit wertvollen Kommentaren korrigiert. Ich danke ihr besonders dafür, dass sie sehr viel Zeit opferte um mir bei der sinnvollen Auswertung der vorgelegten Daten zu helfen, als auch dieses Manuskript kritisch zu korrigieren. Durch ihre Herzlichkeit schaffte sie für mich eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und stand mir auch bei vielen persönlichen Entscheidungen stets mit einem Rat zu Seite.

Für die Übernahme der externen wissenschaftlichen Betreuung dieser Arbeit danke ich herzlich Prof. Dr. rer. nat. Dieter Steinhagen (Tierärztliche Hochschule Hannover).

Ein Teil dieser Arbeit, in dem ich mich mit der Untersuchung der Korrelation zwischen *in vivo* und *ex vivo* Lungenfunktionsmessungen in Modellen für *Asthma bronchiale* beschäftigte, entstand in der Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Uhlig. Ich danke Prof. Uhlig, dass er seine wissenschaftliche Kompetenz zur Begutachtung von wissenschaftlichen Berichten wie auch für die Fragen zu statistischer Auswertung der Ergebnisse zur Verfügung stellte. Für eine erfolgreiche und sehr angenehme Kooperation im Rahmen dieses Projektes

und für die Durchführung von *ex vivo* Messungen der Bronchokonstriktion möchte ich herzlich Dr. rer. nat. habil Christian Martin danken.

Dr. rer. nat. Heinz-Gerd Hoymann danke ich vor allem für seine Beratung bei etlichen Fragen zu *in vivo* Messungen der Lungenfunktion. Für die praktische Einweisung in die invasive Lungenfunktionsmessung, die Mitarbeit an diesem Projekt und ihre Hilfsbereitschaft danke ich Regina Korolewitz.

Dr. Kerstin Mätz-Rensing danke ich für die Bereitstellung von Primatenlungen und eine erfolgreiche Kooperation (Primatenzentrum Göttingen).

Ich danke Simone-Monika Switalla, Tibor Veres, Sabine Rochlitzer, Sarah Herzog und allen hier nicht namentlich genannten Personen, die mir mehr als einmal bei verschiedenen Experimenten oder Fragestellungen im Rahmen dieser Arbeit geholfen haben und zu einer freundlichen Arbeitsatmosphäre beitrugen.

Bedanken möchte ich mich auch für die finanzielle Unterstützung der vorgelegten Arbeit. Die *ex vivo* Untersuchungen von Allergenen in PCLS aus Lungen nicht-sensibilisierter Tiere wurden durch das EU-Projekt Sens-it-iv finanziert. Das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) finanzierte die *ex vivo* versus *in vivo* Lungenfunktionsuntersuchungen in Modellen für *Asthma bronchiale*.

Letztendlich möchte ich mich bei meinem Ehemann Nesib und bei meinen Eltern bedanken, die mich in allen Situationen unterstützten und mir den Weg zu einer Doktorarbeit ermöglichten. Ich danke von ganzen Herzen Nesib für seine liebevolle Geduld und das Verständnis für meine Prioritäten in den letzten drei Jahren. Meinen Eltern danke ich vor allem dafür, dass sie an mich glauben und mich lehrten zielorientiert zu arbeiten.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1</b>	<b>Inhalation von Endotoxinen induziert bronchiale Entzündungen</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2</b>	<b>Respiratorische Allergie</b> .....	<b>8</b>
2.2.1	Immunbiologische Mechanismen bei der Entstehung einer respiratorischen Allergie ( <i>Asthma bronchiale</i> ) .....	9
2.2.2	Bronchokonstriktion im allergischen <i>Asthma bronchiale</i> .....	11
<b>2.3</b>	<b><i>In vivo</i> Modelle zur Identifizierung sensibilisierender Eigenschaften von Substanzen</b> .....	<b>12</b>
<b>2.4</b>	<b><i>In vitro</i> und <i>ex vivo</i> Modelle zur Testung sensibilisierender Eigenschaften von nieder- und hochmolekularen Substanzen</b> .....	<b>15</b>
2.4.1	<i>Precision cut lung slices</i> (PCLS) .....	16
2.4.1.1	.....Prospektiver Einsatz von PCLS als geeignete Ergänzungsmethode zum Tierversuch .....	17
<b>3</b>	<b>Ziele der Arbeit</b> .....	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>Tiere, Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
<b>4.1</b>	<b>Tiere</b> .....	<b>20</b>
4.1.1	Nager .....	20
4.1.2	Primaten .....	21
<b>4.2</b>	<b>Material</b> .....	<b>22</b>
4.2.1	Geräte .....	22
4.2.2	Software .....	23
4.2.3	Verbrauchsmaterial .....	24
4.2.4	Medien, Puffer und Agarose .....	25
4.2.5	Reagenzien .....	26
4.2.6	Farbstoffe und Antikörper .....	28
<b>4.3</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>29</b>
4.3.1	Präparative Methoden .....	29
4.3.1.1	Präparation von PCLS aus Maus- und Rattenlungen .....	29
4.3.1.2	Präparation von PCLS aus Pavian- und Rhesusaffenlungen .....	30

4.3.1.3 Exposition von PCLS mit nieder- und hochmolekularen Allergenen und immunmodulatorischen Substanzen .....	30
4.3.1.4 Isolierung von CD4 <sup>+</sup> -Zellen durch magnetische Zellseparation .....	32
4.3.1.5 Inkubation von PCLS mit CD4 <sup>+</sup> -Zellen aus DO11.10 Mäusen und LPS.....	33
4.3.1.6 Bronchoalveoläre Lavage (BAL) .....	33
4.3.2 Proteinbiochemische Methoden .....	34
4.3.2.1 Messung der Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität .....	34
4.3.2.2 MTT- <i>Assay</i> .....	34
4.3.2.3 Quantitative Proteinbestimmung durch <i>BCA Assay</i> .....	35
4.3.2.4 ELISA .....	36
4.3.2.5 Quantitative Bestimmung von Proteinen durch <i>Multiplex</i> -Analyse .....	37
4.3.3 Mikroskopische Methoden.....	40
4.3.3.1 Histologische Zelldifferenzierung in BAL .....	40
4.3.3.2 Konfokale Laserscanningmikroskopie und quantitative 3D-Bildanalyse .....	41
4.3.3.2.1 Calcein Acetylmethylester (AM)- und Ethidiumhomodimer-1 (EthD-1)- Färbung.....	41
4.3.3.2.2 Immunhistochemische Färbung der Lungenschnitte.....	41
4.3.3.2.3 Quantifizierung konfokaler Fluoreszenzaufnahmen .....	43
4.3.4 Allergisches Asthma im Ratten- und Mausmodell .....	44
4.3.4.1 Sensibilisierung und Provokationen mit OVA im Rattenmodell .....	44
4.3.4.2 Sensibilisierung und inhalative Provokationen mit Ovalbumin im Mausmodell..	45
4.3.4.3 Sensibilisierung mit TMA und DNCB im Mausmodell.....	46
4.3.4.4 Aerosolgenerierung und Detektionssysteme zur Erfassung von <i>in vivo</i> Lungenfunktionsparametern .....	47
4.3.4.5 Lungenfunktionsmessungen .....	50
4.3.4.5.1 <i>In vivo</i> Lungenfunktionsmessungen.....	50
4.3.4.5.2 <i>Ex vivo</i> Messung der Bronchokonstriktion in PCLS.....	51
<b>4.4 Statistische Auswertung.....</b>	<b>52</b>
<b>5 Ergebnisse .....</b>	<b>53</b>
<b>5.1 Immuntoxikologischen Effekte in PCLS.....</b>	<b>53</b>
5.1.1 Optimierung der Kultivierungsbedingungen von PCLS .....	53
5.1.2 Induzierte lokale Immunreaktionen in PCLS.....	57
5.1.2.1 Bakteriellcs LPS als Auslöser einer lokalen Immunreaktion in PCLS .....	57
5.1.2.2 Bakteriellcs Lipopeptid als Auslöser einer Immunantwort.....	64

5.1.2.3 Chemikalien-induzierte Irritation und Inflammation in lebenden Lungenschnitten	68
5.1.2.3.1 Immunmodulation in PCLS durch TMA	69
5.1.2.3.2 Zytotoxizität und Zytokin/Chemokin-Induktion durch DNCB	73
5.1.2.3.3 Irritationen in PCLS durch SDS	76
5.1.2.3.4 Zytotoxische und inflammatorische Wirkung von Formaldehyd in PCLS	77
5.1.2.3.5 Zytotoxische Wirkung von Kaliumdichromat in PCLS	79
5.1.2.3.6 Bestimmung der Toxizität des Waschmittelenzyms Alcalase in PCLS	81
5.1.2.4 Hochregulation und Suppression von Zelloberflächenproteinen antigenpräsentierender Zellen in PCLS	82
<b>5.2 In vivo und ex vivo Lungenfunktionsmessungen</b>	<b>90</b>
5.2.1 In vivo versus ex vivo Lungenfunktion und bronchiale Entzündung im Ovalbumin Rattenmodell	90
5.2.2 In vivo versus ex vivo Lungenfunktion und bronchiale Entzündung im Ovalbumin Mausmodell	95
5.2.3 In vivo versus ex vivo Lungenfunktion und bronchiale Entzündung nach TMA und DNCB Sensibilisierung im Mausmodell	100
<b>6 Diskussion</b>	<b>105</b>
<b>6.1 Ex vivo immuntoxikologische Untersuchungen in PCLS</b>	<b>105</b>
6.1.1 Charakterisierung der Zellvitalität in PCLS	105
6.1.2 Modulation von lokalen Immunreaktionen in PCLS durch bakterielle Membranbestandteile und Kortikosteroide	109
6.1.2.1 Bakteriell vermittelte Produktion von Zytokinen und Chemokinen in PCLS	109
6.1.2.2 Spezifische Inhibierung pro-inflammatorischer Effekte durch das Kortikosteroid Dexamethason	111
6.1.2.3 LPS-induzierte Hochregulation und Dexamethason-vermittelte Suppression von MHC Klasse II in lebenden Lungenschnitten	112
6.1.2.4 Bakterielle Lipopeptid-Derivate MALP-2 und BppCysMPEG als Auslöser einer Immunantwort in PCLS	115
6.1.3 Bekannte Allergene induzieren Irritation und Inflammation in PCLS	117
<b>6.2 Lungenfunktionsänderungen ex vivo in PCLS versus in vivo nach Sensibilisierung mit hoch- und niedermolekularen Allergenen</b>	<b>121</b>

## Inhaltsverzeichnis

6.2.1	Funktionalität des <i>ex vivo</i> Systems im Vergleich zu standardisierten <i>in vivo</i> Lungenfunktionsmessungen .....	121
6.2.2	Chemikalien-induziertes allergisches Asthma führt <i>ex vivo</i> und <i>in vivo</i> zu Veränderung der Lungenfunktion .....	124
<b>7</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>128</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>140</b>
<b>8.1</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>140</b>
<b>8.2</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>142</b>
<b>8.3</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>143</b>
<b>8.4</b>	<b>Eigene wissenschaftliche Veröffentlichungen zum Thema</b> .....	<b>146</b>
<b>8.5</b>	<b>Curriculum Vitae</b> .....	<b>148</b>

## 1.1 Zusammenfassung

Die Anzahl von Patienten, die an chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen wie COPD (*chronic obstructive pulmonary disease*) oder *Asthma bronchiale* leiden, stieg in den letzten zwei Jahrzehnten weltweit kontinuierlich an [WHO, 2007]. In Deutschland leiden mehrere Millionen Menschen an *Asthma bronchiale*. Diese obstruktive Lungenerkrankung ist in 80 % der Fälle mit einer IgE-abhängigen respiratorischen Allergie vom Typ I assoziiert. Respiratorische Allergie wird häufig durch überempfindliche Reaktionen des Immunsystems auf harmlose Umweltallergene wie Pollen, Hausstaub und Tierhaare ausgelöst. Es ist allerdings auch eine lange Liste von Xenobiotika (wie z.B. Industriechemikalien) bekannt, die eine respiratorische Allergie induzieren können.

Zum Schutz des Menschen vor der Entwicklung chronischer Erkrankungen des respiratorischen Traktes besteht zunehmend Bedarf an experimentellen Methoden, durch die Gefahrstoffe (z.B. Allergene und irritativ wirkende Substanzen) schnell und zuverlässig identifiziert werden. Seit 1. Juni 2007 müssen nach dem neuen europäischen Chemikaliengesetz (*Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals*, REACH) Chemikalien registriert und auf ihre gefährlichen Eigenschaften für Gesundheit und Umwelt getestet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in lebenden Lungenschnitten (*precision-cut lung slices*, PCLS) Irritations- und Inflammationsreaktion der Lunge erfasst und moduliert werden können. Dabei war es möglich, die Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren (z.B.  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\alpha$ ) in PCLS durch das bakterielle Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS) zu induzieren und diese Reaktion durch das Kortikosteroid Dexamethason wiederum zu supprimieren. Die Expression des Zelloberflächenmarkers MHC Klasse II auf antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APCs) in PCLS konnte ebenfalls durch LPS und Dexamethason moduliert werden. Synthetisches Lipopeptid *macrophage-activating lipopeptide-2* (MALP-2) in Kombination mit Interferon  $\gamma$  ( $\text{IFN}\gamma$ ) und das MALP-2-Derivat BppCysMPEG, die ebenfalls über Toll-like Rezeptoren (*toll-like receptors*, TLRs) auf Säugerzellen wirken, induzierten auch eine erhöhte Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine in PCLS.

In PCLS aus Lungen nicht-sensibilisierter Tiere wurden die Effekte von Industriechemikalien, deren allergenes Potential bereits bekannt ist, untersucht. Hierbei wurde gezeigt, dass toxikologische Effekte von Industriechemikalien wie z.B. Trimellitsäureanhydrid (*trimellitic*

## Zusammenfassung

*anhydride*, TMA) und 2,4-Dinitrochlorbenzol (*2,4-dinitrochlorobenzene*, DNCB) in PCLS zuverlässig erfasst werden können. Durch die Exposition von PCLS aus Lungen nicht-sensibilisierter Tiere mit Industriechemikalien wurde die Produktion von Zytokinen und Chemokinen nicht signifikant, aber tendenziell erhöht.

Weiterhin zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass in PCLS aus Lungen sensibilisierter Tiere eine Allergen-induzierte Bronchokonstriktion nachgewiesen werden kann. Es zeigte sich eine sehr gute Korrelation der *ex vivo* Bronchokonstriktion in PCLS mit den *in vivo* Lungenfunktionsmessungen im klassischen Ovalbumin-induzierten Asthmamodell.

Auch nach einer Sensibilisierung der Tiere mit den Industriechemikalien TMA und DNCB konnte eine Übereinstimmung auf der Ebene der Bronchokonstriktion *in vivo* und *ex vivo* nachgewiesen werden. Diese Studie zeigte, dass TMA allergische Sensibilisierung mit Inflammation des respiratorischen Traktes und Atemwegshyperreagibilität *in vivo* und *ex vivo* induziert. Die Sensibilisierung mit DNCB beeinflusste diese Endpunkte nicht.

Die Ergebnisse von parallel durchgeführten *in vivo* und *ex vivo* Untersuchungen zeigten, dass *ex vivo* Messung der Bronchokonstriktion in PCLS eine viel versprechende Ersatzmethode für klassische *in vivo* Lungenfunktionsmessungen darstellt.

**Schlagwörter:** Präzisions-geschnittene Lungenschnitte, lokale Immunantwort, Bronchokonstriktion

## 1.2 Abstract

The number of patients suffering from chronic respiratory lung diseases like COPD (chronic obstructive pulmonary disease) or asthma bronchiale increased continuously over the last two decades [WHO, 2007]. In Germany several millions people suffer from asthma bronchiale. This obstructive lung disease is associated in 80 % with a IgE dependent respiratory allergy of type I. Respiratory allergy is hypersensitive reaction of the immune system to harmless environmental allergens such as pollen, house mites, and animal hair. It is also known that a wide range of xenobiotics (e.g. industrial chemicals) induces respiratory allergy.

To avoid the development of chronic diseases in the respiratory tract of humans experimental methods for a fast and secure identification of hazardous substances are needed. Since 1 June 2007 all chemicals must be registered and tested for their hazardous potential for human health and environment based on a new European Community Regulation (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals, REACH).

In this work it was shown that irritation and inflammation can be detected and modulated in living lung slices (precision-cut lung slices, PCLS). The release of pro-inflammatory mediators (e.g.  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\alpha$ ) in PCLS was induced by bacterial endotoxine (lipopolysaccharide, LPS) and suppressed by corticosteroid dexamethasone. The expression of cell surface marker MHC class II on antigen presenting cells (APCs) was also modulated by LPS and dexamethasone in PCLS. Synthetic lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) in combination with interferon  $\gamma$  ( $\text{IFN}\gamma$ ) and the MALP-2 derivative BppCysMPEG which also interacts with toll-like receptors (TLRs) in mammalian cells induced an increased release of pro-inflammatory cytokines and chemokines in PCLS.

The effects of industrial chemicals with known allergenic potential were tested in PCLS from lung of non-sensitized animals. It was shown that toxicological effects of industrial chemicals e.g. trimellitic anhydride (TMA) and 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) were clearly detectable in PCLS. The exposure of PCLS from lungs of non-sensitized animals with industrial chemicals did not induce significant changes, but tends to increase the production of cytokines and chemokines.

Furthermore, the present results of this work demonstrate that allergen induced bronchoconstriction was detectable in PCLS from lungs of sensitized animals. The *ex vivo* bronchoconstriction in PCLS correlated well with *in vivo* lung function measurements in a ovalbumin induced model for asthma.

## Abstract

After sensitization of the animals with industrial chemicals TMA and DNCB a well correlation was also shown based on bronchoconstriction between *in vivo* and *ex vivo*. This study showed that TMA induces allergic sensitization, inflammation of the respiratory tract, and airway hyperresponsiveness *in vivo* and *ex vivo*. DNCB did not affect any of the endpoints.

The findings of parallel *in vivo* and *ex vivo* investigations has shown that *ex vivo* measurement of bronchoconstriction in PCLS represent a promising alternative method for classical *in vivo* lung function measurements.

**Keywords:** precision-cut lung slices, local immune response, bronchoconstriction

## 2 Einleitung

### 2.1 Inhalation von Endotoxinen induziert bronchiale Entzündungen

Die Anzahl von Menschen, die an einer chronischen Inflammation des respiratorischen Traktes leiden, stieg in letzten zwei Jahrzehnten weltweit kontinuierlich an [WHO, 2007]. Eine chronisch bronchiale Inflammation kann durch unterschiedliche Antigene (z.B. bakterielle Zellwandbestandteile oder allergen wirkende Substanzen) und Einflüsse ausgelöst werden.

Es ist bekannt, dass inhalierte Endotoxine (bakterielle Zellwandbestandteile) eine der Ursachen für verschiedene Atemwegserkrankungen darstellen. Bei Menschen wurde gezeigt, dass Inhalation von Endotoxinen zu chronischen Inflammation des respiratorischen Traktes mit Asthma-ähnlichen Symptomen führt [Radon *et al.*, 2002]. Inhalierte Endotoxine verursachen Atemwegserkrankungen, indem Immunzellen an die betroffenen Stellen angelockt werden und Mediatoren freisetzen, was zu physiologischen Änderungen im respiratorischen Trakt von gesunden Menschen führt [Jagiello *et al.*, 1996].

Vor allem im Zigarettenrauch enthaltene Endotoxine induzieren Entzündungen in Atemwegen von Rauchern durch Aktivierung von Makrophagen und Epithelzellen, die zur Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren (Interleukin (IL)-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-8) [Kuschner *et al.*, 1996] führen. Die Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren geht mit einer Infiltration von weiteren Entzündungszellen (Makrophagen und neutrophilen Zellen) in den bronchoalveolären Raum, einer kontinuierlichen Zerstörung des Gewebes und letztendlich einer verminderten Lungenfunktion durch irreversible Verengung der Atemwege einher [Kuschner *et al.* 1996].

Wiederholte Inhalation von Endotoxinen ist assoziiert mit der Entstehung von chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD), die umgangssprachlich „Raucherlunge“ genannt wird. COPD stellt inzwischen eine der häufigsten Todesursachen weltweit dar. Im Gegensatz zu Asthma ist die entzündungsbedingte Verengung der Atemwege (Bronchialobstruktion bzw. Bronchokonstriktion) bei COPD nicht reversibel, sondern dauerhaft.

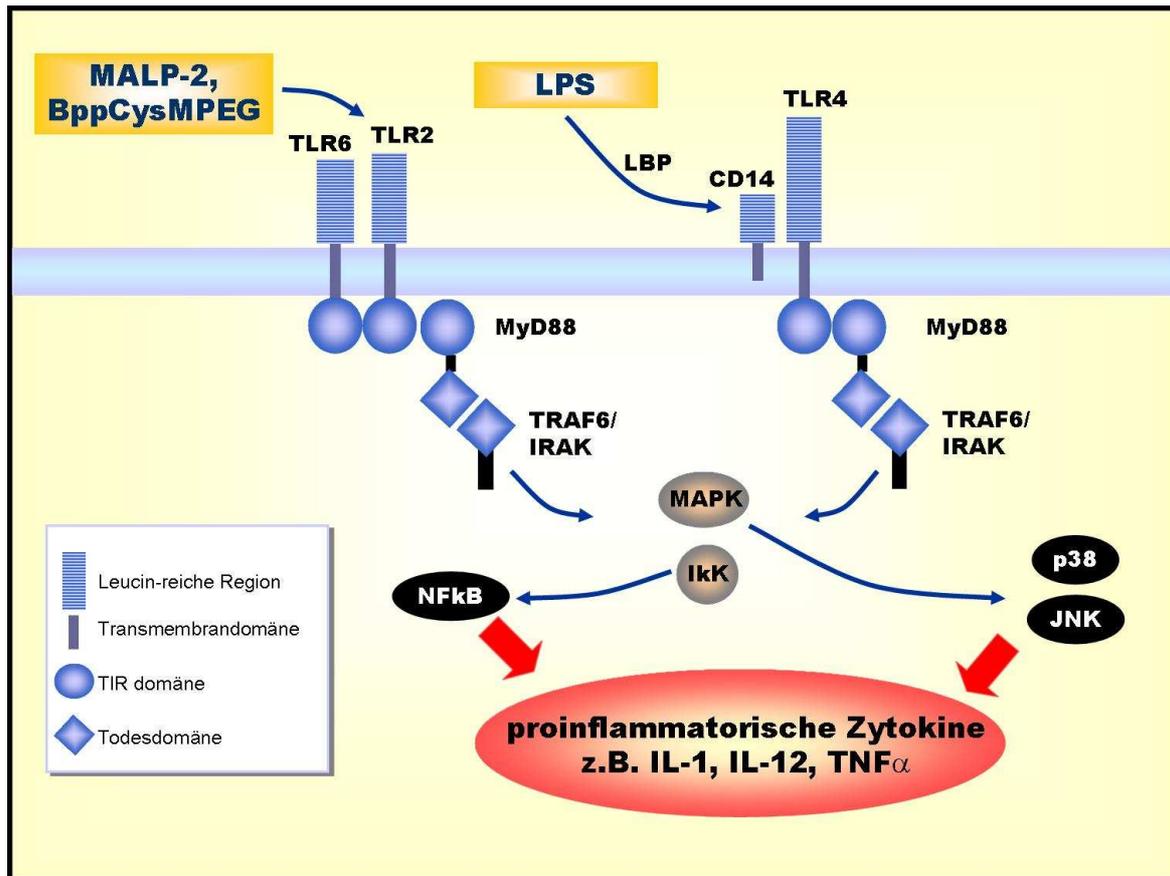
Endotoxine, wie Lipopolysaccharid (LPS) werden von Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt und lösen eine inflammatorische Immunantwort aus. Die Interaktion von Immunzellen, wie Makrophagen und dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DCs) mit LPS

## Einleitung

erfolgt über Rezeptoren, die pathogenassoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) erkennen [Medzhitov, 2001]. Durch LPS wird der Toll-like Rezeptor 4 (TLR 4)-abhängige Signaltransduktionsweg induziert [Medzhitov, 2001]. Zur Induktion dieses Signalweges über TLR 4 sind das LPS-bindende Protein (LBP) und CD14 notwendig [Medzhitov, 2001]. CD14 ist ein hochaffiner LPS-Rezeptor und kommt frei im Plasma oder durch Glycosylphosphatidylinositol (GPI) an die Zellmembran verankert vor [Medzhitov, 2001].

LPS wird extrazellulär durch LBP und CD14 gebunden [Medzhitov, 2001]. Die Interaktion von CD14 mit TLR 4 setzt eine Signaltransduktionskaskade in Gang, die den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktiviert [Medzhitov, 2001]. NF- $\kappa$ B aktiviert im Zellkern die Gentranskription zahlreicher Gene, durch die die Synthese pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine induziert wird [Medzhitov, 2001]. Während der TLR 4-abhängigen Signaltransduktion werden auch Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) wie p38, ERK 1/2 und JNK aktiviert, die ihrerseits ebenfalls Transkriptionsfaktoren beeinflussen, die die Synthese pro-inflammatorischer Proteine kontrollieren [Guha *et al.*, 2001].

Andere pathogenassoziierte molekulare Muster wie Peptidoglykane, Lipoproteine und Lipopeptide interagieren auch mit TLRs (z.B. TLR 2) auf den Oberflächen von Säugerzellen und aktivieren Signaltransduktionswege des angeborenen Immunsystems. TLR 2 erkennt u.a. bakterielle Lipoproteine und Lipopeptide gram-positiver Bakterien. Die Lipopeptide, wie *macrophage-activating lipopeptide-2* (MALP-2) und das Konjugat aus MALP-2 und Polyethylenglykol (PEG) BppCysMPEG werden ebenfalls von TLRs erkannt. Es ist bekannt, dass das synthetische Lipopeptid MALP-2 durch einen aus TLR 2 und TLR 6 bestehenden Heterodimer auf der Zelloberfläche von Makrophagen und DCs gebunden wird [Takeuchi *et al.*, 2001].



**Abb. 1: LPS- und Lipopeptid-induzierte Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen**

Die Bindung von LPS durch LBP und CD14 und die anschließende Interaktion von CD14 mit TLR 4 induziert eine Signaltransduktionskaskade, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB und von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) wie p38 und JNK führt. Dadurch wird die Transkription von Genen aktiviert, durch die die Synthese pro-inflammatorischer Zytokine (z.B. IL-1, IL-12, TNF $\alpha$ ) induziert wird. Lipopeptide MALP-2 und BppCysMPEG werden von Heterodimeren, die aus TLR 2 und TLR 6 gebildet werden, extrazellulär gebunden.

Es ist vielfach nachgewiesen worden, dass die Endotoxin-induzierten chronischen Atemwegserkrankungen bei Rauchern und Farmarbeitern mit einer Th1-vermittelten Immunreaktion assoziiert sind. Allerdings werden seit einigen Jahren wissenschaftliche Nachweise erbracht, dass wiederholter Kontakt mit Endotoxinen im frühen Kindesalter die T-Lymphozyten vom Typ 1 (Th1)-Immunantwort prägt und Th2-induzierte Reaktion, die mit einer Allergie einhergeht, unterdrückt. In der sogenannten „Hygiene Hypothese“ wurde postuliert, dass dadurch im frühen Kindesalter eine höhere Toleranz gegenüber Keimen, Stäuben und Tierhaaren geprägt wird [Zeldin *et al.*, 2006]. Es ist anzunehmen, dass aus diesem Grund Kinder, die auf den Bauernhöfen aufwachsen viel seltener an *Asthma bronchiale* und *Rhinitis* erkranken als Kinder, die seit ihrer Geburt in Großstädten leben [Braun-Fahrlander *et al.*, 2002]. Die Gründe hierfür sind noch nicht vollständig geklärt.

Zurzeit werden verschiedene Studien zur Identifizierung und Charakterisierung von bakteriellen Bestandteilen, die für eine Unterdrückung respiratorischer Allergie verantwortlich sind, aufwendig durchgeführt [Zeldin *et al.*, 2006].

## 2.2 Respiratorische Allergie

Chronisch obstruktive respiratorische Erkrankung allergisches *Asthma bronchiale* tritt in letzten zwei Jahrzehnten überall in Europa immer häufiger auf und stellt ein ernstzunehmendes Gesundheitsproblem dar [GINA, 2007]. *Asthma bronchiale* ist eine IgE-abhängige respiratorische Hypersensitivität. Ein IgE-unabhängiger Asthmatyp („intrinsisches Asthma“) ist bekannt, aber noch nicht hinreichend erforscht. Allergisches *Asthma bronchiale* („extrinsisches Asthma“) wird viel häufiger diagnostiziert und durch hypersensitive Reaktionen auf Proteine und Xenobiotika (Fremdstoffe) im oberen und unteren respiratorischen Trakt manifestiert [Boverhof *et al.*, 2008].

Asthmatiker zeigen vorwiegend eine antigenspezifische IgE-Immunantwort auf harmlose Umweltallergene wie Pollen, Hausstaubmilben und Tierhaare. Berufbedingtes *Asthma bronchiale* kann dagegen durch Expositionen am Arbeitsplatz mit hochmolekularen (HWM) Allergenen (z.B. Waschmittelproteinen) und niedermolekularen (LWM) Allergenen (z.B. Industriechemikalien) induziert werden [Mapp *et al.*, 2005].

Die pathophysiologischen Mechanismen im berufsbedingten *Asthma bronchiale* sind substanzspezifisch, weshalb noch keine genaue Definition dieser respiratorischen Atemwegserkrankung vorliegt. Europäische Experten sind sich jedoch einig, dass berufsbedingtes *Asthma bronchiale* diagnostiziert werden sollte, wenn die Exposition von Patienten am Arbeitsplatz klar mit typischen Symptomen für diese Erkrankung assoziiert sind [Vandenplas *et al.*, 2003]. IgE-vermitteltes berufsbedingtes Asthma wird besonders im Fall von Säureanhydriden ausgelöst [Jarvis *et al.*, 2005].

Säureanhydride sind niedermolekulare Chemikalien (z.B. Trimellitsäureanhydrid, TMA), die in hohen Konzentrationen vorwiegend toxische bzw. irritative Reaktionen auslösen. In geringen Konzentrationen kann durch TMA das adaptive Immunsystem aktiviert und eine Th2-vermittelte respiratorische Allergie mit asthmatischen Symptomen auslöst werden. Niedermolekulare Chemikalien wie TMA gehören zu den Haptenen d.h. ihre Wirkung auf Zellen des Immunsystems ist erst nach Bindung an ein Trägerprotein (z.B. körpereigene Proteine) möglich.

### 2.2.1 Immunbiologische Mechanismen bei der Entstehung einer respiratorischen Allergie (*Asthma bronchiale*)

Eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von allergischem *Asthma bronchiale* spielen Epithelzellen, DCs und antigenspezifische T-Lymphozyten [Lambrecht *et al.*, 2003, Hammad *et al.*, 2008]. Diese Zellen sind maßgeblich an der Sensibilisierungsphase und der Entwicklung des immunologischen Gedächtnisses während der Entstehung einer respiratorischen Allergie beteiligt (Abb. 2).

Eine besonders wichtige Rolle bei der Entstehung von allergischem *Asthma bronchiale* wird dabei den DCs zugeordnet [Lambrecht *et al.*, 2001]. DCs können naive antigenspezifische Lymphozyten (B- und T-Zellen) aktivieren und die Reaktionen des angeborenen und adaptiven Immunsystems kontrollieren. So können DCs die Differenzierung und die Proliferation von Th1- und Th2-Zellen induzieren oder eine Toleranz gegenüber dem Antigen durch Aktivierung von regulatorischen T-Zellen (Treg) auslösen [Banchereau *et al.*, 1998, Kuipers *et al.*, 2004, Kool *et al.*, 2007].

Neue Studien zeigten, dass DCs in der Lage sind, *tight-junctions* zwischen Epithelzellen zu lösen und mit Hilfe ihrer Zellausläufer (Dendriten) auf dem Atemwegsepithel lokalisierte Antigene zu binden und aufzunehmen [Hammad *et al.*, 2008, Suppl.]. Eine Aktivierung und Reifung von DCs erfolgt dennoch in meisten Fällen durch eine Aufnahme von Antigenen, die die geschädigte Epithelschicht durchdrungen haben und ein entsprechendes Signal (z.B. Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren durch geschädigte Epithelzellen) induzieren (Abb. 2). Eine Schädigung der Barriere des Atemweges bewirken Allergene, wie z.B. proteolytisch wirkende Proteine (z.B. Der p1, das Hauptallergen einer Hausstaubmilbe). Weiterhin können DCs durch freigesetzte Zytokine und Chemokine von aktivierten Epithelzellen (über TLRs) an den Ort des Geschehens angelockt, aktiviert und zur Induktion von T-Zell-Immunreaktionen polarisiert werden [Hammad *et al.*, 2008].

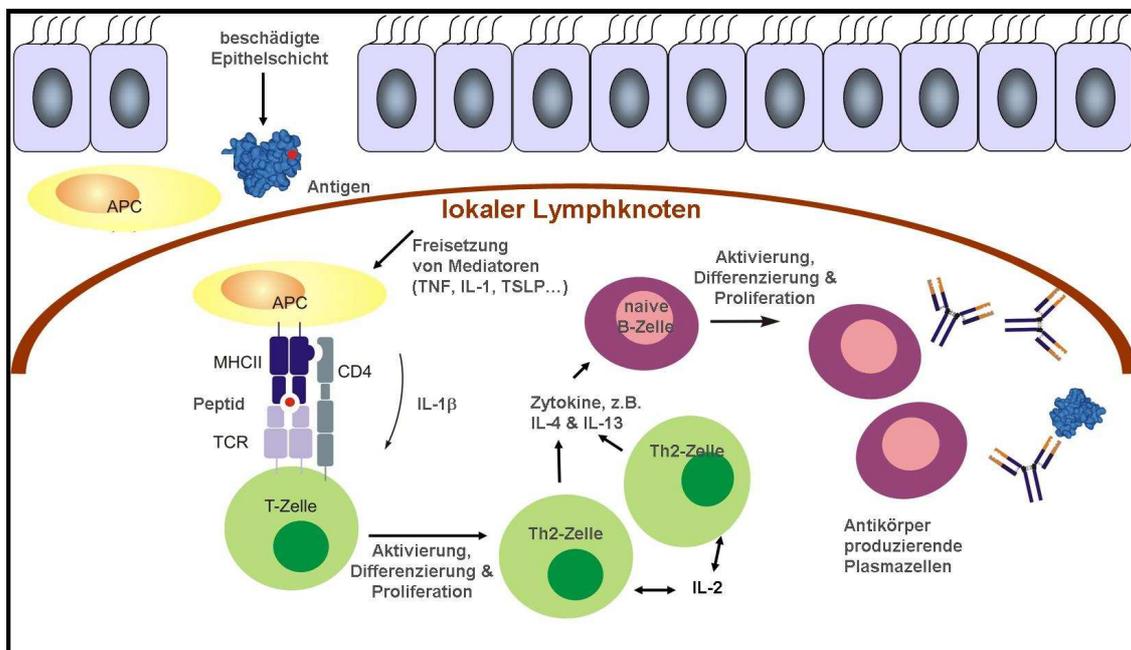
Nach Allergenaufnahme reifen und wandern DCs zum Lymphknoten (Abb. 2). Dabei exprimieren DCs co-stimulatorische Proteine wie CD40, CD80, CD83 und CD86 und weisen eine starke MHC Klasse II Expression auf [Hammad *et al.*, 2007].

Durch die Interaktion von MHC Klasse II-Peptid-Komplexen auf DCs mit T-Zell-Rezeptoren (TCR) werden naive antigenspezifische T-Zellen aktiviert (Abb. 2). Diese Interaktion initiiert eine komplexe Kaskade von Ereignissen, in der andere Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems, wie auch residente Zellen beteiligt sind. Auch die Präsentation des Antigens

## Einleitung

durch naive oder B-Gedächtniszellen, die ebenfalls zu professionellen antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APCs) gezählt werden, aktiviert naive antigenspezifische T-Zellen (Abb. 2).

Es erfolgt zunächst eine Differenzierung, klonale Selektion und Proliferation antigenspezifischer Th2-Lymphozyten (Abb. 2). Die Freisetzung von IL-2 durch aktivierte T-Zellen stimuliert die T-Zell-Proliferation (Abb. 2) [Burchill *et al.*, 2007]. Die T-Zell-Proliferation wird auch durch das pro-inflammatorische Zytokin IL-1 $\beta$  induziert (Abb. 2) [Rougier *et al.*, 1998]. Weiterhin setzen aktivierte Th2-Zellen die Zytokine IL-4 und IL-13 frei, die eine Differenzierung und klonale Selektion von antigenspezifischen B-Zellen induzieren (Abb. 2) [Kuhn *et al.*, 1991].



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Aktivierung von T- und B-Zellen während der Sensibilisierung des respiratorischen Traktes**

Inhalierete Antigene schädigen oder aktivieren Epithelzellen, die eine mechanische Atemwegsbarriere bilden und dringen ins Gewebe ein. Aktivierte Epithelzellen setzen Zytokine und Chemokine frei, die andere Zellen (APCs z.B. DCs) anlocken, aktivieren und polarisieren. DCs nehmen Antigene auf, prozessieren und präsentieren sie naiven antigenspezifischen T-Zellen im Lymphknoten. Durch die Interaktion von MHC Klasse II (MHCII):Peptid-Komplexen mit den T-Zell-Rezeptoren und CD4, werden naive T-Zellen zur Differenzierung, klonalen Selektion und Proliferation aktiviert. Die Proliferation von T-Zellen wird durch Zytokin IL-2 als auch IL-1 $\beta$  unterstützt. Aktivierte antigenspezifische Th2-Zellen setzen Zytokine IL-4 und IL-13 frei, die naive B-Zellen zu Differenzierung und Proliferation aktivieren. Antikörper produzierende Plasmazellen sezernieren antigenspezifische Antikörper (IgE).

An der Entzündungsquelle lokalisierte Zellen setzen Zytokine und Chemokine frei, durch die eine Wanderung antigenspezifischer Th2-Zellen über die Blutgefäße ins Gewebe induziert wird. Th2-Zellen lösen im Gewebe antigenspezifische Immunreaktionen aus, in die Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems, wie auch residente Zellen involviert sind.

### **2.2.2 Bronchokonstriktion im allergischen *Asthma bronchiale***

Die Veränderungen in der Lungenfunktion nach einer akuten Allergenprovokation im allergischen *Asthma bronchiale* lassen sich in eine frühe Phase (EAR: *early allergic response* dt. allergische Frühphasereaktion) und eine späte Phase (LAR: *late allergic response* dt. allergische Spätphasereaktion) untergliedern, denen jeweils unterschiedliche immunologische Prozesse zu Grunde liegen [Boverhof *et al.*, 2008]. Eine zentrale Rolle bei der Induktion und der Aufrechterhaltung der bronchialen Inflammation kommt dabei den antigenspezifischen T-Zellen zu (Abb. 2).

Die Mastzellen, die basophilen und die eosinophilen Zellen spielen eine entscheidende Rolle bei der EAR im *Asthma bronchiale* [Larche, 2006]. Diese Entzündungszellen binden durch ihren hochaffinen Fcε-Rezeptor antigenspezifisches IgE. Die Quervernetzung des zellgebundenen IgEs bewirkt eine Degranulation von Mastzellen, eosinophilen und basophilen Zellen. Die dabei freigesetzten Mediatoren wie Histamin, Leukotrienen, Prostaglandinen, plättchenaktivierenden Faktoren und Zytokinen (z.B. IL-4, IL-5, IL-13) induzieren Bronchokonstriktion, Schleimhautödeme und mukosale Hypersekretion [Barnes, 2008]. In Folge einer akuten Allergenprovokation kann die EAR als Änderung der Lungenfunktion erfasst werden.

Zur LAR tragen eine Aktivierung des Atemwegsepithels und die Rekrutierung von neutrophilen und vor allem eosinophilen Granulozyten in das Lungengewebe bei. Die eosinophilen Zellen produzieren eine Reihe von zytotoxischen Substanzen und pro-inflammatorischen Mediatoren und leiten damit inflammatorische Prozesse ein. In Folge tritt zunächst eine Epithelschädigung verbunden mit einer Hyperreaktivität der Atemwege (*airway hyperresponsiveness*, AHR) auf [O'Byrne *et al.*, 2003, Boverhof *et al.*, 2008].

Die AHR ist definiert als der Grad, wie Atemwege auf unspezifische Stimuli mit einer Konstriktion reagieren [O'Bryne *et al.*, 2003]. Diese Stimulation kann durch bronchokonstriktorisch wirkenden Substanzen wie Methacholin (MCh) nachgestellt werden [O'Bryne *et al.*, 2003]. Dabei reagieren Asthmatiker auf bronchokonstriktorisch wirkende

Substanzen im Vergleich zu gesunden Individuen bereits bei viel geringeren Dosen mit einer Atemwegsverengung [O'Bryne *et al.*, 2003].

### **2.3 *In vivo* Modelle zur Identifizierung sensibilisierender Eigenschaften von Substanzen**

Zur Aufklärung von Mechanismen, die für die Entwicklung einer respiratorischen Allergie verantwortlich sind und zur Identifizierung sensibilisierender Substanzen, wie auch zur Testung pharmakologischer Wirkstoffe für *Asthma bronchiale* werden zumeist *in vivo* Tiermodelle eingesetzt. Tiere, die dabei bevorzugt eingesetzt werden, sind Maus, Ratte, Meerschweinchen und Primaten.

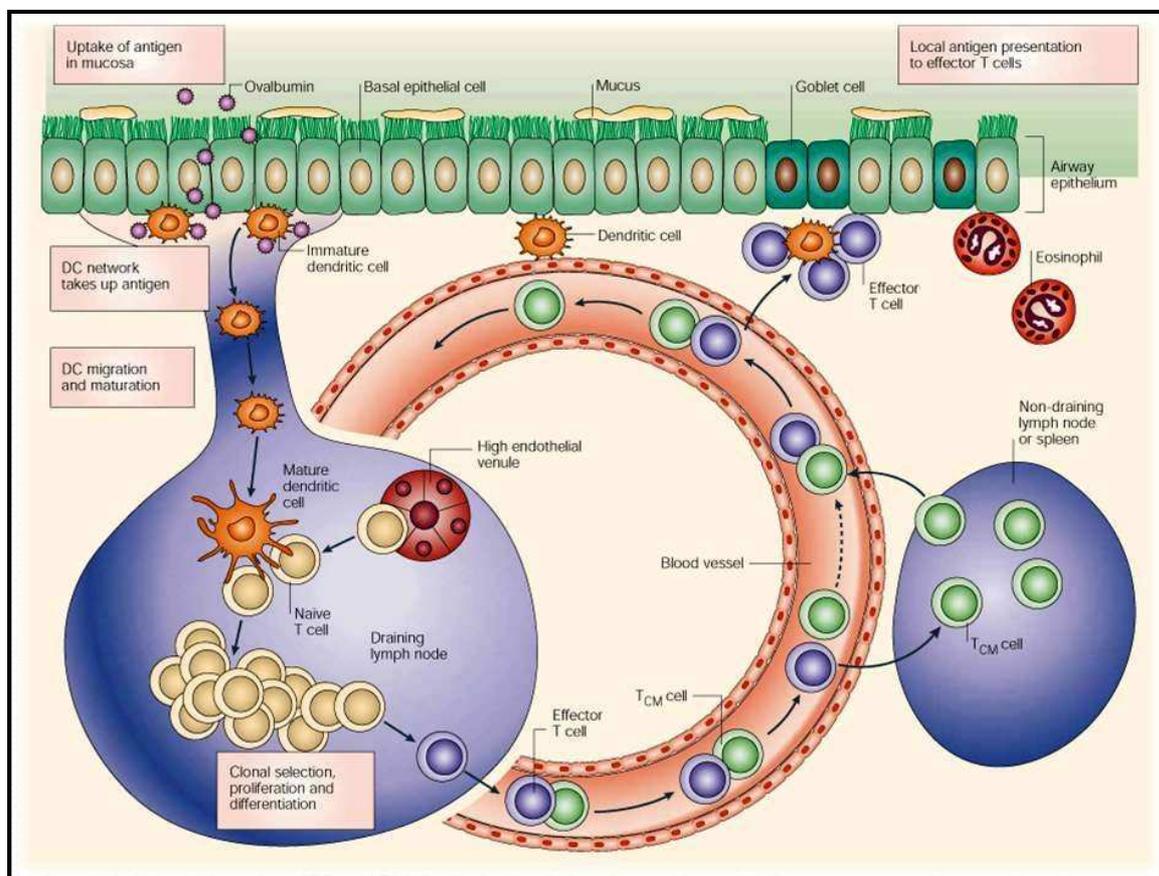
Sehr häufig in der Forschung verwendete Nagermodelle stellen Mausmodelle für Allergie und *Asthma bronchiale* dar. Die Gründe dafür sind, dass das Immunsystem der Maus sehr gut charakterisiert ist, Spezies-spezifische Reagenzien (z.B. Antikörper) kommerziell erhältlich sind und verschiedene genetisch modifizierte Modelle (Knock-out und transgene Mausstämme) zur Verfügung stehen. Weiterhin können in sensibilisierten Mäusen Parameter erfasst werden, die der humanen respiratorischen Allergie sehr ähnlich sind. Dabei sind erhöhte IgE-Levels im Serum, Einstrom eosinophiler Zellen in die Lunge, mukosale Hypersekretion und Hypersensibilität der Atemwege nachweisbar. Ein Nachteil von Mausmodellen stellen die unterschiedlichen Reaktionen in verschiedenen Mausstämmen dar [Seitzer *et al.*, 2005].

Zur Identifizierung und Differenzierung von respiratorischen und Kontaktallergenen wird ein gut etablierter Kontakt-Sensibilisierungstest (*local lymph-node assay*, LLNA) oder ein Maus-IgE-Test verwendet [Dearman *et al.*, 1999a, Dearman *et al.*, 1999b]. Die Zytokin-Profile der Zellen aus den isolierten lokalen Lymphknoten geben dabei Hinweise auf die Entwicklung von Th1- und Th2-vermittelten Immunreaktion [Dearman *et al.*, 2003]. Die Entwicklung einer Th1 Immunreaktion ist mit Akkumulation von IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL-2 assoziiert, Th2 dagegen mit IL-4, -5, -10 und -13 [Dermann *et al.*, 2003, Boverhof *et al.*, 2008]. Der LLNA wird häufig zur Testung sensibilisierender Eigenschaften von niedermolekularen Allergenen nach dermalen Behandlungen eingesetzt.

Ein von Robinson *et al.* etablierter Test erlaubt die Untersuchung des sensibilisierenden Potentials von hochmolekularen Substanzen auf den respiratorischen Trakt in einem Mausmodell [Robinson *et al.*, 1996]. Dieser Test basiert auf der Untersuchung von IgE- und

IgG1-Konzentrationen im Serum nach mehrfachen intranasalen Applikationen eines Proteins (*mouse intranasal test, MINT*) [Robinson *et al.*, 1996].

Im klassischen Ovalbumin-induzierten Mausmodell für Asthma wird im Gegensatz zum LLNA neben der Sensibilisierungsphase auch die Effektorphase der respiratorischen Allergie erfasst (Abb. 3, Lambrecht *et al.*, 2003). Durch Sensibilisierung mit Ovalbumin wird eine Th2-vermittelte respiratorische Hypersensitivität induziert (Abb. 3, Lambrecht *et al.*, 2003). In BALB/c Mäusen kann die Infiltration von eosinophilen Zellen in die Lunge und Atemwege, erhöhte IgE- und IgG1-Konzentrationen im Serum und eine Ovalbumin-spezifische EAR und MCh-induzierte AHR nachgewiesen werden [Glaab *et al.*, 2004, Glaab *et al.*, 2005].



**Abb. 3: Zentrale Rolle von DCs bei der Sensibilisierung des respiratorischen Traktes mit Ovalbumin in Maus [Abb. aus der Veröffentlichung von Lambrecht *et al.* 2003]**

Mit der Epithelschicht interagierende naive DC nehmen Ovalbumin auf, wandern in den Lymphknoten und entwickeln sich zu reifen antigenpräsentierenden DC. Im Lymphknoten aktivieren DCs naive T-Zellen zur klonalen Selektion, Proliferation und Differenzierung. T-Effektorzellen wandern über Blutgefäße ins Lungengewebe, wo sie durch Interaktion mit APCs antigenspezifische Immunreaktionen auslösen.

## Einleitung

Eine Ovalbumin-induzierte Sensibilisierung des respiratorischen Traktes ist in Ratten auch möglich. Dabei können ebenfalls allergische Reaktionen wie z.B. erhöhte IgE-Konzentrationen im Serum, respiratorische Infiltration von Entzündungszellen und Veränderungen der Lungenfunktion (EAR und AHR) nachgewiesen werden [Hoymann, 2007, Boverhof *et al.*, 2008]. Die Sensibilisierung des respiratorischen Traktes in Rattenmodellen kann auch durch Expositionen mit Hausstaubmilben und Pollen induziert werden [Ward *et al.*, 2007]. Arts *et al.* (1997) entwickelten einen LLNA in Ratten und zeigten dabei, dass die sensibilisierenden Eigenschaften von respiratorischen Allergenen wie TMA und Kontaktallergenen wie DNCB nach dermalen Behandlungen nachweisbar sind [Arts *et al.*, 1997]. Dennoch werden Ratten nicht annähernd so häufig wie Mäuse in Allergie- und Asthamamodellen eingesetzt. Rattenmodelle finden viel häufiger in der klassischen Toxikologie Verwendung [Boverhof *et al.*, 2008].

Im Meerschweinchen-Maximierungstest (GPMT) nach Magnusson & Kligman erfolgte lange Zeit der Nachweis des sensibilisierenden Potentials von Chemikalien [Hilton *et al.*, 1998]. Dabei wurde das sensibilisierende Potential einer Chemikalie durch subjektive Bewertung induzierter Hautrötung und Ödembildung nach dermalen Applikation bestimmt. Ein Meerschweinchen-Modell wurde auch zur Testung sensibilisierender Eigenschaften von Proteinen über den respiratorischen Trakt entwickelt und *guinea pig intratracheal test* (GPIT) genannt [Ritz *et al.*, 1993]. Dieser Test basiert auf der Bestimmung ansteigender Immunglobulin-Konzentrationen im Serum nach intratrachealer Applikation von verschiedenen Proteinlösungen [Ritz *et al.*, 1993].

Primaten (z.B. Rhesusaffen) sind aufgrund physiologischer und symptomatischer Ähnlichkeiten zum Menschen zur Untersuchung von Asthma-, wie auch COPD-induzierten Veränderungen im respiratorischen Trakt besonders geeignet [Plopper *et al.*, 2008]. Die Entschlüsselung der vollständigen Genomsequenz von Rhesusaffen der Gattung *Macaca mulatta* schafft zudem ganz neue Perspektiven für die Erforschung humaner Erkrankungen [Gibbs *et al.*, 2007]. Trotz dieser Ähnlichkeit und guter Vergleichbarkeit zum Menschen werden Primaten aus ethischen Gründen viel seltener für die Untersuchungen allergischer Erkrankungen verwendet als kleine Nagetiere.

## **2.4 *In vitro* und *ex vivo* Modelle zur Testung sensibilisierender Eigenschaften von nieder- und hochmolekularen Substanzen**

Zum Schutz des Menschen vor chronischen Erkrankungen des respiratorischen Traktes besteht in der Industrie, Auftragsforschungsinstituten etc. zunehmend Bedarf an experimentellen Methoden, durch die Gefahrstoffe (z.B. Allergene und irritativ wirkende Substanzen) schnell und zuverlässig identifiziert werden, wobei eine Vermeidung von Tierversuchen erwünscht ist.

Zurzeit besteht in der EU die Notwendigkeit zur Entwicklung von alternativen Methoden, die eine Grundlage für die Risikobewertung von Chemikalien bilden (REACH). Aus diesem Grund wird die Entwicklung und Validierung von alternativen Methoden durch viele Institutionen, wie z.B. durch Europäische Union (EU) oder Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert wird.

Es sind bereits zahlreiche *in vitro* Methoden etabliert worden, in denen irritative und immunologische Effekte von Substanzen, wie z.B. Chemikalien oder pharmakologischen Substanzen ermittelt werden können. Im Gegensatz zu *in vivo* Tiermodellen, die eine Erfassung substanzspezifischer Reaktionen lokal und systemisch erlauben, können durch *in vitro* Methoden die Effekte meistens nur in einem Zelltyp (z.B. Monozyten, dendritischen Zellen, Keratinozyten, T-Zellen) untersucht werden.

Immuntoxikologische *in vitro* Untersuchungen müssen das Erfassen von Schlüsselereignissen der frühen Phase einer Sensibilisierung erlauben [Roggen *et al.*, 2006]. Diese *in vitro* ausgelösten Immunreaktionen können durch Freisetzung inflammatorischer Mediatoren, wie Zytokinen und Chemokinen und Expression von Zelloberflächenmarkern charakterisiert werden [Roggen *et al.*, 2006].

Die meisten *in vitro* Methoden zur Testung von potentiellen sensibilisierenden Eigenschaften erlauben nur eine Unterscheidung zwischen Kontaktallergenen und irritativ wirkenden Substanzen. Dabei werden häufig pro-inflammatorische Mediatoren als Indiz für sensibilisierende Eigenschaften einer Substanz ermittelt. MIP-1 $\beta$  wird z.B. als Marker zur Differenzierung von Kontaktallergenen und irritativ wirkenden Substanzen in einer humanen Monozyten-Zelllinie (THP-1) verwendet [Lim *et al.*, 2008]. Auch die Untersuchung von Zelloberflächenmarkern CD86, CD54 und HLA-DR in THP-1 wurde zur Differenzierung von Kontaktallergenen und irritativ wirkenden Substanzen verwendet [Yoshida *et al.*, 2003]. Das pro-inflammatorische Zytokin IL-1 $\alpha$  wird darüber hinaus häufig als Marker für irritative

## Einleitung

Zellreaktionen verwendet. So wurde in murinen Keratinozyten gezeigt, dass toxische Konzentrationen von Substanzen die Freisetzung von IL-1 $\alpha$  induzieren [Corsini *et al.*, 1996].

Beispiele für mögliche Ersatzmethoden zur Testung irritativer und inflammatorischer Effekte von Chemikalien über die Haut sind die gut etablierten Epidermis-Äquivalents EpiDerm™ und EPISKIN™. Dabei wird die Irritation als Indiz für Toxizität definiert [Cotovio *et al.*, 2005]. Als Marker für eine irritative Wirkung werden klassische Zytotoxizitätstests verwendet, wie die Bestimmung der Aktivität des freigesetzten Laktatdehydrogenase (LDH) im Überstand, die Umsetzung des Farbstoffes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) durch mitochondriale Dehydrogenasen und die Untersuchung der Ausschüttung des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 $\alpha$  [Faller *et al.*, 2002, Cotovio *et al.*, 2005].

Aufgrund der Komplexität des respiratorischen Traktes und substanzspezifischer irritativer und inflammatorischer Effekte gelang es bisher nicht *in vitro* und/oder *ex vivo* Methoden zur Identifizierung von Substanzen, die eine respiratorische Sensibilisierung induzieren, hinreichend zu etablieren [Roggen *et al.*, 2006].

### 2.4.1 *Precision cut lung slices (PCLS)*

*Precision cut lung slices (PCLS)* dt. Präzisions-geschnittene Lungenschnitte stellen eine *ex vivo* Methode dar, die für verschiedene Forschungsansätze bereits etabliert wurde und zur Testung respiratorischer Allergene einen viel versprechenden Ansatz darstellt [Roggen *et al.*, 2006].

In frühen Untersuchungen wurde Lungengewebe mit einem Skalpell geschnitten und anschließend kultiviert. Aufgrund der fehlenden Eigenform des Organs und der weichen Konsistenz des Lungengewebes war diese Schnitttechnik problematisch, da Lungenschnitte eine unterschiedliche Dicke aufwiesen, die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse schlecht war und die Nährstoffversorgung im Inneren der Schnitte durch Diffusion nicht gewährleistet werden konnte. Solche Untersuchungen dienten vor allem toxikologischen Zwecken [Parrish *et al.*, 1995].

Die erste Untersuchung, in der gezeigt wurde, dass lebende Lungenschnitte sich zur Quantifizierung der Bronchokonstriktion eignen, wurde 1993 veröffentlicht [Dandurand *et al.*, 1993]. Die Autoren zeigten, dass das Kontraktionsverhalten der angeschnittenen Atemwege

nach Zugabe von bronchokonstriktorisch wirkenden Substanzen anhand der Verringerung des Atemwegvolumens videomikroskopisch ausgewertet werden kann. Allerdings wurden in dieser Arbeit die Lungen mit Rasierklingen geschnitten, so dass die Streuung der Ergebnisse enorm hoch war [Dandurand *et al.*, 1993].

Auf der Basis der erstmalig von Krumdieck *et al.*, (1980) [Krumdieck *et al.*, 1980] beschriebenen Technik, mit Hilfe eines Mikrotoms präzisionsgeschnittenes Gewebe herzustellen und nach Instillation von Agarose, um die Lungenfestigkeit vor dem Schneiden zu erhöhen, wie dies Placke und Fisher demonstrierten [Placke *et al.*, 1987], gelang es Martin *et al.*, (1996) 220±20 µm dünne PCLS herzustellen, in denen die Messung der Bronchokonstriktion möglich war. Hierbei war eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse möglich und die Nährstoffversorgung in den Lungenschnitten gewährleistet [Martin *et al.*, 1996]. Die gefundenen EC<sub>50</sub>- oder IC<sub>50</sub>-Werte unterschieden sich kaum von denen am intakten Organ [Held *et al.*, 1999, Martin *et al.*, 2000].

PCLS aus humanen und murinen Lungen fanden in letzten Jahren Verwendung in pharmakologischen Studien zur Messung der Bronchokonstriktion, zur Identifizierung von Mediatoren von denen die allergische Atemwegskontraktion abhängig ist und zur Untersuchung intrazellulärer calcium-abhängiger Reaktionen in glatter Muskulatur von Atemwegen [Wohlsen *et al.*, 2001, Wohlsen *et al.*, 2003, Bergner *et al.*, 2002, Moreno *et al.*, 2006]. Die Untersuchungen der Bronchokonstriktion erfolgten bisher an PCLS aus nicht-sensibilisierten Lungen oder nach einer passiven Immunisierung mit Serum von Allergikern oder immunisierten Tieren [Martin *et al.*, 1996, Wohlsen *et al.*, 2001, Ressmeyer *et al.*, 2006].

Auch Cytochrome P450 (CYPs), die für die Detoxitation von Xenobiotika und Umweltschadstoffen in Säugerzellen verantwortlich sind, wurden in den letzten Jahren in PCLS intensiv untersucht [Harrigan *et al.*, 2006, Umachandran *et al.*, 2006, Pushparajah *et al.*, 2007].

#### **2.4.1.1 Prospektiver Einsatz von PCLS als geeignete Ergänzungsmethode zum Tierversuch**

Im Rahmen des EU-Projektes Sens-it-iv werden PCLS gemeinsam mit verschiedenen *in vitro* Zell-basierten Systemen als alternative Methode zum Tierversuch entwickelt. Dabei werden bekannte respiratorische Allergene, Kontaktallergene und Kontrollsubstanzen untersucht. Das Ziel von Sens-it-iv stellt die Etablierung und Validierung von *in vitro* Methoden zur Testung

## Einleitung

von allergenen Substanzen dar [Roggen et al., 2006]. Dabei erfolgt die Beratung durch ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*). Die Organisation ECVAM setzt die Richtlinien fest, nach denen alternative Methoden etabliert und validiert werden [Hartung et al., 2003]. Ziel der Entwicklung alternativer Methoden ist die Vermeidung oder zumindest Verminderung von Tierversuchen nach dem sogenannten 3R-Konzept (**R**eplacement, **R**eduction und **R**efinement).

Im Rahmen eines durch Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Projektes sollen aus Lungen sensibilisierter Tiere PCLS hergestellt und im Vergleich zu invasiver *in vivo* Lungenfunktion die *ex vivo* Bronchokonstriktion untersucht werden.

Ein bedeutender Vorteil von PCLS als alternative Methode zum Tierversuch ist, dass in der Lunge eines Tieres mehrere Konzentrationen einer Substanz oder verschiedene Substanzen getestet werden können. Dabei können in PCLS aus einer Maus- oder Rattenlunge bis zu acht bzw. dreißig verschiedene Versuchansätze untersucht werden. Jedes verwendete Tier stellt gleichzeitig auch die eigene interne Kontrolle dar.

Einen viel versprechenden Ansatz als Alternative zu Tierversuchen stellen PCLS aus Lungen nicht-sensibilisierter Tiere zur Testung toxikologischer und immunologischer Effekte von Substanzen (z.B. Mitogene, Pharmazeutiker, Industriechemikalien) wie auch PCLS aus sensibilisierten Lungen zur Untersuchung der *ex vivo* Bronchokonstriktion dar.

### 3 Ziele der Arbeit

PCLS repräsentieren ein *ex vivo* Modell, das Morphologie und Funktionalität des respiratorischen Traktes widerspiegelt. In PCLS fehlen zwar Lymph- und Blutzirkulationssystem, es stellt jedoch das intakte Gewebe mit allen Zelltypen der Lunge dar. Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von PCLS zur Untersuchung von immunologischen Reaktionen und Bronchokonstriktion als alternative Methode zum Tierversuch. Hierzu wurden zwei Hypothesen definiert.

Die erste Hypothese dieser Arbeit ist, dass lokale Irritationen und Inflammationen in PCLS aus den Lungen nicht sensibilisierter Tiere erfasst werden können. Hierzu sollte die Bestimmung von pro-inflammatorischen Mediatoren und die Untersuchung von Zelloberflächenproteinen, vorwiegend auf antigenpräsentierenden Zellen nach einer Exposition von PCLS mit bekannten immunmodulatorischen Substanzen (z.B. LPS und Dexamethason) etabliert werden. Die toxischen und immunmodulatorischen Effekte von Industriechemikalien sollten durch Verwendung dieser etablierten funktionellen Tests in PCLS untersucht werden.

Die zweite Hypothese dieser Arbeit ist, dass die Untersuchung der Bronchokonstriktion in PCLS aus sensibilisierten Tierlungen eine mögliche Ersatzmethode zu klassischen *in vivo* Lungenfunktionsmessungen darstellt. Hierfür sollte in Ovalbumin-induzierten Maus- und Rattmodellen für *Asthma bronchiale*, im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit FZ Borstel (BMBF-Projekt: „Vermeidung von *In vivo*-Lungenfunktionsmessungen in pharmakologischen und toxikologischen Untersuchungen“) die *ex vivo* Untersuchung der EAR und AHR erstmalig an PCLS aus Lungen sensibilisierter Tiere durchgeführt und mit Ergebnissen der parallelen invasiven *in vivo* Lungenfunktionsmessung verglichen werden. Die Erkenntnisse, die in diesen Ovalbumin-induzierten Asthmodellen gewonnen werden, sollten in einem durch Industriechemikalien TMA- und DNCB-induzierten Allergiemodell angewendet werden.

## 4 Tiere, Material und Methoden

### 4.1 Tiere

#### 4.1.1 Nager

BALB/cAnNCrl

Charles River (Sulzfeld, D)

C57/BL6J<sup>CD11c-EYFP</sup>

von Michael C. Nussenzweig  
freundlicherweise zur Verfügung gestellt  
(Rockefeller Universität, New York,  
USA)

DO11.10

von Prof. Dr. Reinhold Förster  
freundlicherweise zur Verfügung gestellt  
(Medizinische Hochschule, Hannover, D)

Brown Norway/Crl

Charles River (Sulzfeld, D)

Brown Norway (Hsd-SD)

Harlan Winkelmann (Borchen, D)

Für die Herstellung von PCLS wurden Lungen von BALB/c, CD11-EYFP-transgenen Mäusen und Brown Norway (BN) Ratten verwendet. Die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden aus der Milz von DO11.10 isoliert. Die Messung der *in vivo* Lungenfunktion erfolgte an weiblichen BALB/c Mäusen und männlichen BN Ratten. Das durchschnittliche Gewicht vor Beginn der Studien betrug 20 g für BALB/c Mäuse und 200 g für BN Ratten.

Im Kooperationsprojekt „Vermeidung von *In-vivo*-Lungenfunktionsmessungen in pharmakologischen und toxikologischen Untersuchungen“ (von BMBF gefördert) wurde nach der Sensibilisierung im Fraunhofer ITEM eine Tiergruppe zum FZ Borstel (ab 2007 zum UK Aachen) zu den Projekt-Kooperationspartnern gebracht. Die Arbeitsgruppe Lungenpharmakologie im FZ Borstel führte die *ex vivo* Untersuchungen der Lungenfunktion durch.

Alle Studien zur Untersuchung der Lungenfunktion wurden nach Genehmigung des Tierversuchsvorhabens (TV) durch das niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (TV-Kennzeichen: 06/1124, 06/1134, 07/1257) durchgeführt. Die Versuchstiere wurden im Tierhaus des Fraunhofer ITEM unter standardisierten und täglich

kontrollierten Bedingungen (Temperatur: 20-22 °C, Luftdruck: 10 Pa, Luftfeuchtigkeit: 40-70 %, Beleuchtung: 12 h Tag/Nacht-Rhythmus) gehalten. Die Akklimatisierungsphase vor der ersten Behandlung betrug mindestens eine Woche.

#### **4.1.2 Primaten**

Zur Untersuchung immuntoxikologischer Effekte in PCLS wurden Lungen von Mantelpavianen (*Papio hamadryas*) und Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) vom Primatenzentrum Göttingen, im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation mit Dr. K. Mätz-Rensing zur Verfügung gestellt. Die Euthanasie dieser Tiere ist in allen Fällen wegen unheilbarer Erkrankungen oder Verletzungen notwendig gewesen. Bei der Obduktion der Tiere wurden pathologisch notwendige Proben entnommen. Die Lungen wurden unmittelbar nach Entnahme zum Schutz vor Austrocknung mit PBS benetzt und auf Eis nach Hannover transportiert.

## 4.2 Material

### 4.2.1 Geräte

Aerosolkammer für inhalative Allergenprovokation	Fraunhofer ITEM (Hannover, D)
Analog-Digital-Umwandler (DT 302)	Marlboro (MA, USA)
Analoge Videokamera (JAI 2040)	JAI PULNiX (Alzenau, D)
Analysenwaage	Sartorius (Göttingen, D)
Bio-Fotometer	Sartorius (Göttingen, D)
Bodyplethysmograph (für intubierte Maus)	Hugo Sachs Elektronik (March, D)
Bronchy Typ III (Aerosolgenerierungssystem)	Fraunhofer ITEM (Hannover, D)
Differentialdruckaufnehmer (DP 45-14)	Validyne (Northridge, USA)
Doppelrotameter	Dräger Medizintechnik (Lübeck, D)
Druckaufnehmer (P-75, Type 379)	Hugo Sachs Elektronik (March, D)
Durchflussfotometer	Fraunhofer ITEM (Hannover, D)
Eismaschine	Scotsman Ice Systems (Herborn, D)
Elektrische Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, D)
Gefriertruhe -80°C	GFL (Würzburg, D)
Gefriertruhe -20°C	Liebherr (Ochsenhausen, D)
Heraeus Brutschrank	Kendro Laboratory Products (Langenselbold, D)
Heraeus Sterilbank	Kendro Laboratory Products (Langenselbold, D)
Heraeus Trockenschrank	Kendro Laboratory Products (Langenselbold, D)
Horizontal-Schüttler	Edmund Bühler GmbH (Hechingen, D)
Konfokales Laserscanningmikroskop (Zeiss LSM 510 META)	Zeiss (Jena, D)
<i>Krumdieck Tissue Slicer</i>	Alabama Research and Development (Munford, AL, USA)
Kühlschrank	Liebherr (Ochsenhausen, D)
Laser Jet 5P&5MP	Hewlett Packard HP (Hannover, D)
<i>Bio-Plex Suspension Array System</i>	Luminex XMAP™ Technology (über BioRad Laboratories, München, D)

Magnetrührer	IKA-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, D)
Magnetstäbchen	IKA-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, D)
Magnehelic (Atemdruckaufnehmer)	Dwyer Instruments INC. (IN, USA)
MFC-Box ( <i>mass flow controler</i> )	Fraunhofer ITEM und Firma Mättig (Una, D)
Mikrotiterplatten-Photometer	Dynatech (Deisenhof, D)
Mikrotiterplatten-Waschgerät	Dynatech (Deisenhof, D)
Mikrowelle	Sharp (München, D)
Multipipette	Eppendorf (Hamburg, D)
Oxyanga (5-Gas-Monitor)	Heinen & Löwenstein GmbH (Bad Ems, D)
Pari Verneblungssystem LC Star	Pari GmbH (Starnberg, D)
pH 211-Microprocessor pH-Meter	Migge Laborbedarf (Heidelberg, D)
Pipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Labsystems (Vantaa, FIN)
Pipettierball	VWR (Darmstadt, D)
Pneumotachometer (Kapillarrohr PTM T16375)	Hugo Sachs Elektronik (March, D)
Präparierbesteck (Scheren und Pinzetten)	Hammacher Instrumente (Solingen, D)
Reinluftmantelfotometer	Fraunhofer ITEM (Hannover, D)
Semi-Mikrowaage	Sartorius (Göttingen, D)
Skalpell	Hammacher Instrumente (Solingen, D)
Gewebestanze	Werkstatt Fraunhofer ITEM (Hannover, D)
Thermomixer	Eppendorf (Berlin, D)
Ultraschallhomogenisator	Sonics & Materials INC. (Danbury, USA)
Vapor 2000 M35054 (Halothanverdampfer)	Dräger Medizintechnik (Lübeck, D)
Verstärker CFBA Typ 677	Hugo Sachs Elektronik (March, D)
Verstärker DBA Typ 660	Hugo Sachs Elektronik (March, D)
Wasserbad	Memmert (Hamburg, D)
Zellzählgerät (Hemocytometer)	Ominlab Biosystems (Mettmenstetten, CH)
Zytospin-Zentrifuge	Shandon GmbH (Frankfurt, D)

#### 4.2.2 Software

<i>Bio-Plex Manager</i> ™ Software	BioRad Laboratories (München, D)
GraphPad Prism 4, Version 4.03	GraphPad Software (San Diego, USA)
HEM 3.4	Notocord, (Croissy, F)

## Tiere, Material und Methoden

LSM Meta 512

IMARIS 4.5.2

Mikro WIN Software

R 2.7.0 (*false discovery rate*)

Zeiss (Jena, D)

Bitplane AG (Zürich, CH)

Dynatec (Deisenhof, D)

<http://cran.r-project.org/>

### 4.2.3 Verbrauchsmaterial

Abvocath-T G20 (Maus)

Abvocath (Ratte)

Combitips

Deckgläschen

Reaktionsgefäße (0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml)

5 ml Polypropylen Rundbodenröhrchen

50 ml Polypropylenröhrchen

Gewebekulturschalen (60 mm/15 mm)

Handschuhe

Klammern (aus Platin und Nylon, Eigenbau)

Kanülen

Katheter I.V.

Kunststoff-Folie

„Maxisorp“- Mikrotiterplatten (Flachboden)

Mikrotiterplatten (Flachboden)

Millipore Flaschenfilter (Porengröße: 22 µm)

Objekträger

Ösophaguskatheter (Eigenbau)

Pipettenspitzen

Separationssäulchen (für  $1 \cdot 10^7$  Zellen)

Skalpellsklingen

Spritzen

Steriles chirurgisches Nahtmaterial

Stripetten

Transferpipetten

14 ml Polypropylen Rundbodenröhrchen

Abbott Irland (Sligo, IRL)

Smiths (Carlsbad, USA)

Eppendorf (Hamburg, D)

Menzel (Braunschweig, D)

Eppendorf (Hamburg, D)

Becton Dickinson (Heidelberg, D)

Greiner (Nürtingen, D)

Greiner (Nürtingen, D)

Ansell (München, D)

FZ Borstel (Borstel, D)

Braun (Melsungen, D)

InterMed (Dörrebach, D)

Roth (Karlsruhe, D)

NUNC (Wiesbaden, D)

NUNC (Wiesbaden, D)

Millipore (Schwalbach, D)

Menzel (Braunschweig, D)

Fraunhofer ITEM (Hannover, D)

Brand (Berlin, D)

Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)

Aesculap AG & Co. KG (Tuttlingen, D)

Braun (Melsungen, D)

F. Ernst GmbH & Co. KG (Hannover, D)

Vitaris (Baar, D)

Sarstedt (Nümbrecht)

Becton Dickinson (Heidelberg, D)

Zellkulturplatten (24 Vertiefungen)	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Zellkulturschalen (60x15/100x20)	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Zellschaber	NUNC (Wiesbaden, D)
Zellsieb 100 µm	Becton Dickinson (Heidelberg, D)

#### 4.2.4 Medien, Puffer und Agarose

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM (DMEM), das bereits 0.365 g/L L-Glutamin und 15 mM HEPES enthielt, wurde in Pulverform von Sigma (München, D) bezogen und vor dem Gebrauch als zweifach konzentrierte Lösung frisch angesetzt (2 x DMEM). Hierzu wurde das Mediapulver unter Rühren in *Aqua dest.* gelöst. Anschließend wurden 16 ml der 7.5 %-igen Natriumbicarbonat-Lösung (Invitrogen, Karlsruhe, D) hinzugefügt. Nach der Einstellung des pH-Wertes (7.2) wurde das Lösungsvolumen mit *Aqua dest.* auf 500 ml aufgefüllt und steril filtriert (0.2 µm Filter). Zur Kultivierung der PCLS wurde durch Hinzufügen des gleichen Volumens *Aqua dest.* einfach konzentriertes DMEM hergestellt (1 x DMEM). Der einfach konzentrierten Mediumlösung wurden 100 units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin hinzugefügt.
- Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) wurde gebrauchsfertig von Sigma (München, D) bezogen und eisgekühlt verwendet.
- Carbonatpuffer wurde von Pierce (über Perbio Science, Bonn, D) bezogen. Das vom Hersteller gelieferte Pulver wurde in 500 µl *Aqua dest.* unter Rühren gelöst und der pH-Wert (9.4) überprüft.
- Hämolysepuffer wurde durch Lösen von 8.29 g NH<sub>4</sub>Cl, 0.037 g Na<sub>2</sub>EDTA und 0.839 g NaHCO<sub>3</sub> in 1 l *Aqua dest.* hergestellt. Der pH-Wert wurde auf 7.3 eingestellt und die Lösung steril filtriert (0.2 µm Filter).
- MACS-Puffer wurde stets frisch vor dem Gebrauch hergestellt. Hierzu wurden 0.2 % BSA in PBS gelöst, 2 mM EDTA hinzugefügt, der pH-Wert wurde auf 7.2 eingestellt und die Endlösung steril filtriert.
- PBS-Tween 20 wurde in Tablettenform von Medicago (Uppsala, S) bezogen und nach Herstellerangaben in *Aqua dest.* gelöst. Die Lösung enthielt 0.01 M Phosphat Puffer, 0.0027 M KCl, 0.14 M NaCl und 0.05% Tween 20. Der pH-Wert lag bei 7.4.

- Natriumbicarbonat-Lösung (7.5 %) wurde gebrauchsfertig von Invitrogen (Karlsruhe, D) bezogen.
- Low melting Agarose wurde von Sigma (München, D) bezogen. Vor dem Gebrauch wurde eine 3 %-ige Agaroselösung hergestellt. Dazu wurden 3 g *low melting* Agarose in 100 ml *Aqua dest.* resuspendiert und durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst. Zum Befüllen der Lungen wurde die 3 %-ige Agaroselösung mit gleichem Volumen 2 x DMEM vermischt und auf 37 °C in einem Wasserbad temperiert.

#### 4.2.5 Reagenzien

Aceton	Sigma (München, D)
Acetyl-β-Methylcholinchlorid	Sigma (München, D)
Acetylcholinchlorid	Sigma (München, D)
Adenosin	Sigma (München, D)
Alcalase (3.2 mg/ml)	Novozymes (Bagsvaerd, DEN)
Aluminiumhydroxid-Gel	Sigma (München, D)
<i>Aqua dest.</i>	Millipore (Schwalbach, D)
<i>Bovine serum albumin</i> (BSA)	Sigma (München, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO, für Zellkultur)	Sigma (München, D)
70% Ethanol	Roth (Karlsruhe, D)
<i>fetal calf serum</i> (FCS)	Sigma (München, D)
hitzeabgetötete <i>Bordetella pertussis</i> ( $28 \cdot 10^9$ Keime/ml)	Chiron Biocine (Sienna, I)
1N HCl	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumchlorid (NaCl)-Lösung (0.9 %)	Braun Melsungen (Melsungen, D)
1N NaOH	Roth (Karlsruhe, D)
Olivenöl	Roth (Karlsruhe, D)
Ovalbumin (Grad V und VI)	Sigma (München, D)
Pentobarbital-Na (Narcoren)	Merial (Hallbergmoos, D)
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 U Penicillin und 10 mg Streptomycin in 100 ml 0.9 %-iger NaCl-Lösung)	Sigma (München, D)
Propofol	Braun Melsungen (Melsungen, D)

Protease-Inhibitor-Cocktail

Sigma (München, D)

Triton X-100

Sigma (München, D)

Immunmodulatorische Substanzen

BppCysMPEG

von Prof. Dr. Guzman (GBF Braunschweig) freundlicherweise zur Verfügung gestellt

Dexamethason (10 mg/ml)

Ratiopharm-Merckle GmbH (Blaubeuren, D)

LPS (*E. coli*, Serotyp 0111:B4)

Sigma (München, D)

MALP-2

von Prof. Dr. P. F. Mühlradt (GBF Braunschweig) freundlicherweise zur Verfügung gestellt

Murines rekombinantes IFN $\gamma$  (1 mg/ml)

Strathmann Biotec AG (Hamburg, D)

Chemikalien:

Die verwendeten Chemikalien wurden entweder von Sigma (München, D) oder von Roth (Karlsruhe, D) bezogen. Eine Übersicht zu den Eigenschaften der Chemikalien wurde in der Tab. 1 dargestellt.

**Tab. 1:** Industriechemikalien für *ex vivo* und *in vivo* Untersuchungen.

Chemikalien	M [g/mol]	CAS- Nummer	Hersteller	Reinheits- grad [%]	Eigenschaften	
					physik.	chem.
<b>2,4-Dinitro- chlorobenzol (DNCB)</b>	202.69	97-00-7	Sigma	99	fest	Halogen- Aromat
<b>Formaldehyd</b>	30.03	50-00-0	Roth	37	flüssig	Aldehyd
<b>Kaliumdichromat (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)</b>	294.18	7778-50- 90	Roth	99.5	fest	anorganische Substanz
<b>Sodiumdodecylsulfat (SDS)</b>	288.38	151-21-3	Sigma	98.5	fest	anionisches Detergenz
<b>Trimellitsäureanhydrid (TMA)</b>	192.13	552-30-7	Sigma	97	fest	Anhydrid

## Tiere, Material und Methoden

### Kits:

<i>BCA Protein Assay Reagent Kit</i>	Pierce (über Perbio Science, Bonn, D)
<i>Bio-Plex Human Cytokine Assay, 3-plex</i> (MCP-1, IL-8, IL-6)	BioRad Laboratories (München, D)
<i>Bio-Plex Human Cytokine Assay, 3-plex</i> (IL-1 $\beta$ , G-CSF und MIP-1 $\beta$ )	BioRad Laboratories (München, D)
<i>Bio-Plex Mouse Cytokine Assay, 4-plex</i> (MCP-1, KC (IL-8), IL-6, G-CSF)	BioRad Laboratories (München, D)
<i>Bio-Plex Mouse Cytokine Assay, 8-plex</i> (IL-10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-12(p40), RANTES, Eotaxin, und MIP-1 $\beta$ )	BioRad Laboratories (München, D)
<i>Bio-Plex Mouse Cytokine Assay, 9-plex</i> (TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-5, IL-12(p40), G-CSF, RANTES, Eotaxin, IL-10 und IL-13)	BioRad Laboratories (München, D)
<i>Cytotoxicity Kit (LDH)</i>	Roche Diagnostics (Mannheim, D)
<i>ELISA Duo Sets (mTNF<math>\alpha</math>, mL-1<math>\alpha</math>, mMIP-1<math>\beta</math>, mEotaxin-2, mL-5, rTNF<math>\alpha</math> und pTNF<math>\alpha</math>)</i>	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, D)
<i>Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit</i>	Invitrogen (Karlsruhe, D)
<i>CD4<sup>+</sup>-T-Cell-Isolation Kit (MACS)</i>	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)

## 4.2.6 Farbstoffe und Antikörper

### Farbstoffe:

MTT	Sigma (München, D)
May-Grünwald	Sigma (München, D)
Giemsa	Sigma (München, D)

### Antikörper:

Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 Hamster anti-Maus CD11c20	Caltag Laboratories (Hamburg, D)
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 Hamster IgG	Caltag Laboratories (Hamburg, D)

Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 Ratte anti-Maus CD86	Biozol (Eching, D)
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 Ratte IgG2b	Biozol (Eching, D)
FITC Hamster anti-Maus CD40	Biozol (Eching, D)
FITC Hamster IgM	Biozol (Eching, D)
PE anti-Maus MHC Klasse II	eBioscience (Frankfurt, D)
PE Ratte IgG2b	eBioscience (Frankfurt, D)
Ratte-anti-Maus I-A/I-E-Antikörpers	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Cy5 F(ab') <sub>2</sub> -Fragment Esel anti-Ratte IgG	Dianova (Hamburg, D)

## 4.3 Methoden

### 4.3.1 Präparative Methoden

#### 4.3.1.1 Präparation von PCLS aus Maus- und Rattenlungen

Die Herstellung von PCLS wurde im Wesentlichen wie 1996 erstmalig bei Martin *et al.* beschrieben durchgeführt [Martin *et al.*, 1996]. Für die immuntoxikologische Fragestellung wurde das Protokoll in einigen Punkten modifiziert. Dazu wurden die Tiere mit einer i.p. Überdosis Pentobarbital-Na eingeschläfert. Danach wurde die *Vena cava* zur Entblutung durchtrennt. Im nächsten Schritt wurde die Trachea präpariert, eine Kanüle vorsichtig in die Trachea eingeführt und mit chirurgischem Faden festgebunden. Die Mauslunge wurde mit ca. 1 ml und die Rattenlunge mit ca. 15 ml einer 1.5 %-igen, 37 °C temperierten Agarose-Medium-Lösung (3 %-ige *low-melting* Agaroselösung und zweifach konzentriertes DMEM im 1:1 Verhältnis) über die Kanüle *in situ* gefüllt. Die Trachea wurde mit einem chirurgischen Faden abgebunden, die Lunge herauspräpariert und zur Polymerisation der Agarose 15 Minuten auf Eis gekühlt. Aus den einzelnen Rattenlungenlappen wurden mithilfe eines Akkuschraubers und einer 8 mm Stanze Gewebezylinder hergestellt. Die Gewebezylinder wurden mittels eines Mikrotoms (220±20 µm, Intervall-Oszillation, 40-50 Hz), das zuvor mit eisgekühlten EBSS gefüllt wurde, geschnitten. Die erhaltenen Lungenschnitte wurden in eine Zellkulturschale (100x20), die zuvor mit 37 °C temperiertem DMEM gefüllt wurde, übertragen und im Brutschrank bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zur Entfernung von Agarose, Zelltrümmern und Mediatoren aus zugrunde gegangenen Zellen wurde das Medium über einen Zeitraum von zwei Stunden viermal im Abstand von 30 Minuten gewechselt. Zwischen den einzelnen Waschschrritten wurden die Lungenschnitte im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss erfolgten die Exposition

der PCLS mit verschiedenen Substanzen und die Bestimmung toxikologischer und immunologischer Endpunkte.

#### **4.3.1.2 Präparation von PCLS aus Pavian- und Rhesusaffenlungen**

Die Primatenlungen aus dem Primatenzentrum Göttingen waren ca. 2-3 Stunden nach der Organentnahme im Fraunhofer ITEM und konnten zur Herstellung von PCLS verarbeitet werden. Das auf Eis transportierte Organ wurde zuerst für 30 Minuten in einem Wasserbad auf 37 °C temperiert. Anschließend wurde die Lunge inspiziert, geeignete Lungenlappen ausgewählt und die nicht zu verwendenden Teile der Lunge oder Schnittstellen, die während der Entnahme pathologischer Proben verursacht wurden, wurden mit chirurgischen Klammern abgeklemmt. In die Trachea oder in einen Hauptbronchus wurde vorsichtig ein steriler Plastikschlauch eingeführt und mit einem chirurgischen Faden festgebunden. Im Folgenden wurde die Lunge mit der vorbereiteten 1.5 %-igen Agarose-DMEM-Lösung gefüllt. Zur Polymerisierung der Agarose wurde das Organ mindestens 30 Minuten auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die einzelnen Lungenlappen getrennt und Gewebezyylinder mithilfe eines Akkuschraubers und einer 8 mm Stanze ausgestanzt. Aus den Gewebezyclindern wurden, wie oben beschrieben, PCLS im Mikrotom hergestellt und danach kultiviert. Da Primatengewebe eine potentielle Infektionsquelle für Menschen darstellt, wurden während dieser Arbeiten besondere Vorsichtsmaßnahmen beachtet, wie z.B. Tragen zusätzlicher Schutzkleidung, nachfolgende Desinfektion aller Arbeitsflächen mit Desinfektionsmitteln und Sterilisation von Geräten (Mikrotom und Stanze).

#### **4.3.1.3 Exposition von PCLS mit nieder- und hochmolekularen Allergenen und immunmodulatorischen Substanzen**

Zur Etablierung der PCLS als geeignete *ex vivo* Methode zur Bestimmung immuntoxikologischer Effekte von Allergenen, Chemikalien oder Medikamenten wurden die Lungenschnitte mit ansteigenden Konzentrationen immunmodulatorischer Substanzen wie LPS, MALP-2, IFN $\gamma$  und Dexamethason oder bekannten Allergenen wie TMA und DNCB (Tab. 2) inkubiert.

Dabei wurden jeweils vier PCLS in 500  $\mu$ l DMEM, mit oder ohne Zusatz der Substanzen in einer Zellkulturplatte (24 Vertiefungen) 4 h bis 72 h kultiviert. Als Negativkontrolle wurden aus jeder Lunge vier PCLS in 500  $\mu$ l DMEM inkubiert. Die wasserlöslichen Substanzen

wurden im Medium (DMEM) gelöst und die wasserunlöslichen zunächst in DMSO und dann DMEM (Endkonzentration: 0.05 % DMSO in DMEM). Bei Verwendung wasserunlöslicher Substanzen wurden mit 0.05 % DMSO in DMEM inkubierte Lungenschnitte als Negativkontrolle definiert. Nach der Inkubation wurden die Überstände auf Eis gekühlt und aliquotiert. Zur Vorbeugung der proteolytischen Zersetzung wurde vor der Aliquotierung allen Proben 0.2 % Protease-Inhibitor-Cocktail hinzugefügt. Jeweils 120 µl der Gewebekulturüberstände wurde für die Messung der LDH-Aktivität bei 4 °C gelagert. Die restlichen Überstände wurden zu je 120 µl Aliquots verteilt, die bei -80 °C bis zur Messung der Zytokine und Chemokine aufbewahrt wurden. Anschließend wurden die Lungenschnitte für 45 Minuten bei 4 °C mit 1 % Triton X-100 in PBS inkubiert. Die Lysatextrakte wurden ebenfalls zur Messung von Zytokinen und Chemokinen, wie auch zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration bei -80 °C aufbewahrt.

**Tab. 2:** Konzentrationen und bekannte Eigenschaften von Substanzen, die zur Testung immunmodulatorischer Effekte in PCLS verwendet wurden.

	Konzentration [µg/ml]	Zuordnung
<b>niedermolekulare Chemikalien (LMW)</b>		
<b>DNCB</b>	0.25, 0.75, 1.5, 3, 5, 10, 20, 40	Kontaktallergen
<b>Formaldehyd</b>	4.37, 8.75, 17.5, 35, 70, 140	respiratorisches und Kontaktallergen
<b>K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub></b>	1.9, 3.9, 7.5, 15, 30, 60	Kontaktallergen
<b>SDS</b>	2.5, 5, 10, 50, 100	irritativ wirkendes Tensid
<b>TMA</b>	0.39, 0.78, 1.5, 3.1, 6.2, 12.5, 25, 50, 100	respiratorisches Allergen
<b>hochmolekulare Proteine (HMW)</b>		
<b>Alcalase</b>	4*10 <sup>-3</sup> , 1.5*10 <sup>-2</sup> , 6.5*10 <sup>-2</sup> , 0.25, 1, 10	Protease
<b>Immunmodulatorische Substanzen</b>		
<b>BppCysMPEG</b>	2*10 <sup>-4</sup> , 1*10 <sup>-3</sup> , 5*10 <sup>-3</sup>	Lipopeptid
<b>Dexamethason</b>	10, 50	Steroid
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	0.5	Peptid
<b>MALP-2</b>	2*10 <sup>-4</sup>	Lipopeptid
<b>LPS</b>	3.1*10 <sup>-5</sup> , 6.2*10 <sup>-5</sup> , 1.25*10 <sup>-4</sup> , 2.5*10 <sup>-4</sup> , 5*10 <sup>-4</sup> , 1*10 <sup>-3</sup> , 5*10 <sup>-3</sup> , 0.5	Endotoxin

#### 4.3.1.4 Isolierung von CD4<sup>+</sup>-Zellen durch magnetische Zellseparation

Ovalbumin-spezifische CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden aus der Milz von DO11.10 Mäusen mithilfe des CD4<sup>+</sup>-*T-Cell-Isolation Kits* durch negative Selektion mittels magnetischer Zellseparation (*MACS*) isoliert. Bei der magnetischen Zellseparation werden zuerst CD4<sup>-</sup>-Zellen, wie zytotoxische T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen und Granulozyten mit einem Biotin-konjugierten Antikörper-Cocktail (CD8, CD11b, CD16, CD19, CD36 und CD56) markiert. Im zweiten Schritt werden die Zellen durch Anti-Biotin-Antikörper, die an magnetische Mikropartikel (Ø 100 µm) konjugiert sind, gebunden. Im magnetischen Feld einer Zell-Isolationssäule (*LS MACS-column*) werden die gebundenen Zellen zurückgehalten, während unmarkierte Zellen die Säule passieren.

Zur Isolierung von CD4<sup>+</sup>-Zellen wurde die Milz mit 5 ml DMEM gespült und die erhaltene Zellsuspension 10 Minuten bei 300xg und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 3 ml Hämolysepuffer resuspendiert, 10 Minuten auf Eis inkubiert und danach 10 Minuten bei 300xg und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden 1x10<sup>7</sup> Zellen in 40 µL *MACS*-Puffer und 10 µL Biotin-Antikörper-Cocktail resuspendiert und 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 30 µL *MACS*-Puffer und 20 µl Anti-Biotin-Antikörper-Microbeads hinzugefügt und die Zellsuspension für weitere 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Suspension wurde 10 Minuten bei 300xg und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10-20 fachem Volumen *MACS*-Puffer resuspendiert. Die Anzahl der Zellen in der Suspension wurde mithilfe eines automatischen Zellzählgeräts bestimmt. Anschließen wurde diese Zellsuspension 10 Minuten bei 300xg und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und 10<sup>8</sup> Zellen in 500 µL *MACS*-Puffer resuspendiert. Die Zell-Separationssäulen wurden in das magnetische Feld des Separationsständers platziert und mit 3 ml equilibriert. Die Zellsuspension wurde auf die Säule aufgetragen und die ungebundenen Zellen eluiert. Die Separationssäule wurde anschließend dreimal mit 3 ml *MACS*-Puffer gespült. Die Zellsuspension wurde für 10 Minuten bei 300xg und 4 °C zentrifugiert und in 1 ml *MACS*-Puffer resuspendiert. Ein Teil der CD4<sup>+</sup>-Zellsuspension wurde zur Kontrolle der Separation mit einem PE-konjugierten Anti-CD4-Antikörper gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

#### 4.3.1.5 Inkubation von PCLS mit CD4<sup>+</sup>-Zellen aus DO11.10 Mäusen und LPS

PCLS aus den Lungen von unbehandelten BALB/c Mäusen wurden mit Ovalbumin-spezifischen CD4<sup>+</sup>-Zellen kultiviert. Hierzu wurden die CD4<sup>+</sup>-Zellen aus der Milz von transgenen DO11.10 Mäusen durch *MACS* isoliert und mit PCLS in 500 µl DMEM für 24 h inkubiert. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden pro Ansatz vier PCLS, 5x 10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup>-Zellen mit oder ohne 500 ng/ml LPS, 50 µg/ml Dexamethason, 1 mg/ml Ovalbumin und 5 µg/ml Con A inkubiert. Eine Übersicht über die einzelnen Versuchsansätze ist in der Tab. 3 dargestellt. Die Vitalität der Lungenschnitte wurde in allen Versuchsansätzen durch quantitative 3D-Bildanalyse der Calcein/EthD-1 Färbung kontrolliert.

**Tab. 3:** Tabellarische Darstellung der Co-Kultur von PCLS mit Ovalbumin-spezifischen CD4<sup>+</sup>-Zellen, Ovalbumin und immunmodulatorischen Substanzen.

Versuch-Ansatz	Anzahl der PCLS	Ovalbumin-spezifische CD4 <sup>+</sup> -Zellen	Ovalbumin (Grad VI)	LPS	Dexamethason	Con A
1	4	5x10 <sup>5</sup>				
2	4			0.5 µg/ml		
3	4			0.5 µg/ml	50 µg/ml	
4	4				50 µg/ml	
5	4	5x10 <sup>5</sup>	1 mg/ml			
6	4	5x10 <sup>5</sup>	1 mg/ml	0.5 µg/ml		
7	4	5x10 <sup>5</sup>	1 mg/ml	0.5 µg/ml	50 µg/ml	
8	4	5x10 <sup>5</sup>	1 mg/ml		50 µg/ml	
9		5x10 <sup>5</sup>	1 mg/ml			
10		5x10 <sup>5</sup>				5 µg/ml

#### 4.3.1.6 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Nach der *in vivo* Lungenfunktionsmessung wurden die Tiere durch eine Narkose-Überdosis (Pentobarbital-Na) eingeschläfert. Anschließend wurde der Brustkorb geöffnet, in die Trachea vorsichtig eine Kanüle eingeführt und mit einem chirurgischen Faden fixiert.

Mauslungen wurden zweimal mit je 800 µl eiskalter PBS-Lösung lavagiert. Die BALs wurden in einem Reaktionsgefäß vereinigt und 10 Minuten bei 300xg bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die BAL-Überstände aliquotiert und bis zur Messung der Zytokine oder Chemokine bei -80 °C gelagert.

Rattenlungen wurden viermal mit je 5 ml PBS lavagiert. Die erste Lavage wurde zentrifugiert und die Überstände zur Bestimmung von Entzündungsmediatoren aliquotiert. Die Überstände aus den weiteren drei BALs wurden nach der Zentrifugation verworfen. Die Zellpellets aus Ratten- und Maus-BALs wurden in 500  $\mu$ L PBS resuspendiert und die Zellzahl mithilfe eines Zellzählgeräts bestimmt.  $5 \times 10^5$  Zellen aus der BAL wurden durch Zentrifugation (5 Minuten bei 500 rpm) auf einem Objektträger fixiert und luftgetrocknet.

### 4.3.2 Proteinbiochemische Methoden

#### 4.3.2.1 Messung der Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität

Zur Untersuchung der PCLS-Vitalität wurde die Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Gewebekulturüberstand ermittelt. LDH ist ein ubiquitär vorkommendes, zytoplasmatisches Enzym und wird nur von den Zellen freigesetzt, deren Zellmembranstruktur nicht mehr intakt ist. LDH ist für etwa 24 h stabil. Das verwendete „*Cytotoxicity Detection Kit (LDH)*“ basiert auf dem Prinzip eines gekoppelten enzymatischen Tests. Dabei katalysiert das freigesetzte LDH die Oxidation von Lactat zu Pyruvat, während das Coenzym  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$  reduziert wird. Die zwei Wasserstoff-Atome des  $\text{NADH}/\text{H}^+$  werden im nächsten Schritt durch das Enzym Diaphorase auf das gelbe Tetrazoliumsalz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-Nitrophenyl]-5-Phenyltetrazoliumchlorid) übertragen, das sich zum Formazansalz rot verfärbt.

Es wurden jeweils 50  $\mu$ l von PCLS-Überständen im Doppelansatz auf eine Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen) aufgetragen. Zur Messung der maximalen LDH-Freisetzung wurden Überstände von Triton-lysierten Lungenschnitten verwendet. Diese Proben wurden vor der Messung im 1:2 Verhältnis mit PBS verdünnt. Die LDH Reagenzien A und B des *LDH-Kits* wurden im 1:45 Verhältnis (Katalysator:Farbstoff) gemischt, jeweils 50  $\mu$ l dieser Reaktionslösung auf die Proben pipettiert und 20 Minuten bei RT lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 490 nm mit dem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

#### 4.3.2.2 MTT-Assay

Die Messung intrazellulärer MTT-Umsetzung in Mitochondrien ermöglicht die Bestimmung des Verhältnisses lebender Zellen proportional zu gemessener Enzymaktivität. Dieser Test

basiert auf der enzymatischen Umwandlung von MTT zum blau-violetten Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen.

Dazu wurden vier PCLS nach der Inkubation mit 1 ml DMEM gewaschen und mit 500 µl einer 0.5 mg/ml MTT-Lösung (in DMEM) 2 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Lungenschnitte 30 Minuten in 500 µL Lysepuffer (10 % SDS und 0.6 % Eisessig in DMSO) unter Schütteln bei RT inkubiert. Die Überstände wurden in eine Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen) übertragen und die Absorption bei 570 nm (Referenzwellenlänge 600 nm) mit dem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen. Die Vitalität der Lungenschnitte wurde proportional zur Positivkontrolle (unbehandelte PCLS) bewertet.

#### **4.3.2.3 Quantitative Proteinbestimmung durch BCA Assay**

Die Gesamtproteinkonzentration von Proben wurde mithilfe des *BCA Protein Assay Kits* durch eine von Smith *et al.*, (1985) beschriebene Methode, deren Prinzip auf der Biuretreaktion basiert, bestimmt. Das Prinzip beruht auf einer Komplexbildung von  $\text{Cu}^{2+}$ -Kationen mit den Amid-Stickstoffen von Peptidbindungen im alkalischen Medium. Dabei werden  $\text{Cu}^{2+}$ -Kationen zu einwertigem  $\text{Cu}^+$  reduziert. Ein Kupferion bildet mit zwei Molekülen der Bicinchoninsäure (*bicinchoninic acid*, BCA) einen stabilen violett-farbenen Chelatkomplex, der bei einer Wellenlänge von 562 nm detektiert werden kann.

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte nach den Herstellerangaben. Dabei wurde eine Standardkurve durch Verdünnung von Rinder-Serumalbumin (*bovine serum albumine*, BSA) mit Konzentrationen von 25-2000 µg/ml in PBS generiert. In einer Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen) wurden je 25 µl der Probe oder Standardverdünnung mit 200 µl BCA-Reagenzlösung (Reagenzlösungen A und B im 50:1 Verhältnis) 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Proteinkonzentrationen von Proben und Standardverdünnungen wurden im Doppelansatz bestimmt. Die Absorption wurde bei 570 nm mit dem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen und die individuellen Konzentrationen mit Hilfe der Mikro WIN Software über eine Vier-Parameter-Auswertung anhand der gemessenen OD der Standardkurve ermittelt.

#### 4.3.2.4 ELISA

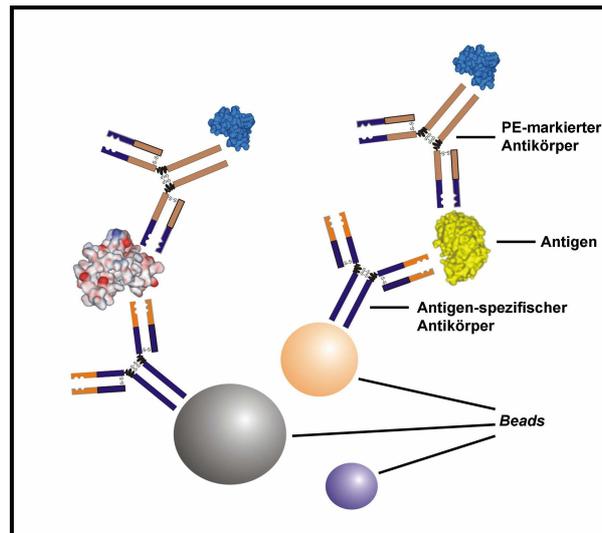
Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Detektion von mTNF $\alpha$ , mL-1 $\alpha$ , mMIP-1 $\beta$ , mEotaxin-2, mL-5, rTNF $\alpha$  und pTNF $\alpha$  durch die Verwendung kommerziell erhältlicher *Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kits* (ELISA *DuoSets*). Die ELISA-*Duosets* sind nach dem Prinzip des so genannten „*Sandwich-ELISA*“ aufgebaut. Der „*Sandwich-ELISA*“ stellt ein sensitives, immunologisches Nachweisverfahren zur Detektion geringer Mengen von Antigenen, wie z.B. Zytokinen und Chemokinen in Zellkulturüberständen dar. Für jedes zu bestimmende Antigen wird eine Standardkurve durch Verwendung bekannter Konzentrationen rekombinanten Proteins erstellt. Das Antigen wird durch einen, an der Oberfläche des Reaktionsgefäßes immobilisierten antigenspezifischen Antikörper (*Capture*-Antikörper) gebunden und kann durch einen zweiten antigenspezifischen, biotinylierten Antikörper (*Detection*-Antikörper) detektiert werden. An den biotinylierten Antikörper wird die Streptavidin-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (Streptavidin-HRP) assoziiert, die das hinzugefügte Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umsetzt und dadurch einen Farbstoffwechsel bewirkt. Zugabe von H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> stoppt die enzymatische Substratumsetzung und bewirkt einen Farbumschlag von blau zu gelb.

Der Nachweis löslicher Proteine mittels ELISA-*Duosets* erfolgte in „*Maxisorp*“-Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen. Während den Inkubationen wurden die Platten lichtgeschützt in einer Kammer gelagert. Der *Capture*-Antikörper wurde 1:180 in Carbonatpuffer (pH 9.4) verdünnt. 50  $\mu$ l der verdünnten *Capture*-Antikörper wurden in die einzelnen Vertiefungen pipettiert und über Nacht bei RT inkubiert. Danach wurde die Mikrotiterplatte dreimal mit PBS-Tween gewaschen. Hierzu wurde ein Mikrotiterplatten-Waschgerät verwendet. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurden 300  $\mu$ l PBS mit 1 % BSA in jede Vertiefung pipettiert und 1 h bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte erneut dreimal gewaschen. Die rekombinanten Proteine wurden in Konzentrationen von 31 pg/ml bis 2000 pg/ml in PBS (mit 1 % BSA) verdünnt. Die Proben zur Messung von mTNF $\alpha$ , mL-5, rTNF $\alpha$  und pTNF $\alpha$  wurden unverdünnt und für Bestimmung von mL-1 $\alpha$ , mMIP-1 $\beta$ , mEotaxin-2 unverdünnt oder 1:2 in PBS (mit 1 % BSA) verdünnt, verwendet. 50  $\mu$ l der Proben oder Standards wurden im Doppelansatz in die Vertiefungen pipettiert und 2 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation erfolgten erneut drei Waschvorgänge. Anschließend wurden je 50  $\mu$ l *Detection*-Antikörper (1:180 in PBS mit 1 % BSA verdünnt) in die Vertiefungen pipettiert und 2 h bei RT inkubiert. Streptavidin-HRP wurde unmittelbar vor dem Gebrauch 1:200 in PBS (mit 1 % BSA) verdünnt. 50  $\mu$ l der Streptavidin-HRP-Lösung

wurden nach dem dreifachen Waschen der Platte in jede Vertiefung aufgetragen und 20 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Platte zum letzten Mal dreimal gewaschen und mit je 50  $\mu\text{l}$  TMB (Substrat) in den Vertiefungen 20 Minuten bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 25  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  wurde die Substratumsetzung gestoppt, die Absorption bei 450 nm (Referenzwellenlänge 570 nm) mit einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen und mit Hilfe der Mikro WIN Software über eine Vier-Parameter-Auswertung ausgewertet.

#### **4.3.2.5 Quantitative Bestimmung von Proteinen durch *Multiplex*-Analyse**

Die Konzentrationen von verschiedenen Zytokinen und Chemokinen wurden mittels Luminex-Technologie detektiert. Mithilfe dieses Verfahrens konnten in einer Probe mehrere Antigene gleichzeitig nachgewiesen werden. In der Luminex-Technologie werden kleine sphärische Polystyrolpartikel (*Beads*), die im Inneren zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe aufweisen verwendet (Abb. 4). Die Variation der Anteile beider Farbstoffe codiert spektral eindeutig unterschiedliche *Beads*-Populationen. An die *Beads* sind Antikörper gekoppelt, die spezifisch das Antigen binden (Abb. 4). Durch einen weiteren PE-markierten Antikörper wird das Antigen ebenfalls spezifisch gebunden (Abb. 4). Mithilfe von zwei Lasern, die in dem Messgerät integriert sind, werden diese Komplexe identifiziert und quantifiziert. Der erste Laser dient der Anregung des ersten Farbstoffes, wodurch die Identifizierung der Antigene möglich ist. Durch den zweiten Laser wird der Fluoreszenzfarbstoff PE angeregt, wodurch anhand der Intensität der PE-Fluoreszenz die Konzentrationen der Antigene in den Proben qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Für die einzelnen Messungen wird für jedes zu messende Protein eine Standardkurve, durch Verwendung bekannter Konzentrationen des rekombinanten Proteins erstellt.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der Detektion von zwei verschiedenen Antigenen (a und b) in einer Probe durch Luminex-Technologie

Die Verwendung von *Bio-Plex Cytokine Assays* ermöglichte die gleichzeitige Bestimmung von mehreren Zytokinen und Chemokinen in PCLS-Überständen (extrazellulär) und -Lysatextrakten (intrazellulär). Zur Messung der Proteine in Primatenproben wurde ein *Bio-Plex Human Cytokine Assay* für hMCP-1, hIL-8 und hIL-6 und ein weiterer für hIL-1 $\beta$ , hG-CSF und hMIP-1 $\beta$  verwendet. Die Primatenproben wurden zur Bestimmung von hMCP-1, hIL-8 und hIL-6 1:10 in PBS mit 1 % BSA verdünnt und für hIL-1 $\beta$ , hG-CSF und hMIP-1 $\beta$  unverdünnt verwendet. Die Bestimmung von Zytokinen und Chemokinen in Mausproben erfolgte durch drei verschiedene *Bio-Plex Mouse Cytokine Assays*. Die Proben zur Messung von mMCP-1, mKC (IL-8), mG-CSF und mLIL-6 durch *Bio-Plex Assay (4-plex)* wurden 1:4 in PBS (mit 1 % BSA) verdünnt. Zur Bestimmung von mLIL-12(p40), mLIL-1 $\alpha$ , mLIFN $\gamma$ , mTNF $\alpha$ , mLIL-10, mMIP-1 $\beta$ , mEotaxin und mRANTES durch einen *Bio-Plex Assays (8-plex)* wurden die Proben unverdünnt eingesetzt. Die Messung von mTNF $\alpha$ , mLIL-1 $\alpha$ , mLIL-5, mLIL-12(p40), mG-CSF, mRantes, mEotaxin, mLIL-10 und mLIL-13 durch einen weiteren *Bio-Plex Assay (9-plex)* erfolgte ebenfalls in unverdünnten Proben.

Die Durchführung der Tests erfolgte nach den Herstellerangaben. Hierzu wurde zuerst die permeable Membran der *Bio-Plex* Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen) befeuchtet, indem in jede Vertiefung 100  $\mu$ l des *Bio-Plex* Test-Puffers pipettiert und mithilfe eines Plattenwaschgerätes entfernt wurden. Die *Beads*-Lösungen wurden nach Herstellerangaben im *Bio-Plex* Test-Puffer verdünnt (1:25), jeweils 50  $\mu$ l der verdünnten Lösung wurden in jede Vertiefung pipettiert und abgesaugt. Zum Waschen der Platte wurden in die Vertiefungen je

100 µl *Bio-Plex* Waschpuffer pipettiert und abgesaugt. Der Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Durch Verdünnung der Standardlösungen 1:4 in PBS (mit 1 % BSA) wurden acht Standardverdünnungen hergestellt. Die oberen und unteren Detektionsgrenzen für die gemessenen Proteine wurden in der Tab. 4 zusammengefasst. 50 µl der Proben oder Standardverdünnungen wurden in die Vertiefungen im Doppelansatz aufgetragen und 1 h bei RT lichtgeschützt unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreimal gewaschen. In jede Vertiefung wurden 25 µl der *Detection*-Antikörper-Lösung (1:10, 1:25, 1:50 oder 1:100 im *Bio-Plex Detection*-Antikörper Puffer verdünnt, abhängig von der Konzentration der Stock-Lösung) aufgetragen und 1 h bei RT lichtgeschützt unter Schütteln inkubiert. Dann wurde die Mikrotiterplatte dreimal gewaschen, je 50 µl der PE-Streptavidin-Lösung (1:100 im *Bio-Plex* Test-Puffer verdünnt) wurden in die Vertiefungen pipettiert und 10 Minuten bei RT lichtgeschützt unter Schütteln inkubiert. Zuletzt wurde die Platte dreimal gewaschen und die *Beads* wurden in 125 µl *Bio-Plex* Test-Puffer resuspendiert. Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem *Bio-Plex Suspension Array System* gemessen. Die Daten wurden durch die *Bio-Plex Manager*<sup>TM</sup> Software ausgewertet.

**Tab. 4:** Die obersten und untersten Detektionsgrenzen von Zytokinen und Chemokinen in *Bio-Plex Cytokine Assays*.

	Detektionsgrenzen [pg/ml]				
	Human (3-plex)	Human (3-plex)	Maus (4-plex)	Maus (8-plex)	Maus (9-plex)
<b>MCP-1</b>	0.8-35932		8.6-63706		
<b>IL-6</b>	0.9-22352		1.1-28337		
<b>Eotaxin</b>				59-50843	11-52565
<b>G-CSF</b>		1.8-17757	2.5-9398		1.9-2978
<b>IFN<math>\gamma</math></b>				2.2-37294	
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>				1.9-22739	1.3-1219
<b>IL-1<math>\beta</math></b>		2.4-21358			
<b>IL-5</b>					1.5-1627
<b>IL-8 (KC)</b>	4.7-29806		2.0-13273		
<b>IL-10</b>				6.6-81420	4.6-11086
<b>IL-12(p40)</b>				1.0-17299	1.2-4031
<b>IL-13</b>					2.3-11023
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>		1.9-14797		1.5-26992	
<b>RANTES</b>				1.2-11260	0.5-394
<b>TNF<math>\alpha</math></b>				4.5-61060	4.1-8030

### 4.3.3 Mikroskopische Methoden

#### 4.3.3.1 Histologische Zelldifferenzierung in BAL

Durch die May-Grünwald- und Giemsa-Färbung wurden die BAL-Zellen morphologisch differenziert. Hierzu wurden die Zellen zuerst 5 Minuten in der May-Grünwald-Lösung inkubiert. Dabei bindet der saure Farbstoff an zytoplasmatische Proteine, wodurch das Zytoplasma rot markiert wird. Im Anschluss wurden die Zellen 2 Minuten in PBS gewaschen und weitere 15 Minuten in Giemsa-Lösung (1:20 in *Aqua dest.* verdünnt) inkubiert. Die basischen Farbstoffe der Giemsa-Lösung binden an DNA und RNA, wodurch die Zellkerne blau markiert werden. 500 gefärbte Zellen wurden lichtmikroskopisch gezählt und morphologisch als Makrophagen, Eosinophile, Neutrophile oder Lymphozyten differenziert.

### 4.3.3.2 Konfokale Laserscanningmikroskopie und quantitative 3D-Bildanalyse

Durch konfokale Laserscanningmikroskopie (*confocal laser scanning microscopy*, CLSM) war es möglich, optische Schnitte in räumlich ausgedehnten Objekten aufzunehmen und mit Hilfe der LSM 510-Software die Schnittbilder schichtweise zu einer dreidimensionalen Darstellung (Z-Stapel) zusammenzufügen. Die quantitative Auswertung dieser Z-Stapel war durch Verwendung einer Software zur 3D-Bildanalyse (IMARIS 4.5.2) möglich.

#### 4.3.3.2.1 Calcein Acetylmethylester (AM)- und Ethidiumhomodimer-1 (EthD-1)-Färbung

Zum Nachweis lebender und toter Zellen wurden die PCLS mit den Fluoreszenzfarbstoffen Calcein Acetylmethylester (AM) und Ethidiumhomodimer-1 (EthD-1) gefärbt und durch CLSM untersucht. Calcein AM ist eine hydrophobe, zellmembranpermeable und nicht fluoreszierende Substanz. Im Zellinneren wird Calcein AM durch intrazelluläre Esterasen zum grün-fluoreszierenden Calcein umgesetzt, wodurch das Zytoplasma lebender Zellen gefärbt wird. EthD-1 ist ein DNA-Interkalator, durch dessen Fluoreszenz die Zellkerne toter Zellen markiert werden.

PCLS wurden mit 4  $\mu\text{M}$  Calcein AM und 4  $\mu\text{M}$  EthD-1 in DMEM 45 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Zur Entfernung des überschüssigen Farbstoffs wurden die PCLS dreimal mit jeweils 1 ml DMEM 5 Minuten gewaschen. Mikroskopische Aufnahmen wurden an mehreren repräsentativen Stellen in einem Lungenschnitt generiert (40x Wasserimmersionsobjektiv, Anregungswellenlängen 488 nm and 543 nm, Emissionsbreitpassfilter 505-550 nm und -langpassfilter 560 nm, Z-Stapeldicke 20  $\mu\text{m}$ ). Die quantitative Analyse der Calcein/EthD-1-Färbung erfolgte mittels IMARIS 4.5.2 Software.

#### 4.3.3.2.2 Immunhistochemische Färbung der Lungenschnitte

Die Expression von Zelloberflächenmarkern wurde *ex vivo* in lebenden Lungenschnitten immunhistochemisch mithilfe der CLSM detektiert. Zur Untersuchung der Expression von CD11c, CD40 und CD86 wurden PCLS aus Lungen von unbehandelten BALB/c Mäusen verwendet. Die Charakterisierung von MHC Klasse II<sup>+</sup>-Zellen erfolgte in PCLS aus Lungen von BALB/c und CD11c-EYFP-transgenen Mäusen. Weiterhin wurde die Expression von Zelloberflächenproteinen 24 h nach der Inkubation von PCLS mit CD4<sup>+</sup>-Zellen aus der Milz

von transgenen DO11.10 Mäusen, Ovalbumin und verschiedenen immunmodulatorischen Substanzen untersucht. Die Zelloberflächenproteine wurden durch direkte oder indirekte Färbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern nachgewiesen. Die Spezifität der Antikörperfärbung wurde durch parallele Färbung mit Antikörpern gleichen Isotyps, Konzentration und Fluoreszenz-Markierung untersucht. Alle Antikörperlösungen wurden im DMEM (pH 7.2) verdünnt.

Indirekter immunhistochemischer Nachweis von Zelloberflächenproteinen: PCLS wurden 2 h mit 2 µg/ml monoklonalen Ratte-anti-Maus I-A/I-E (I-A/I-E: MHC Klasse II Alloantigene) Antikörpers bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungen durch 15 Minuten Inkubation mit 1% BSA (in DMEM) bei RT geblockt. Dann erfolgte die Zugabe von 7.5 µg/ml des sekundären Antikörpers (Cy5-konjugiertem F(ab')<sub>2</sub>-Fragment Esel anti-Ratte IgG) und eine Inkubation für weitere zwei Stunden bei 4 °C. Nach zweimaligem Waschen für 15 Minuten im DMEM bei 4°C wurden die Lungenschnitte mikroskopisch untersucht.

Direkter immunhistochemischer Nachweis von Zelloberflächenproteinen: Der Nachweis von MHC Klasse II, CD40, CD86 und CD11c erfolgte mit monoklonalen, direkt Fluoreszenz-markierten Primärantikörpern. Die PCLS wurden zwei Stunden bei 4 °C mit 2 µg/ml PE-markiertem anti-Maus MHC Klasse II, FITC-markiertem Hamster anti-Maus CD40, Alexa Fluor<sup>®</sup> 488-markiertem Ratte anti-Maus CD86 und Alexa Fluor<sup>®</sup> 488-markiertem Hamster anti-Maus CD11c inkubiert. Zur Entfernung nicht-gebundener Antikörper wurden die Lungenschnitte zweimal jeweils 15 Minuten mit DMEM bei 4 °C gewaschen. Durch die Verwendung von CLSM ist es möglich gewesen bis zu drei verschiedene Marker gleichzeitig zu detektieren (40x Wasserimmersionsobjektiv, Anregungswellenlängen 488 nm, 543 and 633 nm, Emissionsbreitpassfilter 505-530 nm oder 505-550 nm und -langpassfilter 650 nm, Z-Stapeldicke 20 µm).

**Tab. 5:** Die verwendeten Konzentrationen der Antikörper, die Anregungs- und Emissionswellenlängen.

<b>Antikörper</b>	<b>Anregung [nm]</b>	<b>Emission [nm]</b>	<b>Konzentration [µg/ml]</b>
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 Hamster anti-Maus CD11c20	488	505-530	2
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 Hamster IgG	488	505-530	2
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 Ratte anti-Maus CD86	488	505-530	2
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 Ratte IgG2b	488	505-530	2
FITC Hamster anti-Maus CD40	488	505-530	2
FITC Hamster IgM	488	505-530	2
PE anti-Maus MHC Klasse II	543	560	2
PE Ratte IgG2b	543	560	2
Ratte-anti-Maus I-A/I-E-Antikörpers	-	-	2
Cy5 F(ab') <sub>2</sub> -Fragment Esel anti-Ratte IgG	633	650	7.5

#### 4.3.3.2.3 Quantifizierung konfokaler Fluoreszenzaufnahmen

Die IMARIS 4.5.2 Software ermöglichte die quantitative Analyse mikroskopischer Aufnahmen im 3D-Raum.

Die quantitative Analyse der Doppelfärbung mit Calcein AM und EthD-1 wurde in einem vordefinierten Volumen von 512 µm x 512 µm x 20 µm durchgeführt. Dabei wurde die Anzahl EthD-1 markierter Zellkerne und das Volumen des Calcein fluoreszierenden Volumens bestimmt. Die EthD-1 markierten Zellkerne wurden als definierte Objekte mit einem Durchmesser von mindestens 5 µm gezählt. Das zu analysierende Volumen, die Fluoreszenz-Intensitäten und Zellkerndurchmesser wurden einmalig definiert und als Standard festgelegt. Die EthD-markierten Zellkerne wurden in 10<sup>5</sup> µm<sup>3</sup> Calcein-markierten Volumen gezählt, d.h. die Anzahl toter Zellen wurde im Volumen von lebendem Gewebe bestimmt.

Die Färbung von MHC Klasse II in PCLS von CD11c-EYFP transgenen Mäusen wurde durch Bestimmung des Cy5- und EYFP-markierten Volumens in dem definierten Volumen von 512 µm x 512 µm x 20 µm des Lungenschnittes quantifiziert. Dabei wurde das Verhältnis zwischen dem MHC Klasse II-Cy5- und CD11c-EYFP-Volumen mithilfe der quantitativen 3D-Bildanalyse (IMARIS 4.5.2) bestimmt.

#### **4.3.4 Allergisches Asthma im Ratten- und Mausmodell**

Zur Induktion asthmatischer Inflammation im respiratorischen Trakt wurden die Versuchstiere mit Allergenen sensibilisiert. Nach einer Sensibilisierung wurden Veränderungen der Lungenfunktion *in vivo* und *ex vivo* durch parallele Messungen verfolgt. Die Bronchokonstriktion wurde dazu nach inhalativer Allergen- (EAR) und Methacholin (MCh)-, Acetylcholin (ACh)- oder Adenosin-Provokation (AHR) oder nach Zugabe dieser Substanzen zum Zellkulturmedium *ex vivo* in PCLS untersucht. Zur Induktion eines allergischen Asthmas im Tiermodell wurde Ovalbumin als proteinogenes sowie TMA und DNCB als niedermolekulare Allergene verwendet.

##### **4.3.4.1 Sensibilisierung und Provokationen mit OVA im Rattenmodell**

Die Sensibilisierung der BN Ratten erfolgte wie bereits von Glaab *et al.* beschrieben (Abb. 2) mit einem Gemisch von 50 µg Ovalbumin und 20 mg Aluminiumhydroxid (Al(OH)<sub>3</sub>), gelöst in 0.25 ml 0.9 % NaCl, das subkutan in den Nacken injiziert wurde [Glaab *et al.*, 2006]. Zum gleichen Zeitpunkt erfolgte eine intraperitoneale Injektion von 5x10<sup>8</sup> hitzeabgetöteter *Bordetella pertussis* Keime, gelöst in 0.15 ml 0.9 % NaCl. Am Tag 7 und 14 erfolgte die intratracheale Boosterung (Induktion der sekundären Immunantwort) unter Halothan-Narkose mit 30 µg Ovalbumin in 100 µl 0.9 % NaCl mithilfe eines Mikrosprays. Kontrolltiere wurden subkutan mit Al(OH)<sub>3</sub> in NaCl und intratracheal mit NaCl sensibilisiert. Die Tiere wurden am Tag 21 und/oder am Tag 28 einer lokalen, inhalativen Provokation mit Ovalbumin unterzogen und Änderungen der Lungenfunktionsparameter wurden *in vivo* durch die invasive Messmethode erfasst. Parallel dazu wurden am Tag 21 (ohne inhalative Ovalbumin-Provokation) und 28 (sieben Tage nach inhalativer Ovalbumin-Provokation *in vivo*) aus den Lungen sensibilisierter und Kontroll-Tiere PCLS hergestellt und die Änderungen der Lungenfunktion wurden *ex vivo* untersucht. Die Messung der AHR erfolgte am Tag 22, 23 und 29.

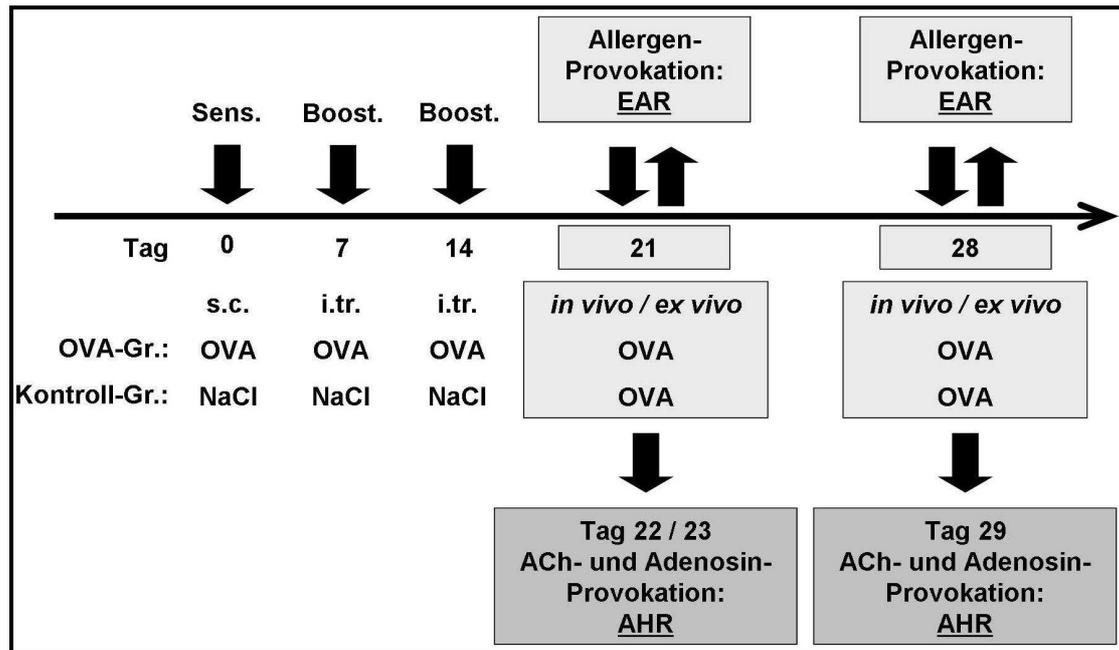


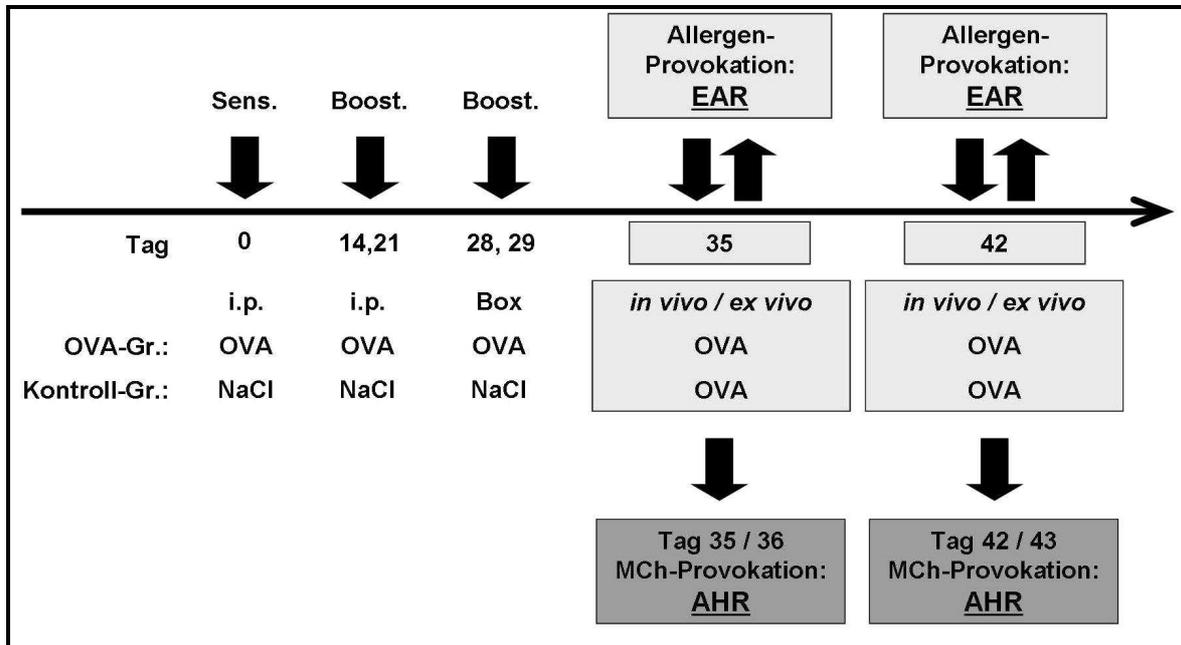
Abb. 5: Studiendesign für Ovalbumin-induziertes allergisches Asthma im Rattenmodell mit *in vivo* und *ex vivo* Lungenfunktionsmessungen

OVA = Ovalbumin, NaCl = isotonische Kochsalzlösung, EAR = „early allergic reaction“ dt. Frühphasereaktion, AHR = Atemwegshyperreagibilität auf Acetylcholin, s.c.: subkutane Applikation, i.tr.: intratracheale Applikation, Sens.: Sensibilisierung, Boost.: Boosterung (wiederholte Provokation mit OVA oder NaCl), Provokation (hier: inhalative *in vivo* Provokation mit OVA oder *ex vivo* Exposition der PCLS mit OVA).

#### 4.3.4.2 Sensibilisierung und inhalative Provokationen mit Ovalbumin im Mausmodell

Die Sensibilisierung von BALB/c Mäusen erfolgte wie bereits von Glaab *et al.* beschrieben (Abb. 6) [Glaab *et al.*, 2001]. Hierzu wurde den Tieren am Tag 0, 14 und 21 10 µg Ovalbumin und 1.5 mg Al(OH)<sub>3</sub>, gelöst in 0.2 ml 0.9 % NaCl, intraperitoneal appliziert. Am Tag 28 und 29 wurden die Tiere einer inhalativen Boosterung in einer Plexiglas-Box mit Ovalbumin oder NaCl unterzogen. Dazu wurde eine 1 %-ige OVA-Lösung mithilfe des Aerosolgenerators "Pari LC Star", bei 20 L/Minute Durchfluss in die Box geleitet. Die inhalative Boosterung von Mäusen wurde für einen Zeitraum von 20 min durchgeführt. Die Kontrollgruppen wurden mit 0.9 % NaCl behandelt. Am Tag 35 und/oder am Tag 42 erfolgte eine lokale, inhalative Ovalbumin-Provokation an orotracheal intubierten Tieren. Während dieser inhalativen Provokation wurde die *in vivo* Lungenfunktion erfasst. Die inhalative *in vivo* MCh-Provokation erfolgte am Tag 36 und/oder 43 24 h nach Ovalbumin-Challenge. Die Messung der *ex vivo* Bronchokonstriktion erfolgte am Tag 35 und/oder 42 nach *in vitro* Exposition mit OVA. Die *ex vivo* Provokation mit MCh (0.01 - 100 µM MCh) in PCLS

wurde 4 h nach Präparation der Schnitte ohne erneute Allergen-Restimulation und 16 h nach Inkubation mit Ovalbumin durchgeführt.



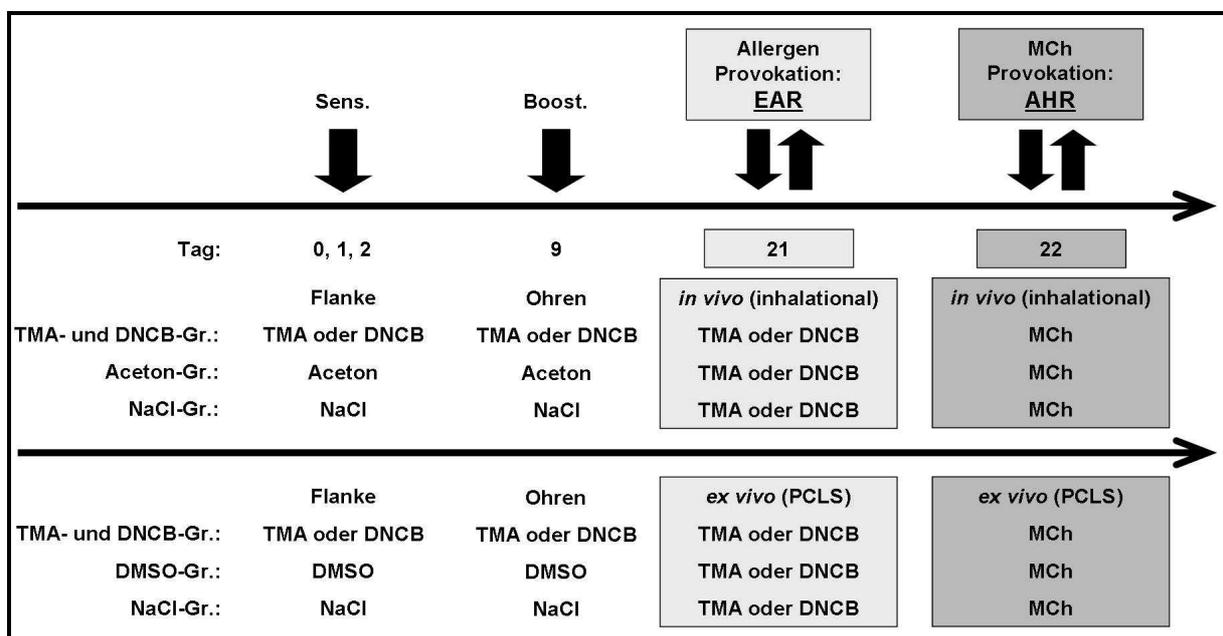
**Abb. 6: Studiendesign für Ovalbumin-induziertes allergisches Asthma im Tiermodell mit BALB/c Mäusen mit *in vivo* und *ex vivo* Lungenfunktionsmessungen**

OVA = Ovalbumin, NaCl = isotonische Kochsalzlösung, EAR = „early allergic reaction“ dt. Frühphasereaktion, AHR = Atemwegshyperreagibilität auf Methacholin, i.p.: intraperitoneale Applikation, Sens.: Sensibilisierung, Boost.: Boosterung dt. wiederholte Provokation mit OVA oder NaCl (hier: an Tagen 14 und 21 intraperitoneal oder an Tagen 28 und 29 inhalativ in einer Box), Provokation (hier: inhalative *in vivo* Provokation oder *ex vivo* Exposition der PCLS mit OVA).

#### 4.3.4.3 Sensibilisierung mit TMA und DNCB im Mausmodell

Die systemische Sensibilisierung der BALB/c Mäuse mit TMA und DNCB erfolgte über die Haut an Flanken und hinter den Ohren (Abb. 7). Hierzu wurden ein Tag vor der ersten Sensibilisierung die Flanken der Tiere rasiert. An den Tagen 0, 1 und 2 wurde auf die Flanken jeweils 50 µl einer 10 %-igen TMA und 1 %-igen DNCB Lösung aufgetragen. Am Tag 8 wurde die Behandlung mit Substanzen wiederholt, wobei jeweils 25 µl der Lösungen hinter die Ohren aufgetragen wurde. TMA und DNCB wurden in einer Mischung aus Aceton und Olivenöl (Verhältnis: 4:1) gelöst. Durch die Untersuchung der Vitalität von lebenden Lungenschnitten wurde nachgewiesen, dass Aceton *ex vivo* auch in sehr geringen Konzentrationen hochgradig zytotoxisch wirkt. Aus diesem Grund erfolgte die Sensibilisierung der Tiergruppen für *ex vivo* Experimente unter der Verwendung von DMSO als Lösungsmittel. Die Kontrollgruppen wurden mit Aceton-Olivenöl oder DMSO-Olivenöl behandelt. Zur Überprüfung möglicher irritativer Effekte von Aceton und DMSO wurde eine

Tiergruppe mit Natriumchlorid behandelt. Am Tag 21 wurden die Tiere intraperitoneal mit 35 mg/kg Pentobarbital-Na narkotisiert, orotracheal intubiert und inhalativ mit trockenen TMA- und DNCB-Aerosolen provoziert. Die AHR wurde 24 h nach inhalativer Allergenprovokation als Reaktion auf stufenweise ansteigende MCh-Dosen untersucht. Die Messung der *ex vivo* Bronchokonstriktion erfolgte am Tag 21 nach Exposition der Lungenschnitte mit TMA und DNCB. *Ex vivo* Bronchokonstriktion nach MCh-Provokation wurde 4 h nach PCLS-Präparation, ohne Allergen-Restimulation und 16 h nach der Inkubation mit TMA und DNCB gemessen.



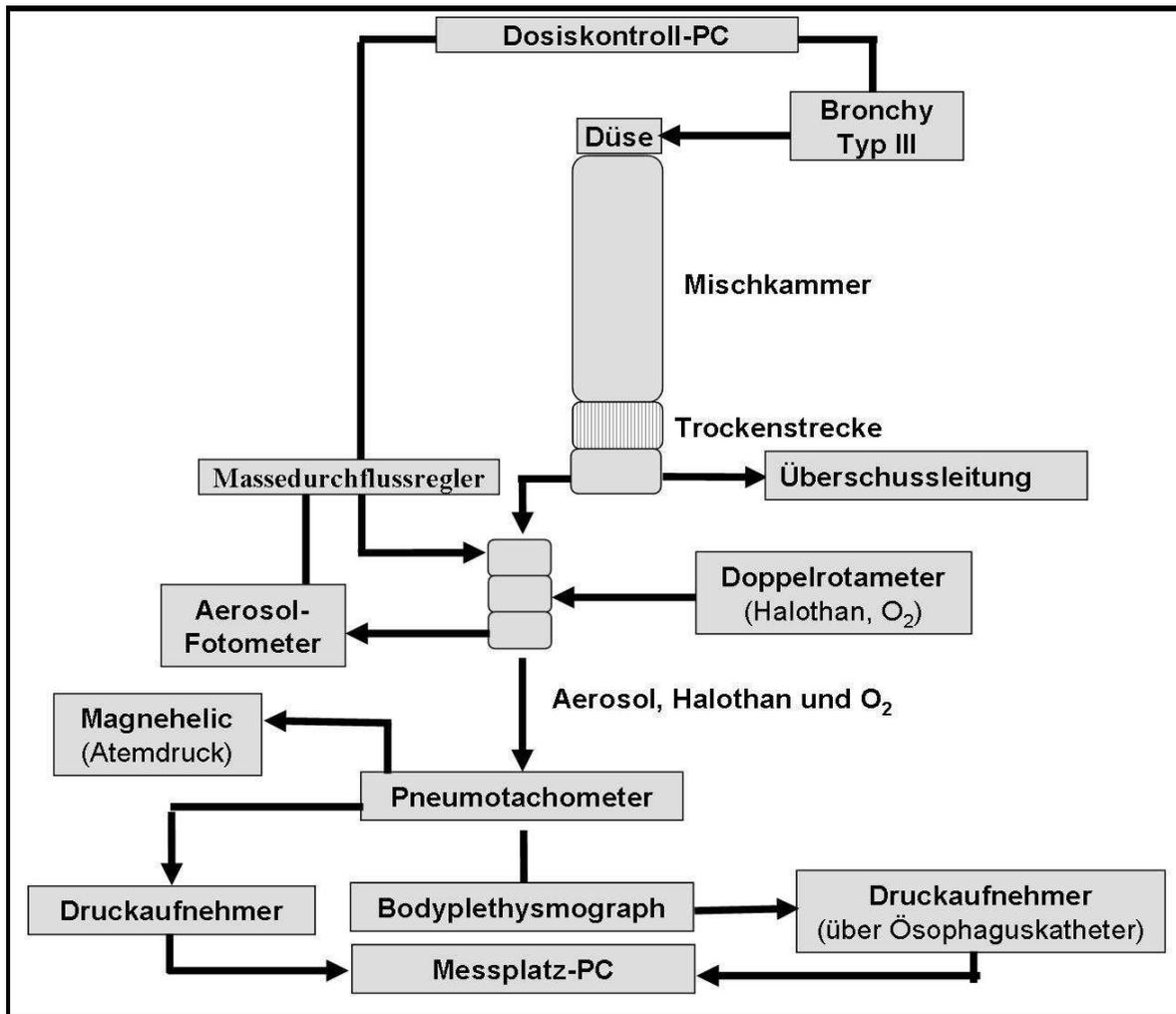
**Abb. 7: Studiendesign für TMA- und DNCB-induzierte Sensibilisierung von BALB/c Mäusen und anschließende *in vivo* und *ex vivo* Lungenfunktionsmessungen**

TMA = Trimellitsäureanhydrid, DNCB = 2,4-Dinitrochlorbenzol, NaCl = isotonische Kochsalzlösung, MCh = Methacholin, DMSO (Dimethylsulfoxid) und Aceton = organische Lösungsmitteln, EAR = „early allergic reaction“ dt. Frühphasereaktion, AHR = Atemwegshyperreagibilität auf MCh, Sens.: Sensibilisierung, Boost.: Boosterung.

#### 4.3.4.4 Aerosolgenerierung und Detektionssysteme zur Erfassung von *in vivo* Lungenfunktionsparametern

Die Aerosolgenerierung für die inhalative Provokation während der *in vivo* Lungenfunktionsmessungen in BALB/c Mäusen und BN Ratten wurde wie bereits veröffentlicht (Glaab *et al.*, 2004, Glaab *et al.*, 2005, Hoymann, 2007) durchgeführt. Hierzu wurde die totale inhalative Dosis durch ein Computer-gesteuertes Dosis-Kontrollsystem, basierend auf dem gemessenen respiratorischen Minutenvolumen und der

Aerosolkonzentration für jedes Tier kalkuliert und kontrolliert. Die Aerosole wurden über eine Mikrozerstäuberdüse generiert. Dazu wurde die entsprechende Substanzlösung durch das Aerosolgenerationssystem (Bronchy Typ III) unter Zuführen von Zerstäuber- und Verdünnungsluft über die Mikrodüse in eine Aerosol-Mischkammer geleitet. Die Mikrodüse erzeugte, entsprechend den Einstellungen der Spaltgröße, Teilchen mit verschiedenen aerodynamischen Massenmediandurchmessern (MMAD). Durch Temperierung der Mischkammer auf 35-50 °C wurden die Aerosole getrocknet. Im Folgenden erfolgte die Kühlung und Nachtrocknung der Partikel in einer Trockenkammer, die zwei druckluftumspülte Feuchtigkeitstauscher aus Röhrchen mit semipermeablen Membranen enthielt. Anschließend wurde ein Teil der Aerosole durch die Mischkaskaden geleitet und zum Ausgleich eines Über- oder Unterdrucks wurde die überschüssige Aerosolmenge über eine Leitung entfernt. In der ersten Mischkaskade erfolgte die Zufuhr von Verdünnungsluft durch einen Massedurchflussregler (*mass flow controller*, MFC) und in der zweiten Kaskade wurde mithilfe eines Doppelrotameters 30 % Sauerstoff und 0.8 % Halothan (Narkose-Gas) hinzugefügt. Aus der dritten Mischkaskade wurde ein Teil des Aerosol-Gas-Gemisches zu einem Aerosol-Fotometer geleitet und dadurch die Aerosolkonzentration bestimmt. Ein weiterer Teil des Aerosol-Gas-Gemisches wurde zum 5-Gas-Monitor (Oxyanga) zur Bestimmung des Sauerstoff- und Halothan-Gehaltes geleitet. Die im Bodyplethysmographen platzierte Maus atmete über den Trachealtubus spontan Luft ein, die mit definierten Mengen Aerosol, Narkosegas und Sauerstoff angereichert war. Die Messung des Atemflusses erfolgte über einen an den Differenzialdruckaufnehmer (DP 45-14) verbundenen Pneumotachometer. Der intrapleurale Druck wurde indirekt über den im Ösophagus platzierten Katheter mithilfe eines Druckaufnehmers (P-75, Typ 379) bestimmt. Die Signale beider Druckaufnehmer wurden durch jeweils einen Verstärker (*carrier frequency bridge amplifier*, CFBA, Typ 677) amplifiziert. Die Aerosolkonzentration wurde kontinuierlich über ein gravimetrisch kalibriertes Reinluftfotometer (Eigenbau, Fraunhofer ITEM) kontrolliert. Die Signale des Fotometers und der beiden Verstärker wurden durch den Analog-Digital-Umwandler (DT 3002) konvertiert und in Echtzeit an dem Messplatz-PC wiedergegeben. Die Detektion und Archivierung der Daten erfolgte unter Verwendung der HEM 3.5 Software. Nach der Detektion der Basiswerte für 60 Sekunden wurde die Aerosol-Exposition gestartet und die Änderung der respiratorischen Parameter erfasst. Die Expositionsdauer war nach den erforderlichen Aerosol-Konzentrationen definiert.



**Abb. 8: Aerosolgenerierung und Detektionssysteme für die inhalative Provokation mit Substanzen**

Die Inhalationsanlage zur inhalativen Aerosol-Exposition ist mit den wichtigsten Messgeräten und Vorgängen in diesem Schema dargestellt.

Aus den erfassten Werten des transpulmonalen Druckes, des Atemzugvolumens und des Atemflusses wurden die Lungenfunktionsparameter Lungenresistance ( $R_L$ ) und dynamische Compliance ( $C_{dyn}$ ) kalkuliert. Der Anstieg in  $R_L$  bzw. der Abfall in  $C_{dyn}$  wurde als Delta-Prozent in Bezug auf die Basiswerte berechnet. Der Anstieg in  $R_L$  oberhalb der Basiswerte gab den zunehmenden Widerstand in den zentralen, großen Atemwegen an. Der Abfall der  $C_{dyn}$ , unter den Basiswerten charakterisierte die Veränderungen in großen und kleinen Atemwegen. Die Exposition mit Allergen-Aerosolen dauerte abhängig von der erforderlichen Allergendosis maximal 15 Minuten. Während der Exposition und bis zu 30 Minuten danach wurden die respiratorischen Parameter erfasst.

#### 4.3.4.5 Lungenfunktionsmessungen

##### 4.3.4.5.1 *In vivo* Lungenfunktionsmessungen

*In vivo* Messungen der Lungenfunktion wurde wie bereits veröffentlicht (Glaab *et al.*, 2004, Glaab *et al.* 2005, Hoymann, 2006) durchgeführt.

*In vivo* Lungenfunktionsmessung im BALB/c Mausmodell: Zur Messung der Bronchokonstriktion *in vivo* wurden BALB/c Mäuse intraperitoneal mit 35 mg/kg Pentobarbital-Na (bei Allergenprovokation) oder 67 mg/kg Propofol (bei Methacholin-Exposition) narkotisiert. Die Tiere wurden orotracheal intubiert und inhalativ mit trockenen Aerosolen provoziert. Zur Untersuchung der *in vivo* EAR wurden zuerst die Basiswerte erfasst, die inhalative Allergenexposition gestartet und die Änderungen der Lungenfunktionsparameter während der Exposition und 15 Minuten danach detektiert. Während der inhalativen Allergenprovokation atmeten die Tiere ein Gemisch aus 30 % Sauerstoff und 0.8 % Halothan. Die Änderung der Lungenfunktion nach inhalativer Allergenprovokation wurde als Unterschied im prozentualen  $R_L$ -Anstieg zwischen der sensibilisierten und Kontrolltiergruppe charakterisiert. Die Ovalbumin-Aerosole wurden aus einer 2 %-igen Ovalbumin-Lösung generiert. Für die inhalative Allergenprovokation wurde TMA gemahlen und als trockenes Aerosol über das Dosis-Kontrollsystem inhalativ appliziert. DNCB wurde bei 70 °C geschmolzen und mithilfe des Inhaliergeräts „Pari LC Star“ als trockenes Aerosol inhalativ appliziert. Eine Übersicht über die inhalative Dosen, die Expositionszeiten und MMADs zur inhalativen Allergenprovokation ist in Tab. 6 zusammengefasst.

**Tab. 6:** Inhalative Dosen der Allergenaerosole, die Expositionszeiten und MMADs.

Allergen	Inhalative Dosis [ $\mu\text{g}$ ]	Expositionsdauer [min]	MMAD [ $\mu\text{m}$ ]
Ovalbumin	50	10	1.8
TMA	20	15	3.2
DNCB	0.3	15	2.2

AHR als unspezifische Bronchokonstriktion auf ansteigende MCh-Dosen wurde 24 h nach inhalativer Allergenprovokation gemessen. Die MCh-Aerosole (MMAD: 2.4  $\mu\text{m}$ ) wurden aus einer 5 %-igen Acetyl- $\beta$ -Methylcholinchlorid-Lösung generiert. Zur Aufrechterhaltung der

Narkose wurden die Mäuse mit 1.5 % Halothan während der inhalativen Provokation mit stufenweise ansteigenden Dosen MCh-Aerosol (0.063  $\mu\text{g}$ , 0.125  $\mu\text{g}$ , 0.25  $\mu\text{g}$ , 0.5  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$ , 2  $\mu\text{g}$  und 4  $\mu\text{g}$ ) exponiert. Zwischen zwei Expositionen wurde für jeweils drei Minuten kein Aerosol dem Luftgemisch zugefügt, damit erneut die Basiswerte erreicht werden konnten. Die MCh-Dosen wurden nur bis zu 200 %-igem  $R_L$ -Anstieg gesteigert. Die effektiven MCh-Dosen, die einen  $R_L$ -Anstieg von 50 %, 100 %, 150 % oder 200 % auslösen ( $ED_{50}$ ,  $ED_{100}$ ,  $ED_{150}$  und  $ED_{200}$ ), wurden aus den individuellen Dosis-Wirkungskurven ermittelt (Software: GraphPad Prism 4, Version 4.03).

*In vivo* Lungenfunktionsmessung im BN Rattenmodell: Die Ratten wurden zur orotrachealen Intubation und zur Messung der Lungenfunktion inhalativ mit Halothan (1.5-4 %) narkotisiert. Zur Vermeidung einer Hypoxie wurde dem Luft-Gas-Gemisch 40 % Sauerstoff hinzugefügt. Die EAR wurde als Unterschied im  $R_L$ -Anstieg (%) zwischen der sensibilisierten und Kontrolltiergruppe während und nach inhalativer Ovalbumin-Provokation (120  $\mu\text{g}$  Aerosol in 10 Minuten, MMAD: 1.8  $\mu\text{m}$ ) charakterisiert. Die AHR wurde als Reaktion auf stufenweise ansteigende Dosen ACh-Aerosol (2  $\mu\text{g}$ , 4  $\mu\text{g}$ , 8  $\mu\text{g}$ , 16  $\mu\text{g}$  und 32  $\mu\text{g}$ ), 24 h oder 48 h nach Allergenprovokation untersucht. Die effektiven ACh-Dosen, die einen  $R_L$ -Anstieg von 50 %, 100 %, 150 % oder 200 % auslösen ( $ED_{50}$ ,  $ED_{100}$ ,  $ED_{150}$  und  $ED_{200}$ ) wurden ebenfalls aus den individuellen Dosis-Wirkungskurven ermittelt. Weiterhin wurde im Rattenmodell die Hyperreagibilität der Atemwege nach intervenöser Applikation von 0.3  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$  und 10  $\mu\text{g}$  Adenosin drei Stunden nach inhalativer Allergenprovokation untersucht.

#### **4.3.4.5.2 *Ex vivo* Messung der Bronchokonstriktion in PCLS**

Die Präparation von PCLS wurde wie bei Martin *et al.* und Held *et al.* beschrieben durchgeführt [Martin *et al.*, 1996, Held *et al.*, 1999]. Die *ex vivo* Untersuchung der Bronchokonstriktion erfolgte nach der Provokation der Lungenschnitte mit Allergenen oder bronchokonstriktorisch wirkenden Substanzen wie MCh, ACh und Adenosin. Die Kontraktion der Atemwege wurde durch eine analoge Videokamera, die an ein inverses Mikroskop angeschlossen war, detektiert. Dabei wurde die Fläche des Atemweges vor Exposition mit den Substanzen als 100 % definiert und die substanzinduzierte Bronchokonstriktion als prozentuale Abnahme der Atemwegesfläche (maximale Kontraktion) bestimmt. Der zeitliche Verlauf der Kontraktion wurde durch die Berechnung der AUC (*airway under the curve* bzw. Fläche unter der Kurve) erfasst. Für die Messung der

Bronchokonstriktion an PCLS wurden möglichst gleich große Atemwege ausgewählt. Zur Messung der *ex vivo* Bronchokonstriktion wurden PCLS in der Vertiefung einer Zellkulturplatte (24 Vertiefungen) mit einer Klammer in 1 ml Medium (DMEM) fixiert. Nach Zugabe des Allergens oder bronchokonstriktorisch wirkender Substanzen wurden in einem Abstand von 5 Sekunden 5-20 Minuten Bilder aufgenommen. Eine Übersicht der verwendeten Substanzkonzentrationen zur Untersuchung der *ex vivo* Lungenfunktion wurde in der Tab. 7 zusammengefasst.

**Tab. 7:** Konzentrationen der verwendeten Substanzen zur Untersuchung der *ex vivo* Lungenfunktion.

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>
<b>Ovalbumin</b>	1 mg/ml
<b>TMA</b>	1.2 µg/ml
<b>DNCB</b>	1 µg/ml
<b>MCh</b>	0.1-100 µM
<b>ACh</b>	0.1-100 µM
<b>Adenosin</b>	10 mM

#### 4.4 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistische Analyse der Daten erfolgte durch den zweiseitigen ungepaarten t-Test (GraphPad Prism 4, Version 4.03). Hierbei wurden die verschiedenen Tiergruppen oder in einem Tier die verschiedenen Konzentrationen einer Substanz mit der Gewebekontrolle verglichen. Die Differenzen zwischen zwei Datengruppen wurden ab einem Level von  $p < 0.05$  als signifikant gewertet. Im Falle multipler Vergleiche wurden die Werte, durch die von Benjamin und Hochberg (1995) beschriebene Methode (*false discovery rate*), mit Hilfe des Programms R 2.7.0 kontrolliert und korrigiert. Die Ausnahme bei der statistischen Auswertung bildeten die gemessenen Proteinkonzentrationen in den Primatenproben. Hierbei wurde ein gepaarter t-Test verwendet, da es sich bei den einzelnen Donoren um Individuen verschiedenen Alters, Geschlechts und Gesundheitszustandes handelte.

## 5 Ergebnisse

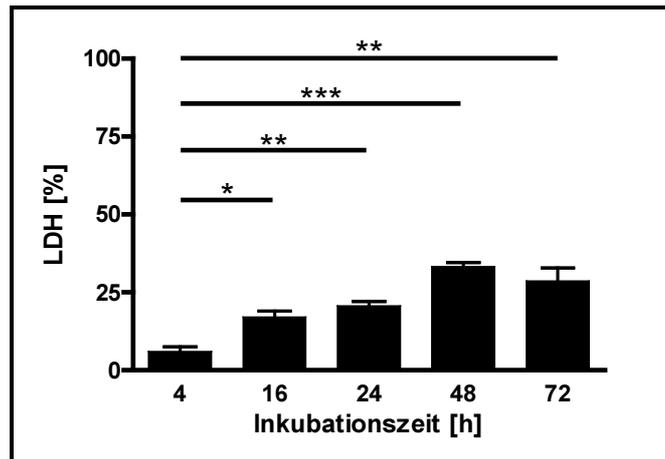
### 5.1 Immuntoxikologischen Effekte in PCLS

Im Rahmen dieser Arbeit wurden lokale respiratorische Irritation und Inflammation induziert durch Chemikalien und andere Substanzen *ex vivo* in lebenden Lungenschnitten charakterisiert. Hierzu wurden aus den Lungen naiver, nicht behandelter Tiere PCLS hergestellt, unter Standard-Zellkulturbedingungen kultiviert und mit immunmodulatorischen Substanzen oder bekannten Allergenen submers exponiert. Anschließend wurden verschiedene Endpunkte wie Zytotoxizität, Zytokin/Chemokin-Produktion und lokale Mitogen-Antwort untersucht. Die Vitalität der PCLS wurde photometrisch durch Bestimmung der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand oder Umsetzung von MTT im Gewebe untersucht. Des Weiteren wurde die PCLS-Vitalität mikroskopisch nach Färbung mit Calcein AM/EthD-1 mittels CLSM quantitativ ermittelt. Zur Charakterisierung immunologischer Reaktionen in PCLS wurden die Zytokin/Chemokin-Produktion und die Expression von Zelloberflächenmarker vor allem auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) untersucht.

#### 5.1.1 Optimierung der Kultivierungsbedingungen von PCLS

Zur exakten Abgrenzung unspezifischer Irritation von Substanz-induzierter Inflammation wurden im ersten Schritt die optimalen Kultivierungsbedingungen für PCLS bestimmt. Hierzu wurden in umfangreichen Arbeiten die experimentellen Bedingungen, wie die Kultivierungsdauer und Mediumzusätze geprüft und im Detail angepasst. Die toxischen Effekte auf lokale Immunreaktionen in PCLS, wie die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine wurden durch Untersuchungen der zeit- und konzentrationsabhängigen Zytotoxizität ausgeschlossen.

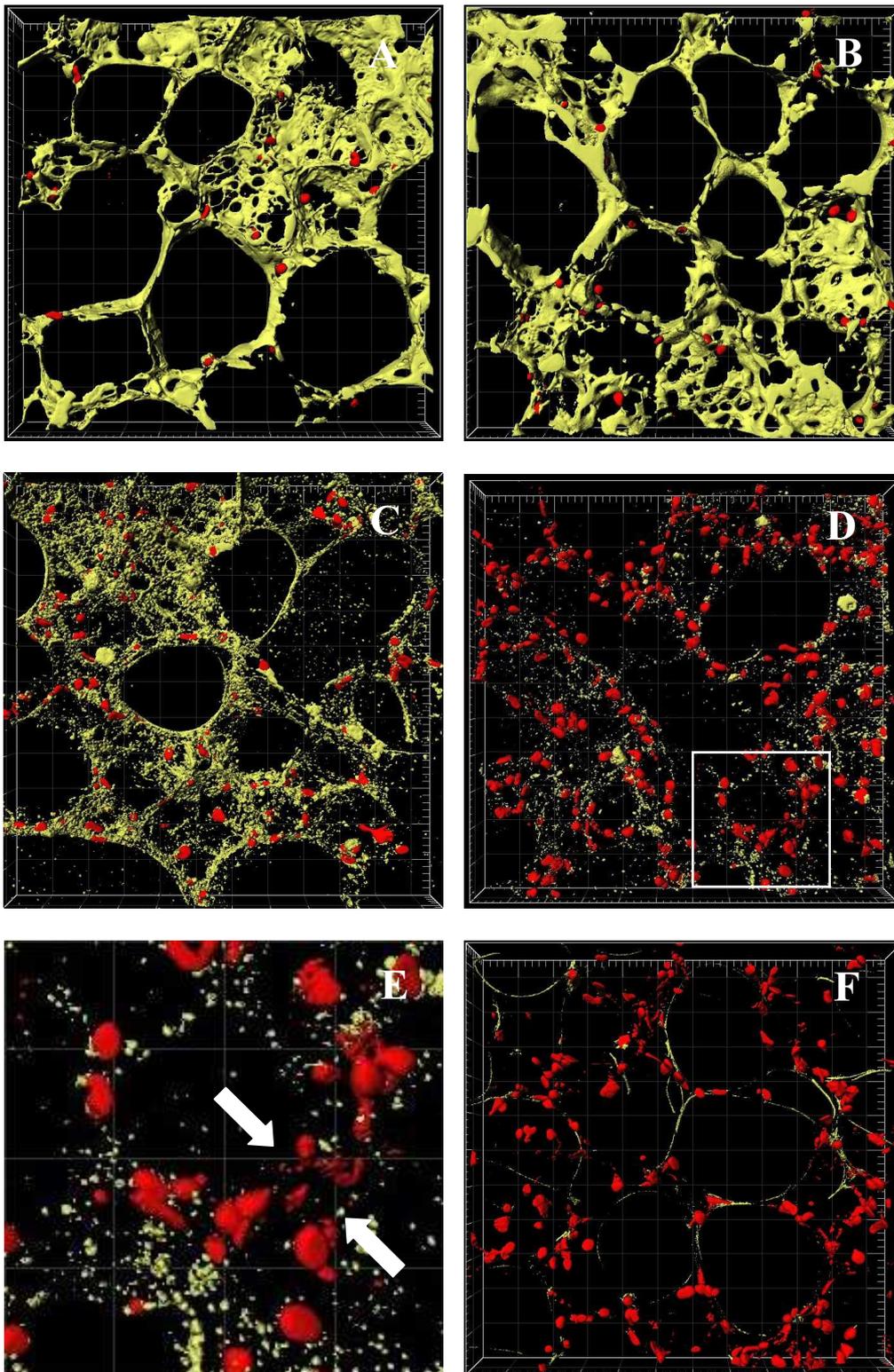
Nach Inkubation der Lungenschnitte in serumfreiem Medium zeigte sich, dass die LDH-Aktivität im Verhältnis zur Positivkontrolle (mit Triton X-100 lysierten PCLS) bis 24 h unter 20 % blieb (Abb. 9). Längere Kultivierungen führten zu erhöhter LDH-Aktivität im Kulturüberstand, d.h. induzierten den Verlust der Zellvitalität in PCLS (Abb. 9).



**Abb. 9: Zeitabhängige LDH-Freisetzung von PCLS**

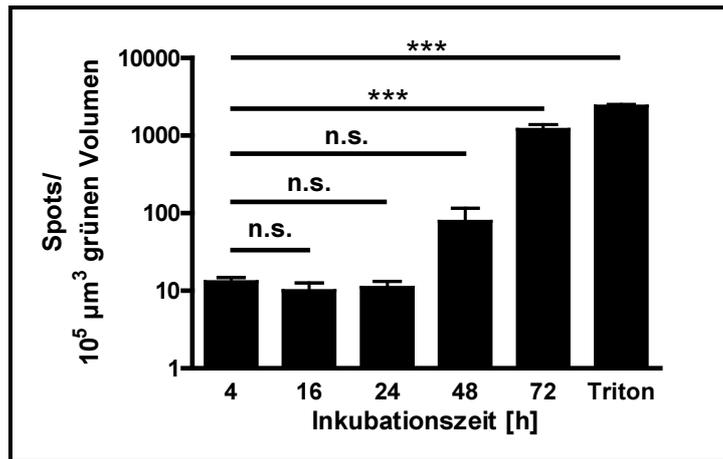
Die Vitalität von PCLS wurde als relative LDH-Aktivität im Gewebekulturüberstand nach Inkubation im DMEM für 4 bis 72 Stunden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % Luftfeuchtigkeit, ohne Mediumwechsel charakterisiert. Die Ergebnisse sind prozentuell zum gesamten LDH Gehalt (100 %) nach der Gewebelyse mit Triton X-100 kalkuliert. Mittelwert ± SEM. n = 3. Statistik durch *unpaired* t-Test im Vergleich zu 4 h Inkubation: \* = p < 0.05, \*\* = p < 0.01, \*\*\* = p < 0.001.

Durch die Fluoreszenzfärbung mit Calcein/EthD-1 konnte die Gewebestruktur der Lungenschnitte gut visualisiert werden. Dabei sind die Lungenalveolen in netzförmiger Anordnung, wie auch die hauchdünnen Wände der Lungenalveolen sehr gut erkennbar. Die 3D-Gewebestruktur der Lunge ist in PCLS besser erhalten als in dünnen Lungenschnitten, wo die wenigen und jeweils in derselben optischen Ebene liegenden Alveolarwände meist nur ein unzureichendes Bild ergeben. Durch die mikroskopische Untersuchung der Calcein/EthD-1-Färbung konnte die intakte alveolare Struktur in PCLS nach Inkubationen für 4 h bis 24 h nachgewiesen werden (Abb. 10 A und B). Die quantitative Analyse dieser fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mittels IMARIS zeigte, dass das Verhältnis von toten zu lebenden Zellen von ca. 12 Spots/10<sup>5</sup> μm<sup>3</sup> Zellvolumen zwischen 4 h bis 24 h konstant blieb (Abb. 11). Die Kultivierungen von PCLS in serumfreien Medium länger als 24 h induzierten eine erhöhte Anzahl EthD-1 markierter Zellkerne, die Auflösung der alveolaren Gewebestruktur und die Degenerierung von Nuclei (Abb. 10 C, D, E und Abb. 11).



**Abb. 10: Fluoreszenzmikroskopische 3D-Bilder von PCLS, die mit 4  $\mu$ M Calcein AM und 4  $\mu$ M EthD-1 nach 4 h (A), 24 h (B), 48 h (C), and 72 h (D, E) Kultivierung und nach Gewebelyse (F) gefärbt wurden**

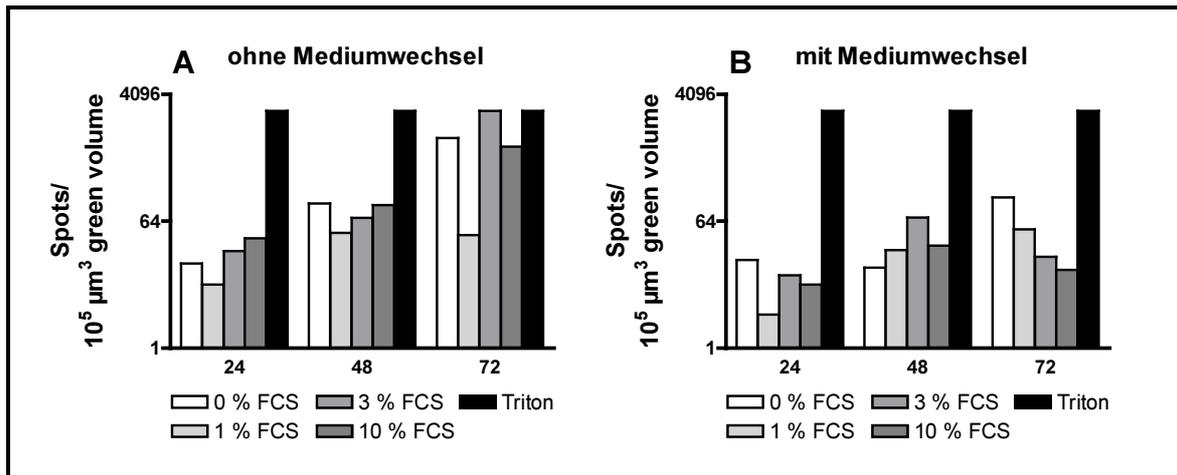
Im Bild D wurde ein Ausschnitt markiert und vergrößert als Bild E (Pfeile markieren die Degeneration von Nuclei) dargestellt. Die Z-Stapel wurden in zwei Fluoreszenzkanälen durch CLSM aufgenommen (40x Wasserimmersionsobjektiv, Anregungswellenlängen 488 nm und 543 nm, Emissionsbreitpassfilter 505-550 nm und -langpassfilter 560 nm, Z-Stapeldicke 20  $\mu$ m, Gitternetzeinheiten = 20  $\mu$ m) und mit IMARIS 4.5.2 analysiert. Die Zellkerne ( $\varnothing$  5  $\mu$ m) von toten Zellen sind rot und das Zytoplasma lebender Zellen ist grün markiert.



**Abb. 11: Die quantitative Analyse der Calcein/EthD-1-Färbung in PCLS**

PCLS-Vitalität nach 4 h bis 72 h Kultivierung oder nach der Gewebelyse mit Triton X-100 wurde durch die quantitative Analyse der Calcein AM/EthD-1-Färbung mittels IMARIS 4.5.2 ermittelt. Die Vitalität ist angegeben als Anzahl der  $5\text{-}\mu\text{m}$   $\varnothing$  Spots (Zellkerne toter Zellen) in  $10^5 \mu\text{m}^3$  grünes Gewebevolumen (Zytoplasma lebender Zellen). Mittelwert  $\pm$  SEM.  $n_{(4-24 \text{ h})}=5$ ,  $n_{(48 \text{ h})}=3$ ,  $n_{(72 \text{ h})}=4$ ,  $n_{(\text{Triton})}=2$ . Statistik durch *unpaired* t-Test im Vergleich zu 4 h Inkubation: \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .

Der Einfluss von serumreichem Zellkulturmedium auf die Kultivierung von PCLS wurde bis 72 h untersucht. Die Zugabe von 1 % FCS beeinflusste nach 24 h Kultivierung die PCLS-Vitalität positiv, wenn das Zellkulturmedium zweimal am Tag erneuert wurde. Ohne Mediumwechsel wurde die PCLS-Vitalität durch 1 % FCS bis zu 72 h positiv beeinflusst (Abb. 12 A). 3 % und 10 % FCS wirkten nur im Zusammenhang mit Mediumwechsel positiv auf die PCLS-Vitalität nach 72 h Kultivierung (Abb. 12 B). Durch den Mediumwechsel wurde die Vitalität von PCLS im serumfreien Zellkulturmedium bis 48 h Inkubation erhalten. In folgenden Experimenten wurde dem Zellkulturmedium kein FCS zugesetzt und bei Bestimmung von Proteinkonzentrationen in extra- und intrazellulären Proben das Medium nicht erneuert.



**Abb. 12: Zeitabhängige Änderungen der PCLS-Vitalität nach 4 h bis 72 h Kultivierung mit 1 %, 3 % und 10 % FCS oder nach der Gewebelyse mit Triton X-100**

Das Zellkulturmedium wurde entweder nicht (A) oder zweimal am Tag (B) gewechselt. Die Vitalität wurde durch quantitative Analyse der Calcein AM/Ethd-1-Färbung mittels IMARIS 4.5.2 bestimmt. Die Vitalität ist angegeben als Anzahl der 5- $\mu\text{m}$   $\varnothing$  Spots (Zellkerne toter Zellen) in  $10^5 \mu\text{m}^3$  grünen Gewebevolumen (Zytoplasma lebender Zellen). n=1.

### 5.1.2 Induzierte lokale Immunreaktionen in PCLS

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode PCLS soweit etabliert, dass lösliche Mediatoren wie pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine extra- und intrazellulär durch Multiplex-Technologie und ELISA quantifiziert und als Marker für lokale Inflamationsprozesse herangezogen werden können. Die Bestimmung von Zytokinen und Chemokinen in PCLS erfolgte nach der Exposition mit bekannten immunmodulatorischen Substanzen, wie LPS, Dexamethason, MALP-2, IFN- $\gamma$  und BppCysMPEG. Auch die Effekte von Allergenen, wie TMA, DNCB, Formaldehyd und Kaliumdichromat und Kontrollsubstanz SDS wurden auf Zytokine und Chemokine in PCLS ermittelt. Die Zelloberflächenmarker von antigenpräsentierenden Zellen wurden in PCLS nach Inkubation mit LPS und Dexamethason oder in Co-Kultur mit Ovalbumin-spezifischen CD4<sup>+</sup>-Zellen mittels direkter und indirekter immunhistochemischer Fluoreszenzfärbungen nachgewiesen.

#### 5.1.2.1 Bakteriellies LPS als Auslöser einer lokalen Immunreaktion in PCLS

In PCLS aus Maus-, Ratte- oder Primatenlungen (Rhesusaffe und Mantelpavian) wurde eine lokale Immunreaktion mit bakteriellen LPS ausgelöst und durch Zugabe des Kortikosteroids Dexamethason supprimiert. Die Effekte dieser immunmodulatorischer Substanzen auf die Zytokin- und Chemokin-Produktion in PCLS wurden nach 4 h bis 24 h Inkubation untersucht.

## Ergebnisse

Ein umfassendes Bild der LPS-induzierten Stimulation und durch Dexamethason vermittelten Suppression von lokalen Immunreaktionen wurde in PCLS aus Lungen naiver BALB/c Mäuse erhalten. Der Effekt von LPS, mit oder ohne Zusatz von Dexamethason auf die Zytokin- und Chemokin-Produktion in PCLS aus Lungen naiver BALB/c Mäuse wurde durch Luminex-Technologie untersucht. Durch die Bestimmung der LDH-Aktivität in PCLS-Überständen und die quantitative Analyse der Calcein/EthD-1-Färbung konnten keine toxischen Effekte von LPS (0.5-5 µg/ml) und Dexamethason (10-50 µg/ml) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Stimulation von PCLS mit LPS resultierte in einer signifikant erhöhten Freisetzung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-5, IL-12(p40), G-CSF und RANTES (Abb. 13). Nach LPS-Stimulation wurden intrazellulär signifikant erhöhte Konzentrationen von IL-1 $\alpha$ , IL-5, IL-12(p40), G-CSF und RANTES nachgewiesen (Abb. 14).

Durch Zugabe von Dexamethason wurde die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen in PCLS supprimiert, wie z.B. bei TNF $\alpha$  (354 pg/ml vs. 37 pg/ml), IL-1 $\alpha$  (308 pg/ml vs. 79 pg/ml) und IL-12 (65 pg/mL vs. 21 pg/mL) (Abb. 13 und Abb. 14). Die Produktion von G-CSF, Eotaxin und die intrazelluläre TNF $\alpha$ -Konzentration wurden durch Dexamethason nicht supprimiert (Abb. 13 und Abb. 14).

Es wurde gezeigt, dass nach LPS-Stimulation IL-5, RANTES und IL-12(p40) verstärkt sekretiert wurden und IL-1 $\alpha$  in viel höheren Konzentrationen im Zellinneren gespeichert als freigesetzt wurde (Abb. 13 und Abb. 14). Im Gegensatz dazu wurde die TNF $\alpha$  Freisetzung durch LPS um Vielfaches gesteigert während die intrazelluläre Konzentration unverändert blieb (Abb. 13 und Abb. 14).

Die LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Freisetzung wurde im Vergleich zur Gewebekontrolle um > 5000 % und die intrazelluläre IL-1 $\alpha$ -Konzentration um > 1500 % erhöht. Aus diesem Grund wurden nachfolgende Untersuchungen auf TNF $\alpha$  und IL-1 $\alpha$  fokussiert.

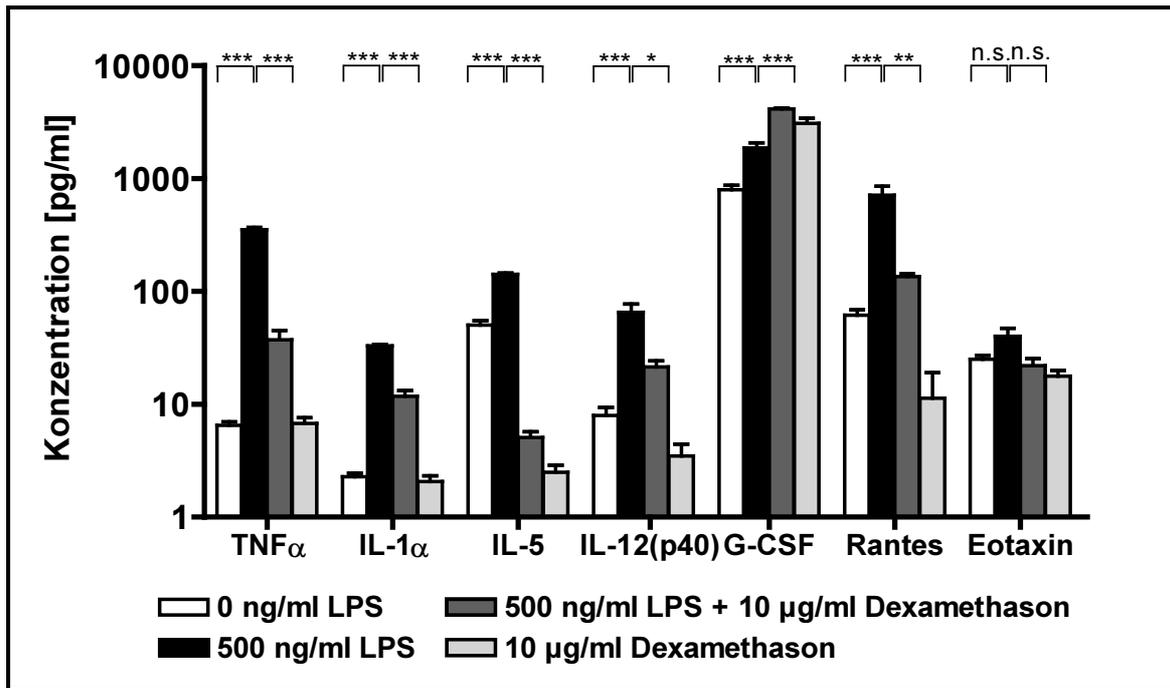


Abb. 13: Zytokin/Chemokin-Sekretionen in PCLS nach 24 h Inkubation mit 500 ng/ml LPS mit oder ohne 10 µg/ml Dexamethason, die im Zytokin-Multiplex (9-plex) bestimmt wurden

IL-13- und IL-10-Konzentrationen lagen unter der Detektionsgrenze. Mittelwert  $\pm$  SEM. n=3. Statistik durch unpaired t-Test, LPS im Vergleich zu 0 ng/ml LPS oder zu 500 ng/ml LPS + 10 µg/ml Dexamethason: n.s.= nicht signifikant, \* = p < 0.05, \*\* = p < 0.01 und \*\*\* = p < 0.001.

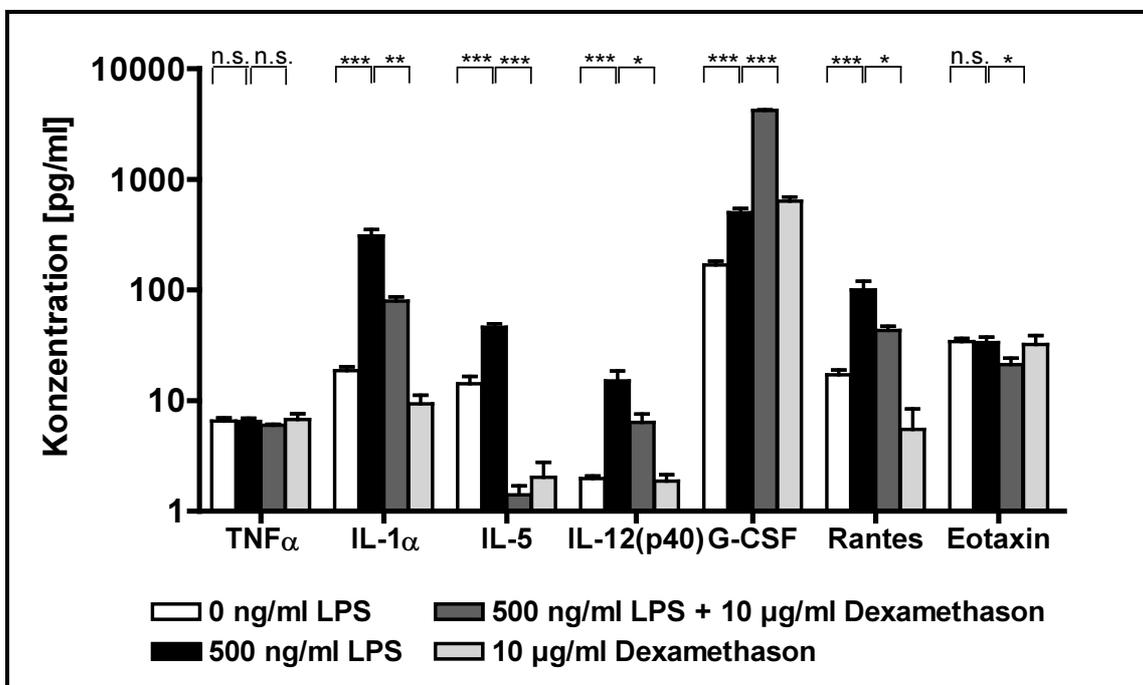
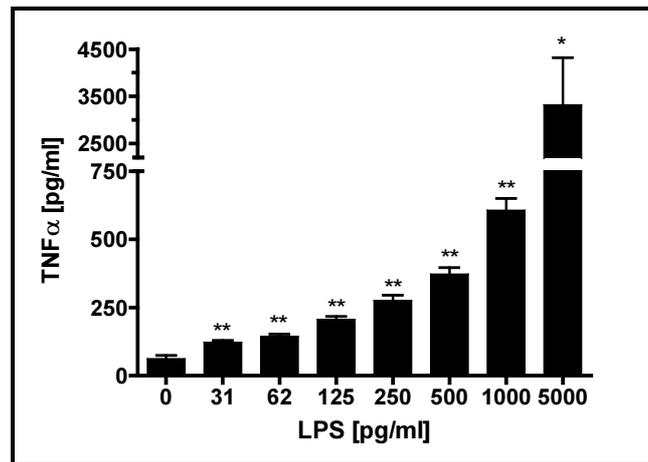


Abb. 14: Intrazelluläre Zytokin/Chemokin-Akkumulationen in PCLS nach 24 h Inkubation mit 500 ng/ml LPS mit oder ohne 10 µg/ml Dexamethason, die im Zytokin-Multiplex (9-plex) bestimmt wurden

IL-13- und IL-10-Konzentrationen lagen unter der Detektionsgrenze. Mittelwert  $\pm$  SEM. n=3. Statistik durch unpaired t-Test, LPS im Vergleich zu 0 ng/ml LPS oder zu 500 ng/ml LPS + 10 µg/ml Dexamethason: n.s.= nicht signifikant, \* = p < 0.05, \*\* = p < 0.01 und \*\*\* = p < 0.001.

## Ergebnisse

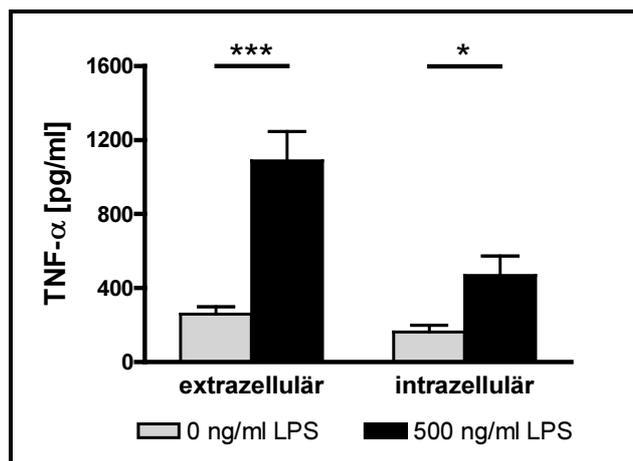
Es konnte nachgewiesen werden, dass die TNF $\alpha$ -Sekretion konzentrationsabhängig beeinflusst wird (Abb. 15). Die maximale Sekretion von TNF $\alpha$  aus Zellen in PCLS wurde durch Exposition mit 5 ng/ml (5000 pg/ml) LPS erreicht (Abb. 15). In Voruntersuchungen wurden keine signifikanten Unterschiede in der TNF $\alpha$ -Sekretion zwischen 5 ng/ml und 500 ng/ml LPS nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 15: LPS-abhängige TNF $\alpha$ -Sekretion in PCLS nach 24 h Inkubation mit stufenweise ansteigenden LPS-Konzentrationen**

Die TNF $\alpha$ -Levels wurden in den Gewebekulturüberständen durch ELISA bestimmt. Mittelwert  $\pm$  SEM. n=4. Statistik durch *unpaired* t-Test im Vergleich zu 0 pg/ml LPS: \* =  $p < 0.05$  and \*\* =  $p < 0.01$ .

BN Ratten stellen einen sehr häufig in der Grundlagenforschung verwendeten Stamm dar. Aus diesem Grund ist die Untersuchung von lokalen Irritationen und Inflammationen in PCLS in diesen Tieren besonders interessant. Nach 24 h Inkubation von PCLS aus den Lungen un behandelter BN Ratten mit und ohne 500 ng/ml LPS erfolgte die Bestimmung von extrazellulären und intrazellulären Konzentrationen von TNF $\alpha$  mittels ELISA. Dabei wurde gezeigt, dass LPS in Ratten-PCLS die TNF $\alpha$ -Produktion um ein Vielfaches im Vergleich zur Gewebekontrolle erhöht (Abb. 16). Im PCLS-Überstand und -Lysat wurde eine signifikante Erhöhung (261 pg/ml vs. 1088 pg/m bzw. 163 pg/ml vs. 469 pg/ml) der TNF $\alpha$ -Konzentration nachgewiesen (Abb. 16).

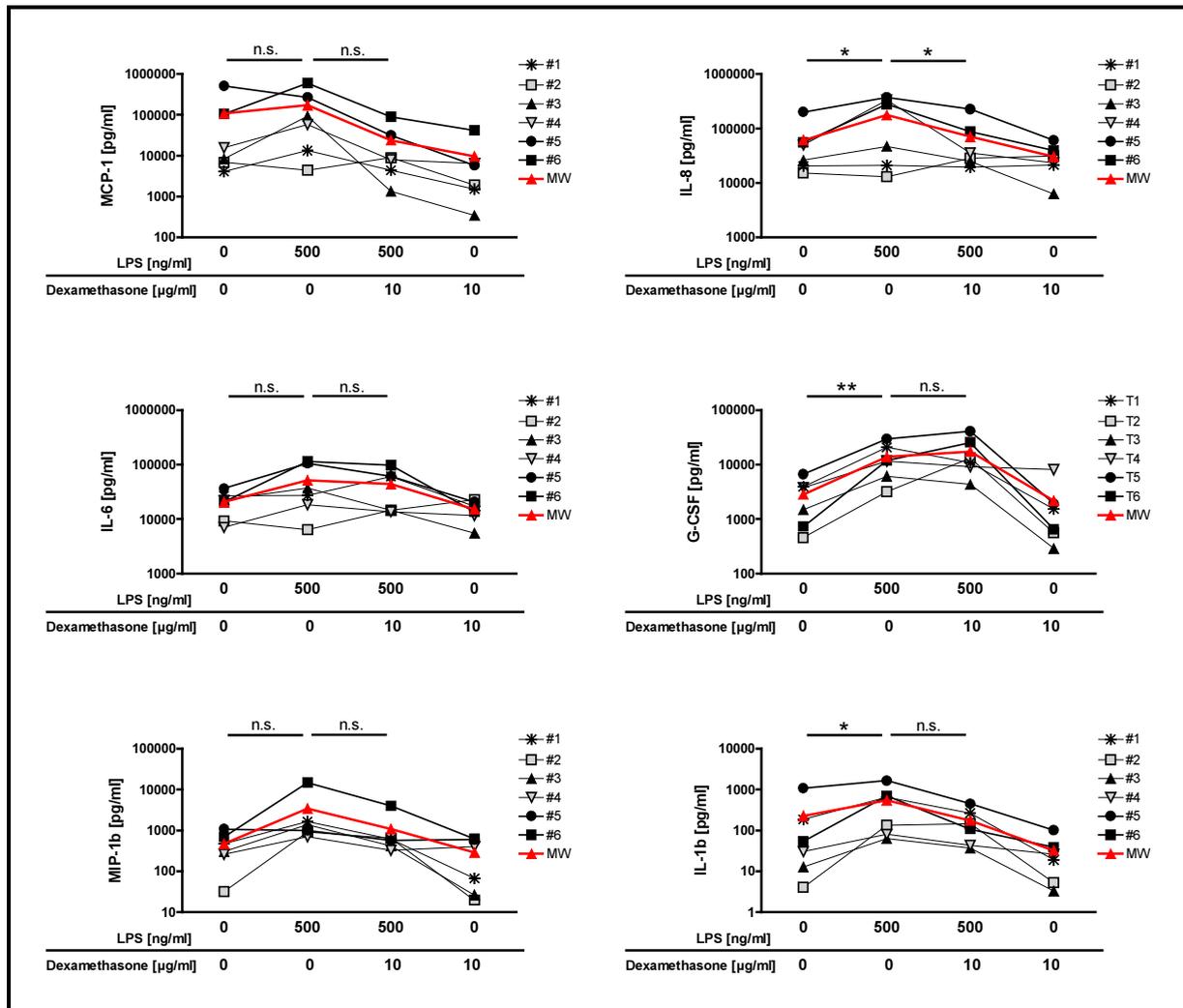


**Abb. 16: TNF $\alpha$  in Ratte-PCLS nach 24 h Exposition mit 500 ng/ml LPS**

Die TNF $\alpha$ -Levels in PCLS-Überständen und -Lysatextrakten wurden mittels ELISA bestimmt. Mittelwert  $\pm$  SEM.  $n_{(0 \text{ ng/ml LPS})}=5$ ,  $n_{(500 \text{ ng/ml LPS})}=6$ . Statistik durch *unpaired* t-Test im Vergleich zu 0 ng/ml LPS: \* =  $p < 0.05$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .

Aufgrund der hohen Übereinstimmung der genetischen Sequenz ( $> 90\%$ ) und damit verbundenen sehr guten Vergleichbarkeit zu humanen Daten sind immunologische Reaktionen von Primaten, wie Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) und Mantelpaviane (*Papio hamadryas*) von großer Bedeutung in der Forschung. Die Wirkung von bakteriellem LPS wurde in PCLS aus Pavian-Lungen untersucht. Hierzu wurden die Lungenschnitte von sechs Spendertieren (Donor #1, #2, #3, #4, #5 und #6) 24 h mit 500 ng/ml LPS und mit oder ohne 50  $\mu\text{g/ml}$  Dexamethason inkubiert. Die Messung von Zytokinen und Chemokinen erfolgte mittels Luminex-Technologie. Dazu wurden humane *Bio-Plex Cytokine Assays* für MCP-1, IL-6, IL-8, MIP-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$  und G-CSF verwendet, deren Kreuzreaktivität mit Antigenen in Primatenproben getestet war. Die inflammatorischen Reaktionen des Lungengewebes waren individuell verschieden (Abb. 17 und Abb. 18). Dies wurde besonders bereits bei der Basisausschüttung deutlich (Abb. 17 und Abb. 18). Da die produzierten Zytokinmengen zwischen den einzelnen Donoren variierten, war es nicht möglich, die individuellen Werte zu kombinieren. Aus diesem Grund erschien es sinnvoll, vielmehr den Trend der Modulation zu vergleichen. In der Tat, obwohl verschiedene Zytokinmengen produziert wurden, waren die Effekte des Mitogens unter den einzelnen Donoren konsistent (Abb. 17 und Abb. 18).

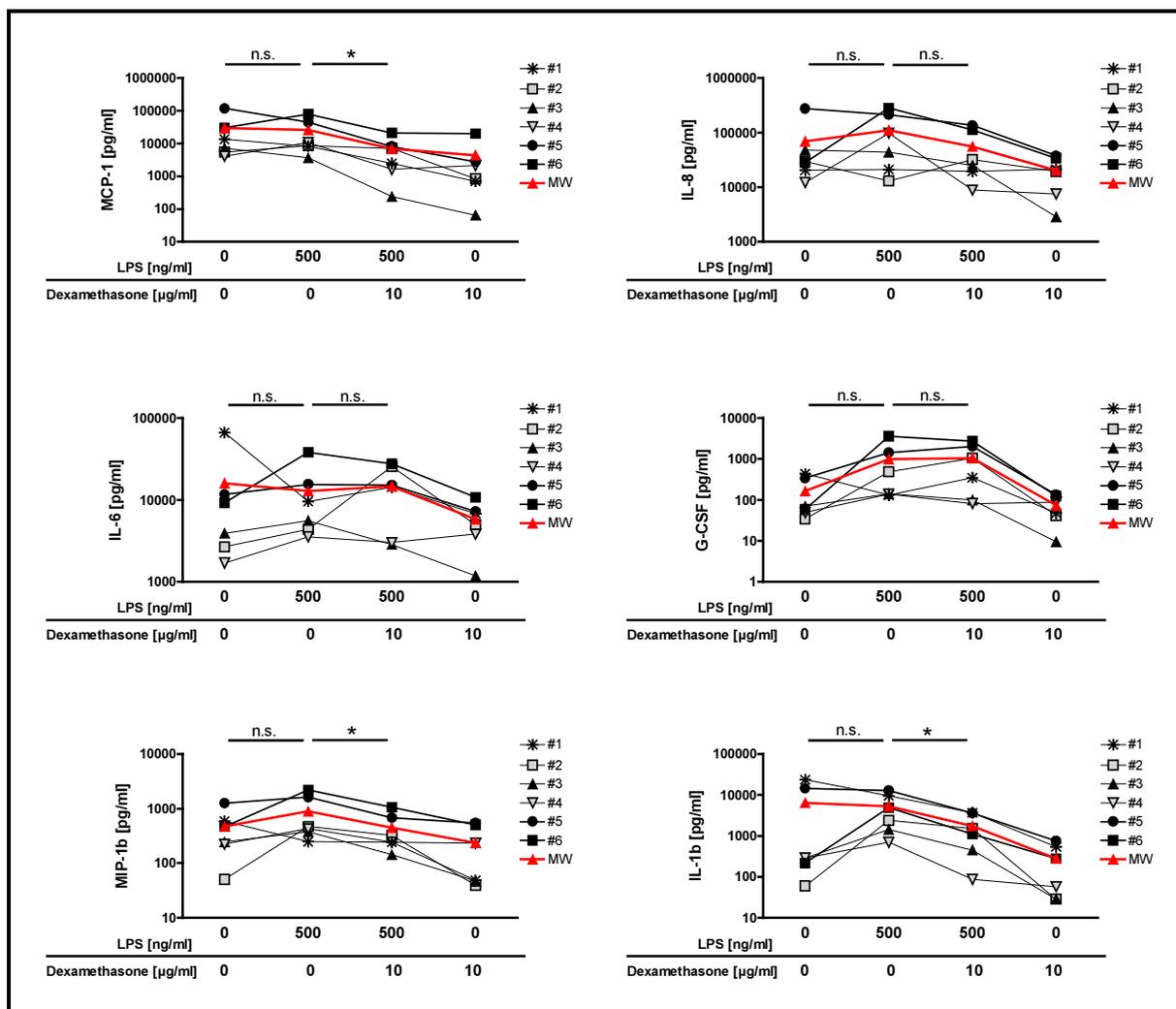
Im Durchschnitt konnte durch LPS eine Stimulation der Freisetzung von IL-8, G-CSF und IL-1 $\beta$  induziert werden. Durch Dexamethason wurde eine Suppression der Ausschüttung von IL-8 gezeigt (Abb. 17). Tendenziell wurde auch die Sekretion von MCP-1 und MIP-1 $\beta$  durch LPS erhöht und Dexamethason supprimiert (Abb. 17). Die Freisetzung von G-CSF wurde durch eine Co-Inkubation mit LPS und Dexamethason tendenziell verstärkt (Abb. 17).



**Abb. 17: Extrazelluläre Zytokin/Chemokin-Sekretion in Pavian-PCLS nach 24 h Inkubation mit 500 ng/ml LPS und mit oder ohne 10 μg/ml Dexamethason**

Die Zytokin-Leveln in Gewebekulturüberständen wurden im Zytokin-Multiplex (2 x 3-plex) bestimmt. Dargestellt sind die Zytokin/Chemokin-Freisetzungen für PCLS aus den Lungen einzelner Donoren (#1, #2, #3, #4, #5 und #6) und Mittelwert (MW). n=6. Statistik durch *paired t-Test*, LPS im Vergleich zu 0 ng/ml LPS oder zu 500 ng/ml LPS + 10 μg/ml Dexamethason: n.s.= nicht signifikant, \* = p < 0.05 und \*\* = p < 0.01.

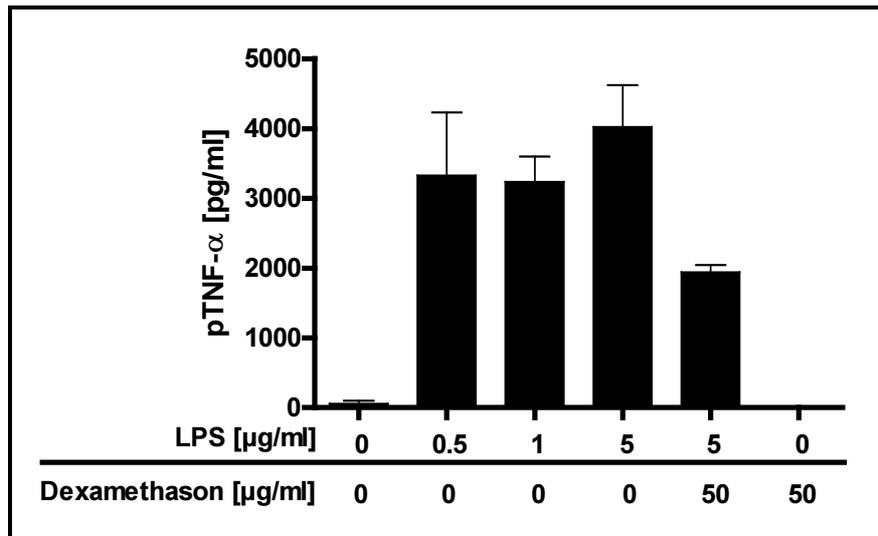
Intrazellulär wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen LPS-exponierten PCLS und Gewebekontrollen nachgewiesen. Eine tendenzielle LPS-induzierte Erhöhung und Dexamethason-vermittelte Suppression von IL-8 und MIP-1β konnte festgestellt werden (Abb. 18).



**Abb. 18: Intrazelluläre Zytokin/Chemokin-Akkumulation in Pavian-PCLS nach 24 h Inkubation mit 500 ng/ml LPS und mit oder ohne 10 µg/ml Dexamethason**

Dargestellt sind die Zytokin/Chemokin-Freisetzungen für PCLS aus den Lungen einzelner Donoren (#1, #2, #3, #4, #5 und #6) und Mittelwert (MW). n=6. Statistik durch *paired t-Test*, LPS im Vergleich zu 0 ng/ml LPS oder zu 500 ng/ml LPS + 10 µg/ml Dexamethason: n.s.= nicht signifikant und \* =  $p < 0.05$ .

Die Induktion einer Inflammation durch bakterielles LPS in PCLS von Rhesusaffen wurde durch Bestimmung der  $\text{TNF}\alpha$ -Sekretion mithilfe eines für Primatenproben etablierten ELISA-Kits (R&D Duoset) untersucht. PCLS aus der Lunge des Donors #1 wurden mit 0.5 µg/ml, 1 µg/ml und 5 µg/ml LPS mit und ohne 50 µg/ml Dexamethason exponiert. LPS induzierte eine deutlich höhere Sekretion von  $\text{TNF}\alpha$  im Vergleich zu unstimulierten PCLS (Abb. 19). Bereits die niedrigste LPS-Konzentration (0.5 µg/ml) bewirkte eine maximale Ausschüttung von  $\text{TNF}\alpha$  (Abb. 19). Höhere LPS-Konzentrationen zeigen keine wesentlichen Veränderungen im Vergleich zu 0.5 µg/ml (Abb. 19). Nach der Co-Inkubation von PCLS mit 5 µg/ml LPS und 50 µg/ml Dexamethason wurde die LPS-induzierte Ausschüttung von  $\text{TNF}\alpha$  um die Hälfte reduziert.



**Abb. 19: TNF $\alpha$  in Rhesusaffen-PCLS nach der Exposition mit LPS und Dexamethason**

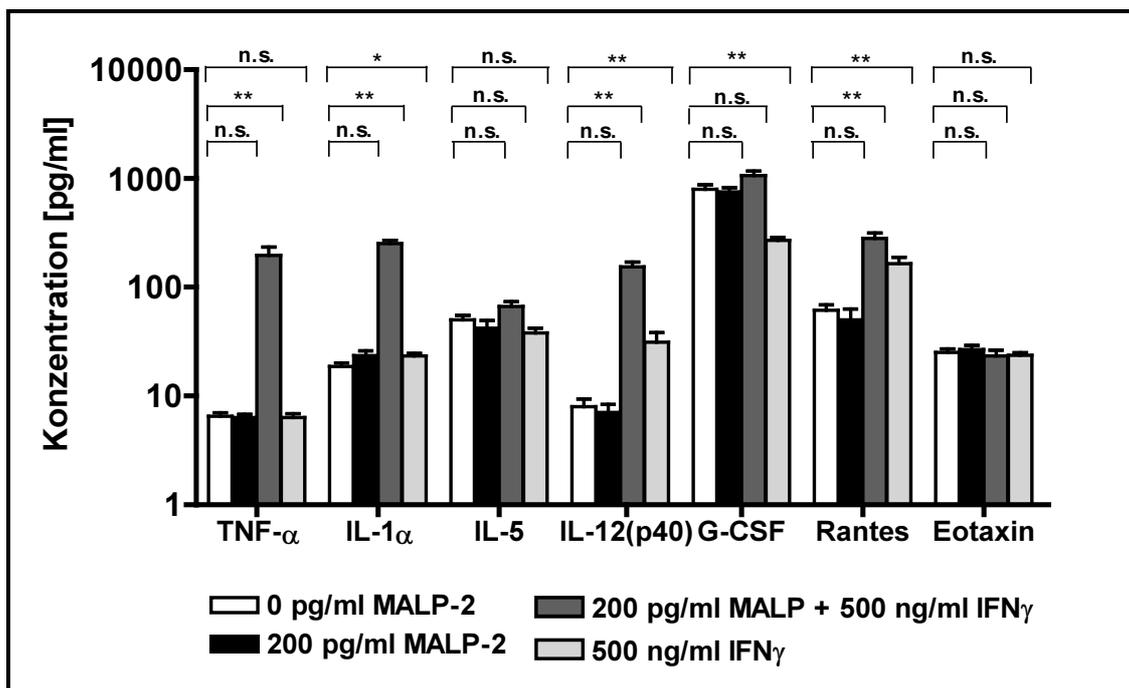
PCLS wurden 24 h mit 0.5-5  $\mu\text{g/ml}$  LPS und in Kombination mit 50  $\mu\text{g/ml}$  Dexamethason inkubiert. Die TNF $\alpha$ -Levels in Gewebekulturüberständen wurden durch ELISA bestimmt. Mittelwert  $\pm$  SEM aus einer Doppelbestimmung. n=1.

Im Lungengewebe von einzelnen Pavianen oder Rhesusaffen konnte durch Exposition mit 500 ng/ml LPS keine Inflammation induziert werden (Daten nicht gezeigt). Dabei wurden gleiche oder geringere Zytokinmengen nach Inkubation mit LPS im Vergleich zu unbehandelten PCLS ausgeschüttet und akkumuliert. Diese Lungenschnitte setzen keine ungewöhnlich hohen Mengen LDH frei. Auch die mikroskopischen Untersuchungen der Calcein/EthD-1-Färbung, die an Stichproben durchgeführt wurden, deuteten nicht auf einen Vitalitätsverlust.

### 5.1.2.2 Bakteriell Lipopeptid als Auslöser einer Immunantwort

MALP-2 ist ein Lipopeptid aus gram-negativen Bakterien *Mycoplasma fermentans*, das vor allem über eine Aktivierung von Alveolarmakrophagen eine Immunantwort im Gewebe einleiten kann. Lungenschnitte von unbehandelten BALB/c Mäusen wurden mit dem synthetisch hergestellten Lipopeptid MALP-2 und mit und ohne IFN $\gamma$  24 h inkubiert. In Voruntersuchungen wurde gezeigt, dass durch 200 pg/ml MALP-2 und 500 ng/ml IFN $\gamma$  die Zytotoxizität in PCLS nicht induziert war (Diplomarbeit Simone-Monika Switalla, 2005). Die induzierte Ausschüttung und Akkumulation von Zytokinen und Chemokinen wurde mittels Luminex-Technologie und ELISA untersucht. MALP-2 und IFN $\gamma$  induzierten die Freisetzung von TNF $\alpha$  (6 pg/mL vs. 196 pg/mL), IL-12(p40) (8 pg/mL vs. 153 pg/mL), RANTES (61 pg/mL vs. 281 pg/mL) und eine intrazelluläre Akkumulation von IL-1 $\alpha$  (19 pg/mL vs.

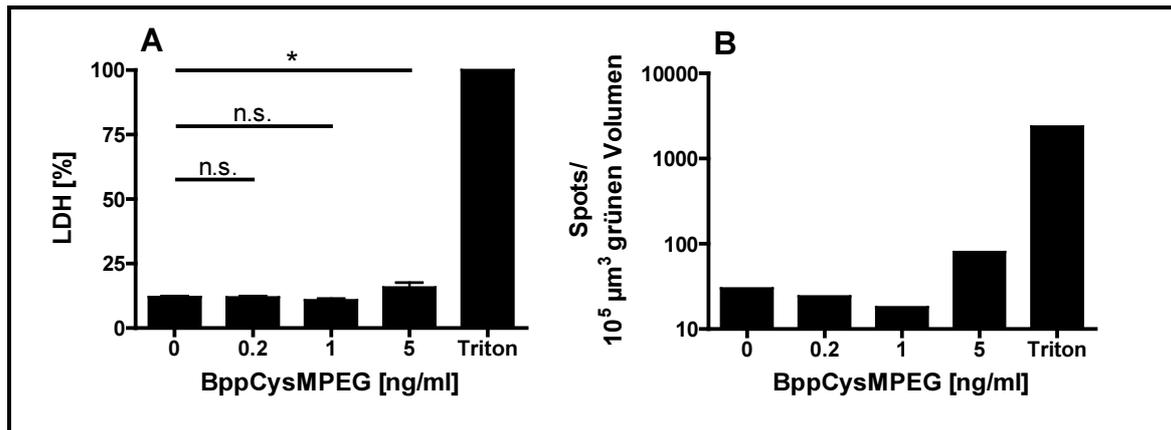
252 pg/mL) (Abb. 20). Die Sekretionen von IL-5, G-CSF und Eotaxin wurden durch MALP-2/IFN $\gamma$  nicht beeinflusst (Abb. 20). Weder MALP-2 noch IFN $\gamma$  zeigten allein eine derartige Wirkung in PCLS (Abb. 20). IFN $\gamma$ -Stimulation erhöhte zwar signifikant die Freisetzung von IL-12(p40) und RANTES, aber in deutlich geringerem Ausmaß als in Kombination mit MALP-2 (Abb. 20). Es wurden geringere Mengen IL-5 und G-CSF nach Inkubation mit IFN $\gamma$  freigesetzt (Abb. 20). Eotaxin wurde durch MALP-2 und IFN $\gamma$  nicht beeinflusst (Abb. 20).



**Abb. 20: Einfluss von MALP-2 und IFN $\gamma$  auf die Zytokin/Chemokin-Produktion in PCLS**

PCLS wurden 24 h mit 200 pg/ml MALP-2, 200 pg/ml MALP-2 und 500 ng/ml IFN $\gamma$  oder 500 ng/ml IFN $\gamma$  inkubiert. Die extrazellulären Zytokin-Level (IL-1 $\alpha$  intrazellulär) wurden im Zytokin-Multiplex (9-plex) bestimmt. IL-13- und IL-10-Konzentrationen lagen unter der Detektionsgrenze. Mittelwert  $\pm$  SEM. n=5. Statistik durch *unpaired t*-Test im Vergleich zu 0 pg/ml MALP-2: n.s. = nicht signifikant, \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ .

Die Effekte eines Derivats von MALP-2, genannt BppCysMPEG wurden in PCLS von unbehandelten BALB/c Mäusen untersucht. Die Vitalität von PCLS wurde durch Bestimmung der LDH-Aktivität im Gewebekulturüberstand und durch quantitative Analyse der Calcein/EthD-1-Färbung kontrolliert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die LDH-Freisetzung nach der Inkubation mit 5 ng/ml BppCysMPEG unter 20 % im Vergleich zur Tritonkontrolle blieb, aber im Vergleich zu Gewebekontrolle erhöht war (Abb. 21A). Durch die quantitative Analyse der Calcein/EthD-1-Färbung konnte der toxische Effekt durch 5 ng/ml BppCysMPEG bestätigt werden (Abb. 21B).



**Abb. 21: LDH-Freisetzung (A) und quantitative Analyse der Calcein/EthD-1-Färbung (B) von PCLS nach 24 h Inkubation mit BppCysMPEG**

Die Ergebnisse wurden als relative LDH-Aktivität im PCLS-Überstand im Vergleich zum gesamten LDH Gehalt (100 %) nach der Gewebelyse mit Triton X-100 kalkuliert und als Anzahl der 5- $\mu\text{m}$   $\varnothing$  Spots (Zellkerne toter Zellen) in  $10^5 \mu\text{m}^3$  grünen Gewebevolumen (Zytoplasma lebender Zellen) bestimmt. LDH: Mittelwert  $\pm$  SEM.  $n_{(\text{LDH})}=3$ . Statistik durch *unpaired* t-Test im Vergleich zu 0 ng/ml BppCysMPEG: n.s. = nicht signifikant, \* =  $p < 0,05$ . Analyse der Calcein/EthD-1-Färbung:  $n=1$ .

In den Gewebeüberständen und Lysatextrakten von PCLS wurden nach den Inkubationen mit BppCysMPEG die Konzentrationen von Zytokinen und Chemokinen mittels Luminex-Technologie gemessen. Nicht toxische BppCysMPEG-Konzentrationen von 0.2 ng/ml und 1 ng/ml induzierten eine konzentrationsabhängige intrazelluläre Akkumulation von IL-1 $\alpha$  (Abb. 22). IL-12(p40) und G-CSF Levels wurden erst nach Exposition mit 5 ng/ml BppCysMPEG signifikant erhöht (Abb. 22). Die Sekretionen von IL-5, TNF $\alpha$ , RANTES oder Eotaxin wurden durch BppCysMPEG nicht beeinflusst (Abb. 22).

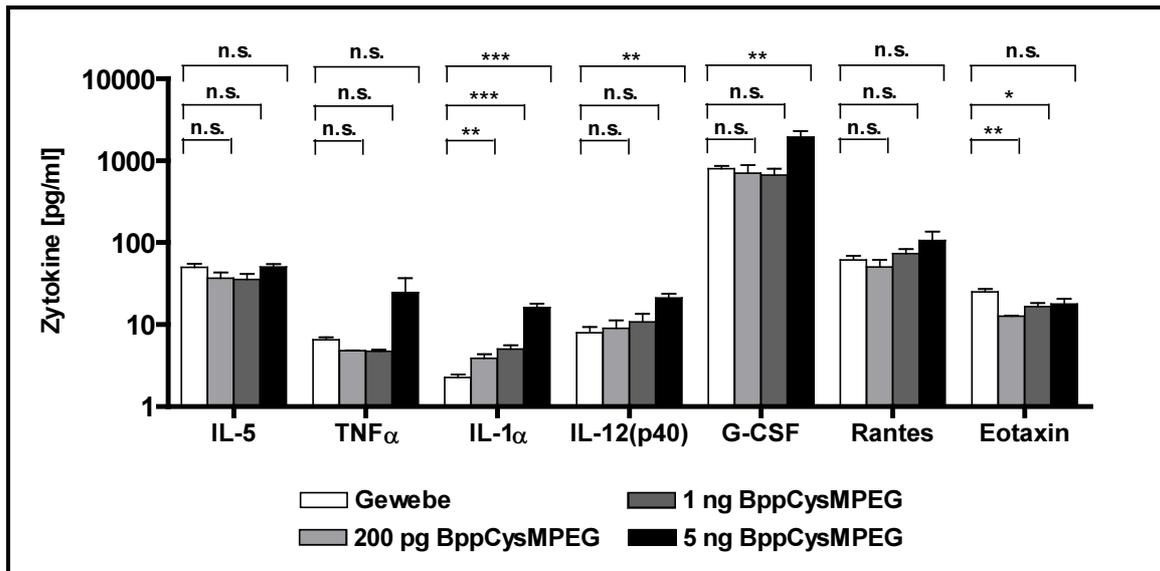


Abb. 22: Aktivierung von Lungenschnitten durch BppCysMPEG

PCLS wurden 24 h mit 0.2 ng/ml, 1 ng/ml und 5 ng/ml BppCysMPEG inkubiert. Die Zytokin-Levels wurden im Gewebekulturüberstand und Lysatextrakten (IL-1 $\alpha$ ) durch einen Zytokin-Multiplex (9-plex) bestimmt. IL-13- und IL-10-Konzentrationen lagen unter der Detektionsgrenze. Mittelwert  $\pm$  SEM. n=5. Statistik durch *unpaired* t-Test im Vergleich zu Gewebekontrolle: n.s. = nicht signifikant, \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .

Des Weiteren wurden in den gleichen Proben die Levels von TNF $\alpha$  und IL-1 $\alpha$  mittels ELISA bestimmt. Im Gegensatz zu den Multiplex-Daten konnte durch ELISA gezeigt werden, dass BppCysMPEG eine konzentrationsabhängige Freisetzung von TNF $\alpha$  in PCLS initiiert, während die intrazelluläre Konzentration nicht beeinflusst wird (Abb. 23A und B).

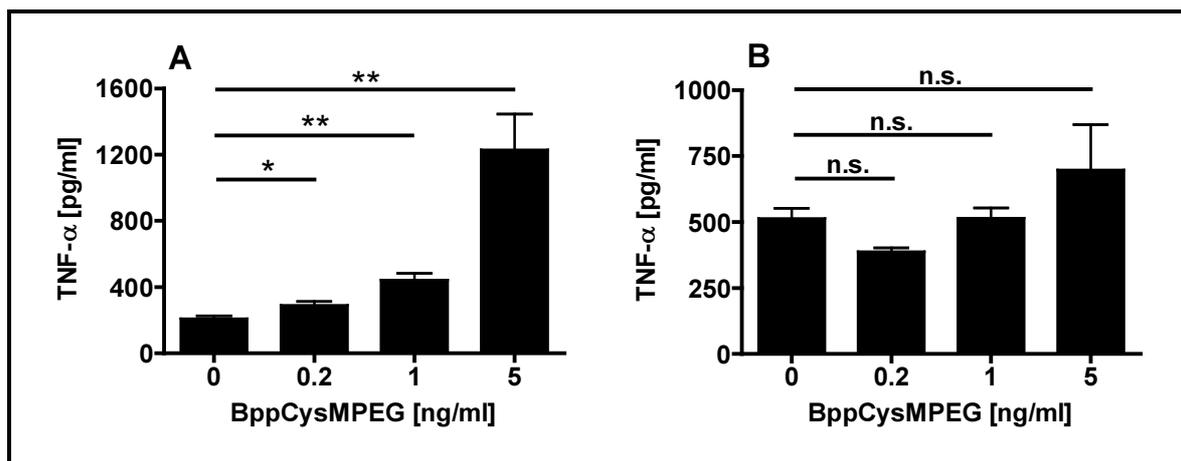
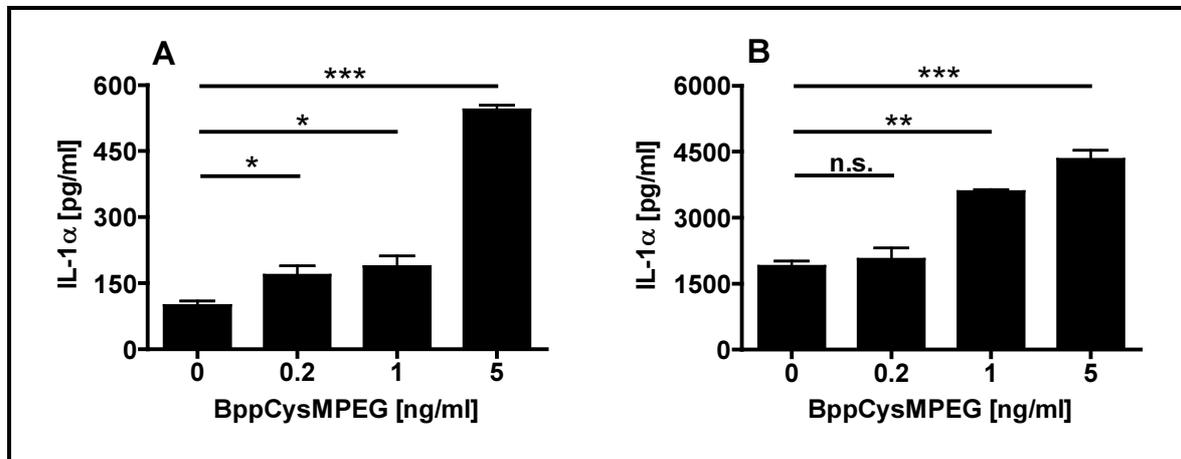


Abb. 23: Effekte von BppCysMPEG auf TNF $\alpha$  in PCLS

Lungenschnitte wurden 24 h mit 0.2 ng/ml, 1 ng/ml und 5 ng/ml BppCysMPEG inkubiert. Die extrazellulären (A) und die intrazellulären (B) TNF $\alpha$ -Levels wurden durch ELISA bestimmt. Mittelwert  $\pm$  SEM. n=3. Statistik durch *unpaired* t-Test im Vergleich zu 0 ng/ml BppCysMPEG: n.s. = nicht signifikant, \* =  $p < 0.05$  und \*\* =  $p < 0.01$ .

## Ergebnisse

Ein ausgeprägter konzentrationsabhängiger Anstieg von extrazellulären und intrazellulären IL-1 $\alpha$  Levels wurde mittels ELISA in BppCysMPEG-exponierten PCLS nachgewiesen (Abb. 24).



**Abb. 24: Effekte von BppCysMPEG auf IL-1 $\alpha$  in PCLS**

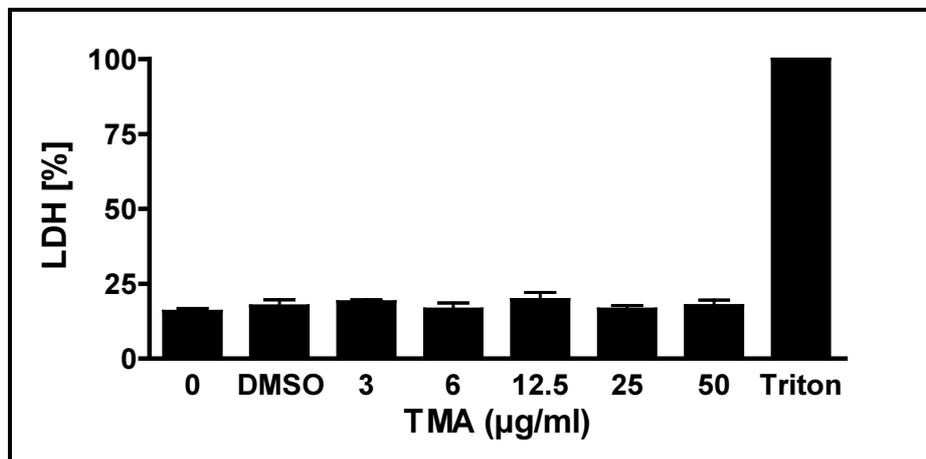
Lungenschnitte wurden 24 h mit 0.2 ng/ml, 1 ng/ml und 5 ng/ml BppCysMPEG inkubiert. Die extrazellulären (A) und die intrazellulären (B) IL-1 $\alpha$ -Levels wurden durch ELISA bestimmt. Mittelwert  $\pm$  SEM. n=3. Statistik durch *unpaired* t-Test im Vergleich zu 0 ng/ml BppCysMPEG: n.s. = nicht signifikant, \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$  und \*\*\* =  $p < 0.001$ .

### 5.1.2.3 Chemikalien-induzierte Irritation und Inflammation in lebenden Lungenschnitten

Die irritativen und inflammatorischen Effekte von niedermolekularen Chemikalien, die sowohl respiratorischen Allergenen (z.B. TMA) als auch Kontaktallergenen (z.B. DNCB) zuzuordnen sind, wurden in PCLS aus den Lungen von unbehandelten BALB/c Mäusen und BN-Ratten getestet. Durch die Bestimmung freigesetzter LDH-Aktivität und durch quantitative Analyse der Calcein/EthD-1-Färbung wurden für jede verwendete Substanz subtoxische und toxische Konzentrationen ermittelt. Nach Exposition von PCLS mit ansteigenden Konzentrationen der Chemikalien wurde die lokale respiratorische Immunantwort durch Messung pro-inflammatorischer Mediatoren (z.B. TNF $\alpha$ ) intra- und extrazellulär mittels ELISA oder Multiplex (Luminex-Technologie) charakterisiert. Als Negativkontrolle wurde das anionische Detergenz SDS, eine Chemikalie, die irritativ wirkt, verwendet.

### 5.1.2.3.1 Immunmodulation in PCLS durch TMA

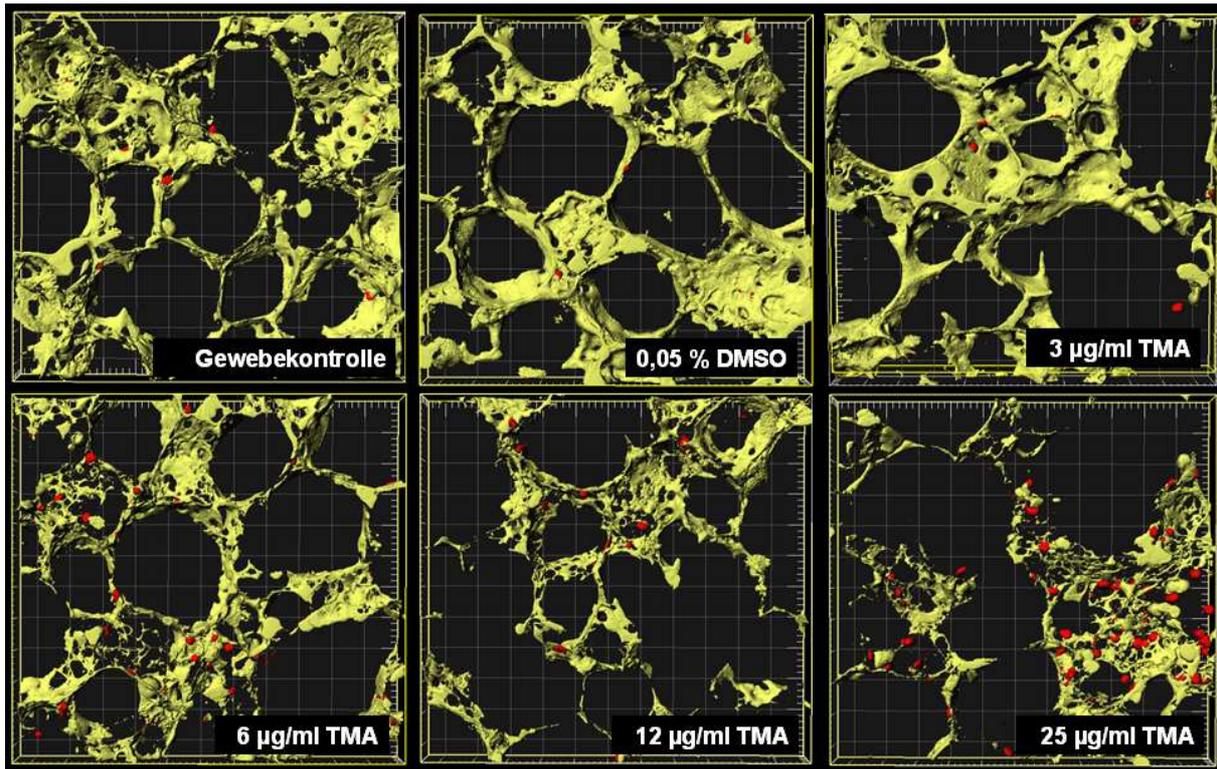
Die Effekte des respiratorischen Allergens TMA auf Vitalität und Zytokin/Chemokin-Produktion von Lungengewebe wurden in PCLS aus Lungen un behandelter BALB/c Mäuse charakterisiert. Dazu wurden PCLS präpariert und 16 h mit ansteigenden Konzentrationen TMA in DMEM, 0.05 % DMSO inkubiert. Die Bestimmung der zytotoxischen Wirkung von TMA erfolgte zuerst durch die Messung freigesetzter LDH-Aktivität im Gewebekulturüberstand. Dabei konnte keine Zytotoxizität von TMA auf das Lungengewebe nachgewiesen werden (Abb. 25). Auch Expositionen mit mehr als 50 µg/ml TMA induzierten keinen Anstieg der LDH-Freisetzung. Eine Dosis-Wirkungsbeziehung konnte zunächst nicht erstellt werden.



**Abb. 25: LDH-Freisetzung von PCLS nach 24 h Exposition mit TMA in DMEM mit 0.05 % DMSO**

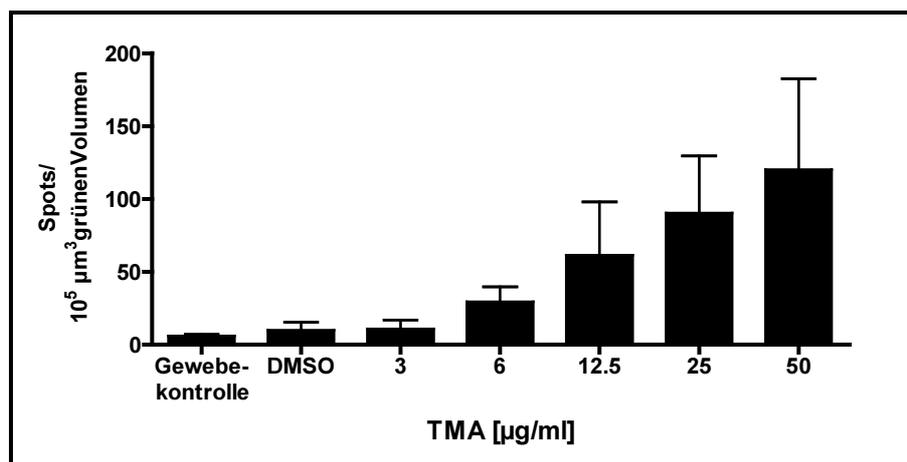
Die Vitalität wurde als relative LDH-Aktivität im PCLS-Überstand im Vergleich zum gesamten LDH Gehalt (100 %) nach Gewebelyse mit Triton X-100 bestimmt. Mittelwert  $\pm$  SEM.  $n=5$ . Statistik durch *unpaired t*-Test: im Vergleich zur DMSO-Kontrolle wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Im zweiten Schritt wurde die Zytotoxizität nach 16 h Inkubation mit 3-50 µg/ml TMA durch quantitative bildgebende Analyse der Calcein/EthD-1-Färbung überprüft. Die quantitative Analyse der Calcein/EthD-1 Färbung zeigte, dass die Vitalität von PCLS durch 0.05 % DMSO (in DMEM) nicht beeinträchtigt wurde (Abb. 26 und Abb. 28). TMA-Konzentrationen bis 3 µg/ml zeigten keinen Anstieg der Anzahl EthD-1 gefärbter Zellkerne (abgestorbene Zellen). Höhere Konzentrationen ( $> 3$  µg/ml TMA) führten dagegen zu einem starken Anstieg toter Zellen und zu einem deutlichen Verlust der feinen Alveolarstruktur des Lungengewebes und wurden als toxisch wirkend eingestuft (Abb. 26 und Abb. 28, toxische Grenze durch rote senkrechte Gerade markiert).



**Abb. 26:** 3D-Ansicht der Calcein/EthD-1-Färbung nach 16 h Exposition von PCLS mit TMA in DMEM mit 0.05 % DMSO

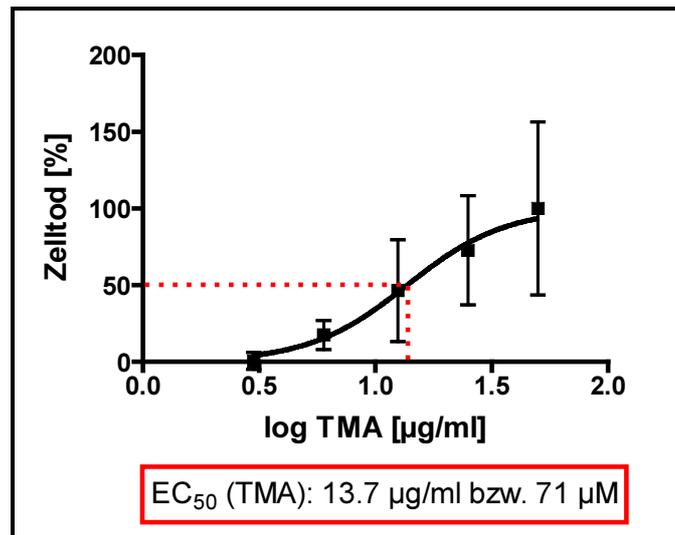
Die Lungenschnitte wurden mit 4 µM Calcein AM und 4 µM EthD-1 gefärbt. Die Z-Stapel wurden in zwei Fluoreszenzkanälen durch konfokale Laserscanningmikroskopie aufgenommen (40x Wasserimmersionsobjektiv, Anregungswellenlängen 488 nm und 543 nm, Emissionsbreitpassfilter 505-550 nm und -langpassfilter 560 nm, Z-Stapeldicke 20 µm, Gitternetzweiten = 20 µm) und mit IMARIS 4.5.2 analysiert. Die Zellkerne (Ø 5 µm) von toten Zellen sind rot und das Zytoplasma lebender Zellen ist grün markiert.



**Abb. 27:** Quantitative Analyse der Calcein/EthD-1-Färbung von PCLS nach 16 h Inkubation mit 3-50 µg/ml TMA in DMEM (mit 0.05 % DMSO)

Die Vitalität wurde als Anzahl der 5-µm Ø Spots (Zellkerne toter Zellen) in 10<sup>5</sup> µm<sup>3</sup> grünes Gewebevolumen (Zytoplasma lebender Zellen) bestimmt. Mittelwert ± SEM. n=3. Statistik durch *unpaired* t-Test: im Vergleich zur DMSO-Kontrolle wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

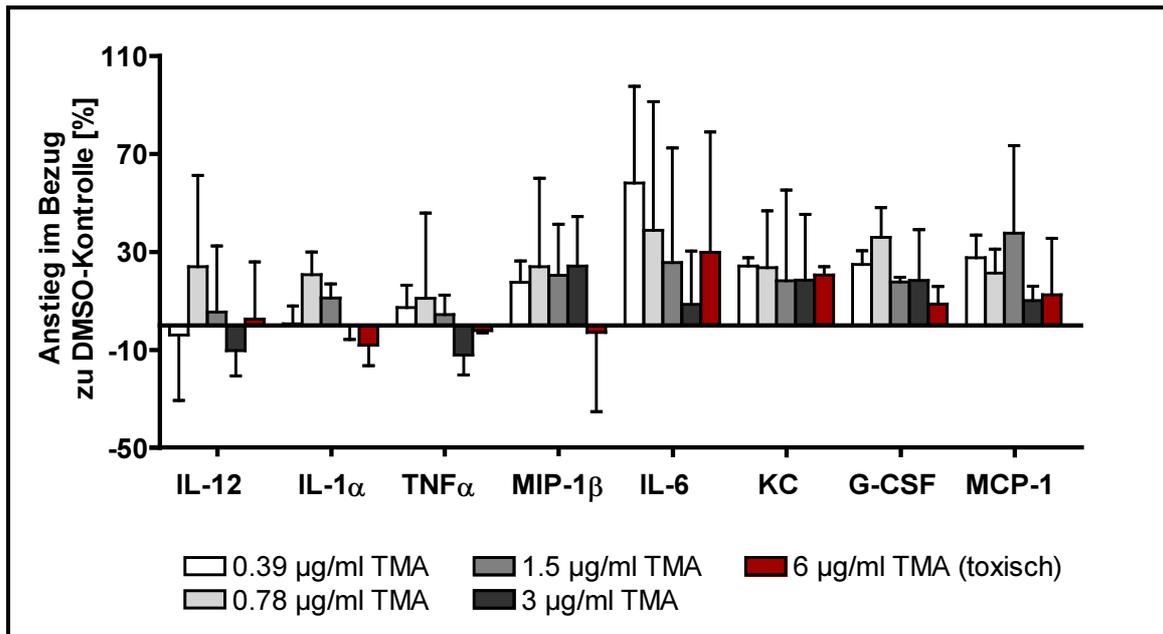
Die Untersuchung der sigmoidalen Dosiswirkungsbeziehung (TMA-Konzentrationen im Verhältnis zu der Anzahl EthD-1-markierter Zellkerne im  $10^5 \mu\text{m}^3$  Calcein-gefärbten Volumen) zeigte, dass durch  $13.7 \mu\text{g/ml}$  TMA die Vitalität von PCLS um 50 % verringert wird (Abb. 28). Somit wurde durch  $3 \mu\text{g/ml}$  und  $6 \mu\text{g/ml}$  TMA eine Zytotoxizität von 11 % bzw. 22 % induziert (Abb. 28).



**Abb. 28: Berechnung von EC<sub>50</sub> nach 16 h Inkubation mit TMA in DMEM (mit 0.05 % DMSO)**

Die Vitalität wurde als Anzahl der  $5\text{-}\mu\text{m}$  Ø Spots (Zellkerne toter Zellen) in  $10^5 \mu\text{m}^3$  grünen Gewebewolumen (Zytoplasma lebender Zellen) bestimmt. EC<sub>50</sub> (TMA) d.h. TMA-Konzentration, die auf 50 % der Zellen in PCLS zytotoxisch wirkte, wurde durch Erstellen einer Dosiswirkungskurve ermittelt. Mittelwert  $\pm$  SEM.  $n=3$ . Statistik durch *unpaired* t-Test: im Vergleich zur DMSO-Kontrolle wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

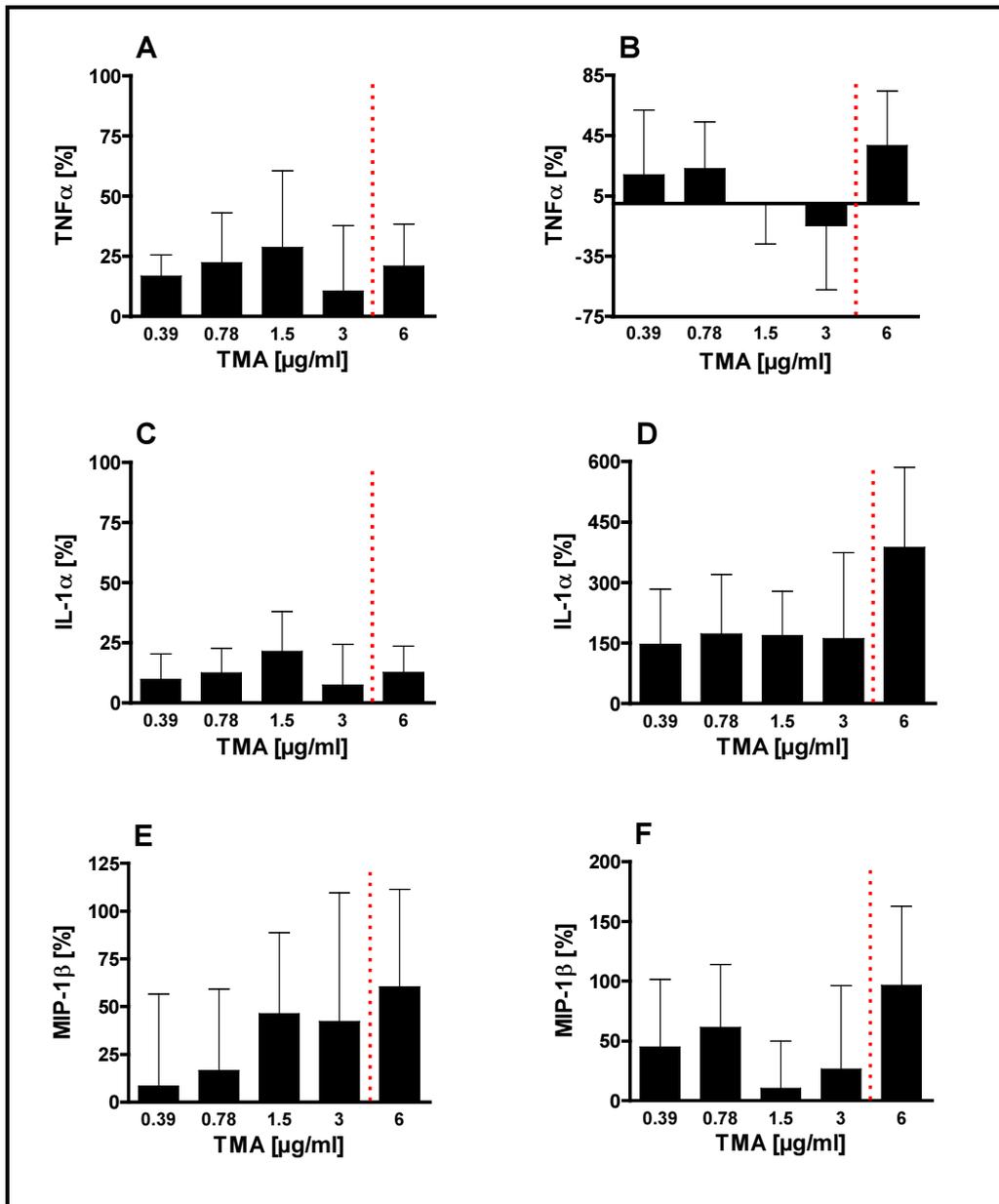
TMA-induzierte Modulationen im Zytokin und Chemokin-Profil wurden mittels ELISA und Luminex-Technologie quantifiziert. Hierzu wurden murine PCLS präpariert und 16 h mit  $0.39 \mu\text{g/ml}$ ,  $0.78 \mu\text{g/ml}$ ,  $1.5 \mu\text{g/ml}$ ,  $3 \mu\text{g/ml}$  und  $6 \mu\text{g/ml}$  TMA exponiert. Die durchflusszytometrische Proteinanalyse im Multiplex-Zytokin Assay ergab keine signifikanten Differenzen zwischen der DMSO-Kontrolle und TMA (Abb. 29). Dennoch waren Tendenzen erkennbar. Die Mittelwerte ( $n=3$ ) der prozentualen Anstiege betragen nach Exposition von PCLS mit  $0.78 \mu\text{g/ml}$  TMA im Vergleich zur DMSO-Kontrolle 24 % für IL-12, 21 % für IL-1 $\alpha$ , 11 % für TNF $\alpha$  und 24 % für MIP-1 $\beta$  (Abb. 29). Die Produktion dieser Proteine wurde durch Exposition mit niedrigeren oder höheren TMA-Konzentrationen in PCLS nicht gesteigert (Abb. 29). IL-6, KC (IL-8), G-CSF und MCP-1 wurden nach den Inkubationen mit TMA ebenfalls verstärkt gebildet (Abb. 29).



**Abb. 29: Zytokine und Chemokine in PCLS nach 16 h Exposition mit TMA in DMEM, 0.05 % DMSO**

Die Proteine wurden im Gewebekulturüberstand und Lysatextrakten (IL-1 $\alpha$ ) durch Zytokin-Multiplex bestimmt. Dargestellt ist der prozentuelle Anstieg der Proteine im Bezug zur DMSO-Kontrolle. Inkubation mit toxischer TMA-Konzentration (6  $\mu$ g/ml) wurde durch rote Balken dargestellt. Mittelwert. n=3. Statistik durch *unpaired* t-Test: im Vergleich zur DMSO-Kontrolle wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Im ELISA wurde die Sekretion von TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  nach Exposition mit 0.39-1.5  $\mu$ g/ml TMA quantifiziert (Abb. 30). Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle betragen die höchsten Differenzen im nicht toxischen bzw. toxischen Konzentrationsbereich für TNF $\alpha$  29 % bzw. 21 %, für IL-1 $\alpha$  21 % bzw. 13 % und für MIP-1 $\beta$  46 % bzw. 60 % (Abb. 30 A, C und E). Intrazellulär wurden im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nur nach Inkubation mit 6  $\mu$ g/ml TMA erhöhte Proteinlevels für TNF $\alpha$  (13 %), IL-1 $\alpha$  (20 %) und MIP-1 $\beta$  (23 %) nachgewiesen (Abb. 30 B, D und F).



**Abb. 30: TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$ -Produktion nach 16 h Inkubation von PCLS mit 0.39-6  $\mu$ g/ml TMA in DMEM (mit 0.05 % DMSO)**

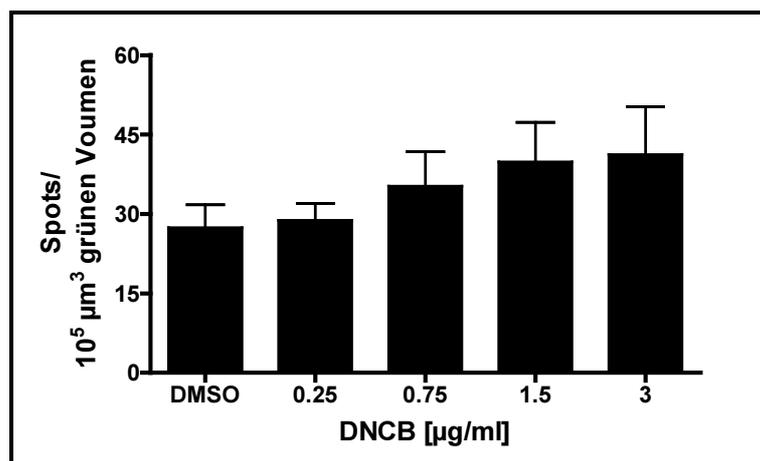
Die extrazellulären und die intrazellulären TNF $\alpha$ - (A und B), IL-1 $\alpha$ - (C und D) und MIP-1 $\beta$ - (E und F) Levels wurden mittels ELISA bestimmt. Die rote senkrechte Linie markiert die toxische Grenze. Mittelwert  $\pm$  SEM.  $n_{(\text{DMSO})}=7$ ,  $n_{(0.39-3 \mu\text{g/ml TMA})}=7$  und  $n_{(6 \mu\text{g/ml TMA})}=5$ . Statistik durch *unpaired t*-Test: Abb. D:  $p < 0.05$  für 6  $\mu$ g/ml TMA, sonst wurden im Vergleich zur DMSO-Kontrolle keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

### 5.1.2.3.2 Zytotoxizität und Zytokin/Chemokin-Induktion durch DNCB

Zur Bestimmung eines zytotoxisch wirkenden Konzentrationsbereiches wurden Maus-PCLS 16 h und 24 h mit ansteigenden DNCB-Konzentrationen (0.25-3  $\mu$ g/ml) inkubiert. Es folgte die Untersuchung der Vitalität durch Bestimmung der LDH-Freisetzung. LDH zeigte keine zytotoxischen Effekte von DNCB, eine Dosis-Wirkungsbeziehung konnte auch hier zunächst nicht erstellt werden (Daten nicht gezeigt).

## Ergebnisse

Die zytotoxische Wirkung von DNCB auf murines Lungengewebe wurde des Weiteren durch quantitative Analyse der Calcein/EthD-1-Färbung überprüft. Dabei zeigte sich eine zytotoxische Wirkung von DNCB in PCLS. Die Anzahl EthD-1-markierter Zellkerne im  $10^5 \mu\text{m}^3$  Calcein-markierten Volumen stieg im Vergleich zu DMSO-Kontrolle bei Inkubation mit 0.25  $\mu\text{g/ml}$  um 6 %, 0.75  $\mu\text{g/ml}$  um 30 %, 1.5  $\mu\text{g/ml}$  um 48 % und 3  $\mu\text{g/ml}$  um 53 % an (Abb. 31). Im Vergleich zur Tritonkontrolle ( $2385 \pm 121$  Spots im  $10^5 \mu\text{m}^3$  Calcein-markierten Volumen) waren die Änderungen der PCLS-Vitalität nach DNCB-Inkubation relativ gering. Durch mikroskopische Betrachtung und quantitative Analyse der Calcein/EthD-1-Färbung (Abb. 31) war es jedoch möglich, erste toxische Effekte von 1.5  $\mu\text{g/ml}$  DNCB im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu erfassen. Ab dieser Konzentration wurde das Verhältnis EthD-1-markierter Zellkerne zum Calcein-gefärbten Zellvolumen um ca. 50 % im Vergleich zur DMSO-Kontrolle erhöht.



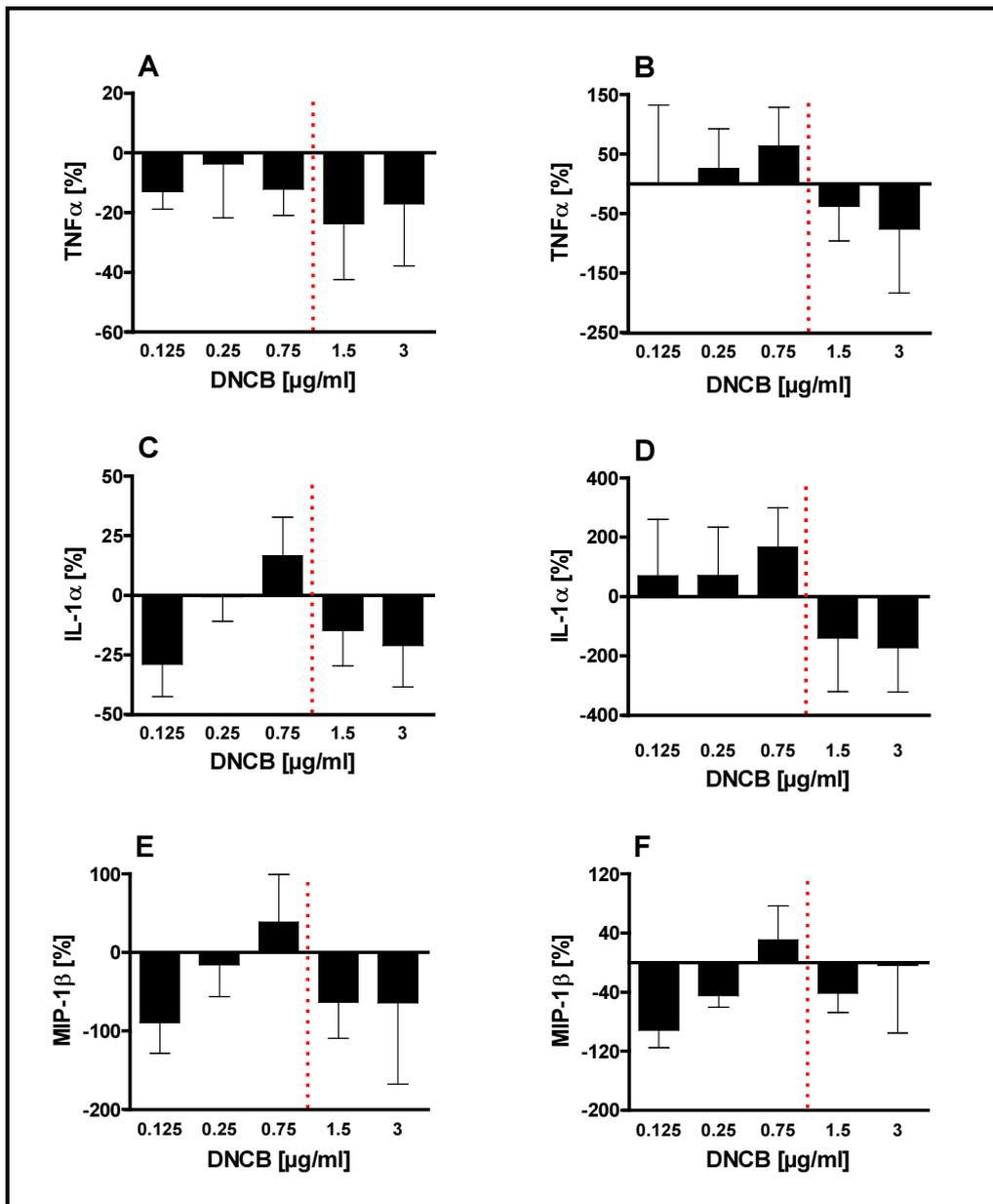
**Abb. 31: Quantitative Analyse der Calcein/EthD-1-Färbung von Maus-PCLS nach 16 h Inkubation mit 0.25-3  $\mu\text{g/ml}$  DNCB in DMEM (mit 0.01 % DMSO)**

Die Vitalität wurde als Anzahl der 5- $\mu\text{m}$   $\varnothing$  Spots (Zellkerne toter Zellen) in  $10^5 \mu\text{m}^3$  grünen Gewebewolumen (Zytoplasma lebender Zellen) bestimmt. Mittelwert  $\pm$  SEM.  $n=5$ . Statistik durch *unpaired* t-Test: im Vergleich zur DMSO-Kontrolle wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Zytokine und Chemokine wurden intra- und extrazellulär nach Inkubationen von PCLS mit DNCB mittels Luminex-Technologie gemessen. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede in IL-12, IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-6, KC, G-CSF und MCP-1 zwischen der DMSO-Kontrolle und DNCB-Expositionen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  wurden im ELISA bestimmt. Die Zytokin-Mengen von TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  wurden durch DNCB weder konzentrationsabhängig noch signifikant in

einer einzelnen Konzentration verändert (Abb. 32). Die intrazellulären Levels von  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\alpha$  waren nach Inkubation der Lungenschnitte mit  $0.125 \mu\text{g/ml}$  DNCB geringfügig erhöht (18 % bzw. 10 %) (Abb. 32).  $\text{MIP-1}\beta$  in PCLS wurde durch DNCB-Exposition nicht beeinflusst (Abb. 32). Nach 4 h und 24 h Inkubation mit DNCB wurde die Produktion dieser Entzündungsmarker in Maus-PCLS ebenfalls nicht beeinflusst.



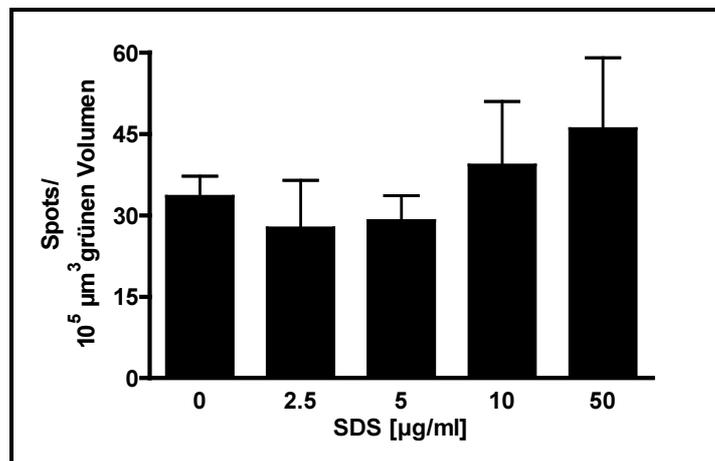
**Abb. 32:  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\alpha$  und  $\text{MIP-1}\beta$ -Produktion nach Exposition von Maus-PCLS mit DNCB in DMEM (mit 0.01 % DMSO)**

PCLS wurden 16 h mit  $0.125\text{-}3 \mu\text{g/ml}$  DNCB inkubiert. Die extrazellulären und die intrazellulären  $\text{TNF}\alpha$ - (A und B),  $\text{IL-1}\alpha$ - (C und D) und  $\text{MIP-1}\beta$ - (E und F) Levels wurden durch ELISA bestimmt. Die rote senkrechte Linie markiert die toxische Grenze. Mittelwert  $\pm$  SEM.  $n=5$ . Statistik durch *unpaired* t-Test: im Vergleich zur DMSO-Kontrolle wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

### 5.1.2.3.3 Irritationen in PCLS durch SDS

PCLS aus Mauslungen wurden mit ansteigenden SDS-Konzentrationen (2.5-100 µg/ml) in DMEM inkubiert. Die Ermittlung der zytotoxischen Grenze von SDS erfolgte durch quantitative Analyse der Calcein/EthD-1-Färbung. Die Effekte von SDS auf die Produktion von Entzündungsmediatoren in PCLS wurden mittels ELISA untersucht.

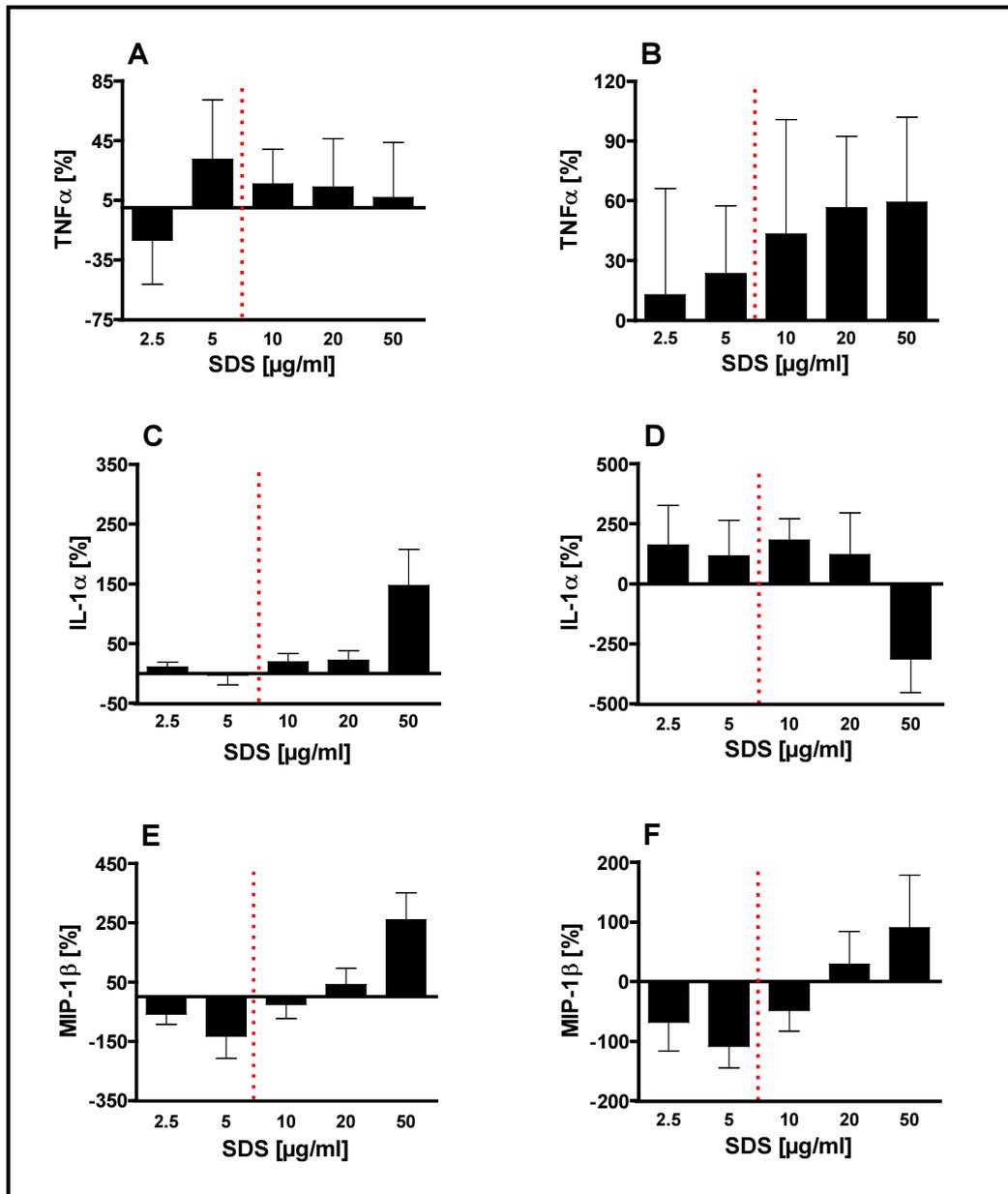
Durch quantitative Analyse der Calcein/EthD-1-Färbung konnte nachgewiesen werden, dass SDS in Konzentrationen von 2.5 µg/ml und 5 µg/ml die Zellvitalität in PCLS nicht beeinträchtigte (Abb. 33). SDS induzierte in Konzentrationen > 5 µg/ml einen Anstieg der Anzahl toter Zellen in PCLS (Abb. 33), was auch mit dem berechneten EC<sub>50</sub> (8.9 µg/ml) SDS übereinstimmt (Tab. 9).



**Abb. 33: Quantitative Analyse der Calcein/EthD-1-Färbung von PCLS nach 16 h Inkubation mit 2.5-100 µg/ml SDS in DMEM**

Die Vitalität wurde als Anzahl der 5-µm Ø Spots (Zellkerne toter Zellen) in 10<sup>5</sup> µm<sup>3</sup> grünem Gewebevolumen (Zytoplasma lebender Zellen) bestimmt. Mittelwert ± SEM. n<sub>(0 µg/ml SDS)</sub>=4, n<sub>(2.5 µg/ml SDS)</sub>=4, n<sub>(5 µg/ml SDS)</sub>=3, n<sub>(10 µg/ml SDS)</sub>=4, n<sub>(50 µg/ml SDS)</sub>=2. Statistik durch *unpaired* t-Test: im Vergleich zur Gewebekontrolle wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Extrazelluläre IL-1α Konzentrationen zeigten eine um 80 % verstärkte Freisetzung nach Exposition mit 50 µg/ml SDS (Abb. 34). Ein erhöhtes MIP-1β-Level wurde extrazellulär (29 %) und intrazellulär (12 %) nach Inkubation mit 50 µg/ml SDS nachgewiesen (Abb. 34). Im Gegensatz dazu wurde die TNFα-Produktion in PCLS nur geringfügig durch SDS beeinflusst (Abb. 34).



**Abb. 34: TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$ -Produktion nach Exposition von PCLS mit SDS in DMEM**

PCLS wurden 16 h mit 2.5-100  $\mu\text{g/ml}$  SDS inkubiert. Die extrazellulären und die intrazellulären TNF $\alpha$ - (A und B), IL-1 $\alpha$ - (C und D) und MIP-1 $\beta$ - (E und F) Levels wurden durch ELISA bestimmt. Die rote senkrechte Linie markiert die toxische Grenze. Mittelwert  $\pm$  SEM.  $n=5$ . Statistik durch *unpaired* t-Test: im Vergleich zur Gewebekontrolle wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

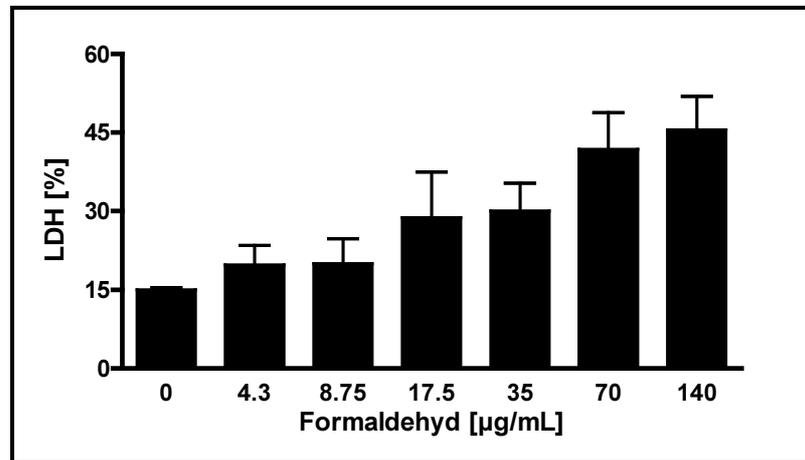
#### 5.1.2.3.4 Zytotoxische und inflammatorische Wirkung von Formaldehyd in PCLS

Die Formaldehyd-induzierte Irritation und TNF $\alpha$  des Lungengewebes wurden in PCLS untersucht. Dazu wurden PCLS präpariert und 24 h mit Formaldehyd exponiert.

Es konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg der LDH-Aktivität nach Inkubationen mit Formaldehyd (4.3-140  $\mu\text{g/ml}$ ) nachgewiesen werden (Abb. 35). Dabei blieb die LDH-Freisetzung bei 4.3  $\mu\text{g/ml}$  und 8.75  $\mu\text{g/ml}$  Formaldehyd  $\leq 20\%$  im Vergleich zur

## Ergebnisse

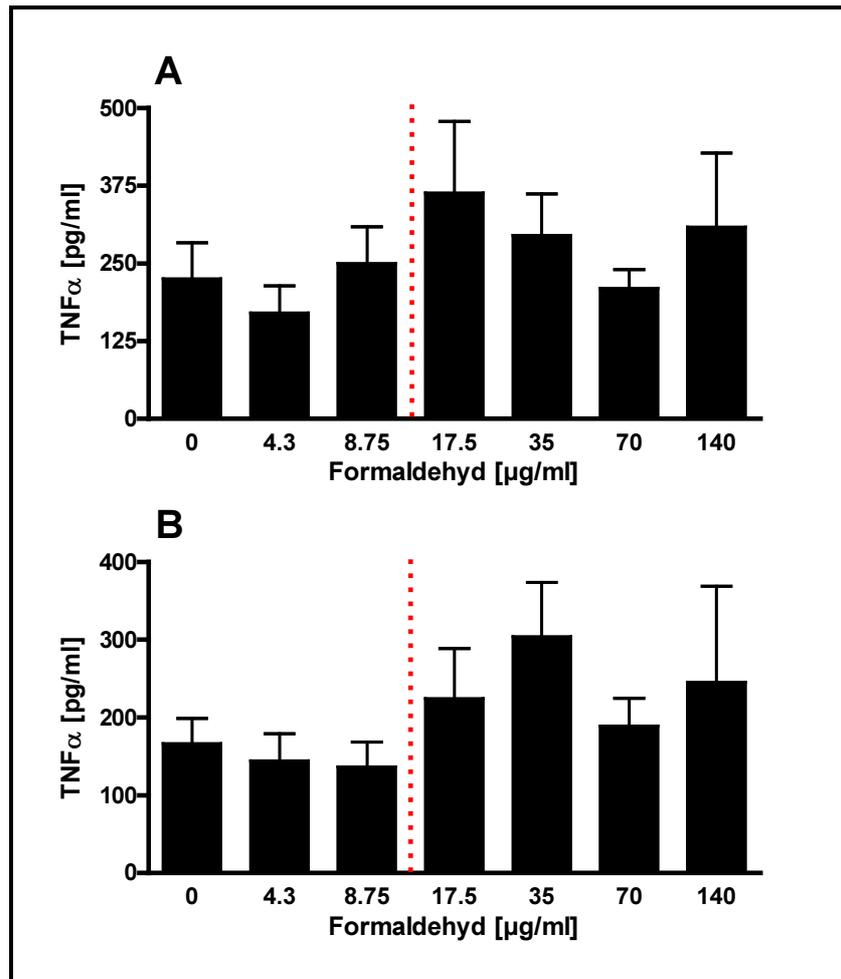
Tritonkontrolle, stieg aber deutlich nach Exposition 17.5 µg/ml Formaldehyd auf 29 % an (Abb. 35). Durch 35 µg/ml Formaldehyd wurden 30 % LDH freigesetzt und durch 70 µg/ml 42 % (Abb. 35). 140 µg/ml Formaldehyd induzierte eine LDH-Freisetzung von 46 % im Vergleich zur Tritonkontrolle (Abb. 35).



**Abb. 35: LDH-Freisetzung von PCLS nach 24 h Inkubation mit 4.3-140 µg/ml Formaldehyd in DMEM**

Die Vitalität wurde als relative LDH-Aktivität im PCLS-Überstand im Vergleich zum gesamten LDH Gehalt (100 %) nach der Gewebelyse mit Triton X-100 kalkuliert. Mittelwert ± SEM. n=4. Statistik durch *unpaired t*-Test: im Vergleich zu Gewebekontrolle, n.s. = nicht signifikant, \* =  $p < 0.05$  und \*\* =  $p < 0.01$ .

TNF $\alpha$  wurde im ELISA bestimmt. Dabei zeigte sich keine Beeinflussung der intra- und extrazellulären TNF $\alpha$ -Levels durch subtoxische Formaldehyd-Konzentrationen (4.3-140 µg/ml) (Abb. 37). Tendenziell wurden nach Exposition von PCLS mit > 17.5 µg/ml Formaldehyd erhöhte extra- und intrazelluläre TNF $\alpha$ -Konzentrationen nachgewiesen (Abb. 37).



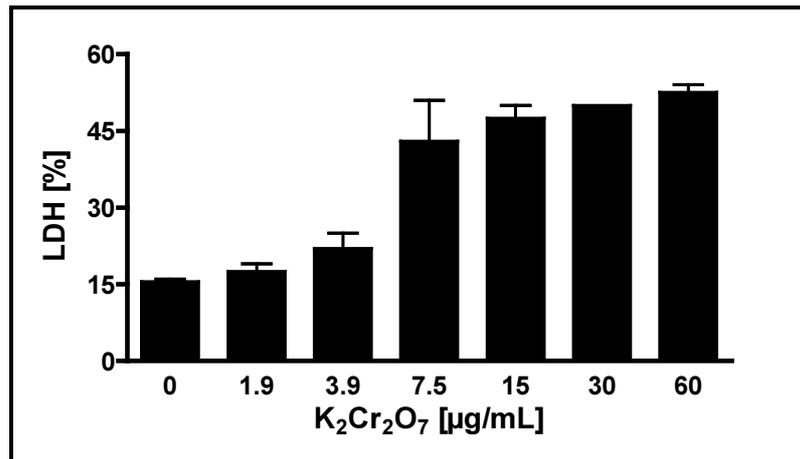
**Abb. 36: TNF $\alpha$ -Produktion nach Exposition von PCLS mit Formaldehyd in DMEM**

PCLS wurden 24 h mit 4.3-140  $\mu\text{g/ml}$  Formaldehyd inkubiert. Die extrazellulären (A) und intrazellulären (B) TNF $\alpha$ -Levels wurden durch ELISA bestimmt. Die rote senkrechte Linie markiert die toxische Grenze. Mittelwert  $\pm$  SEM.  $n=4$ . Statistik durch *unpaired* t-Test: im Vergleich zur 0  $\mu\text{g/ml}$  Formaldehyd wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

#### 5.1.2.3.5 Zytotoxische Wirkung von Kaliumdichromat in PCLS

Zellvitalität und TNF $\alpha$ -Produktion wurden in PCLS aus Rattenlungen nach 24 h Inkubation mit Kaliumdichromat untersucht.

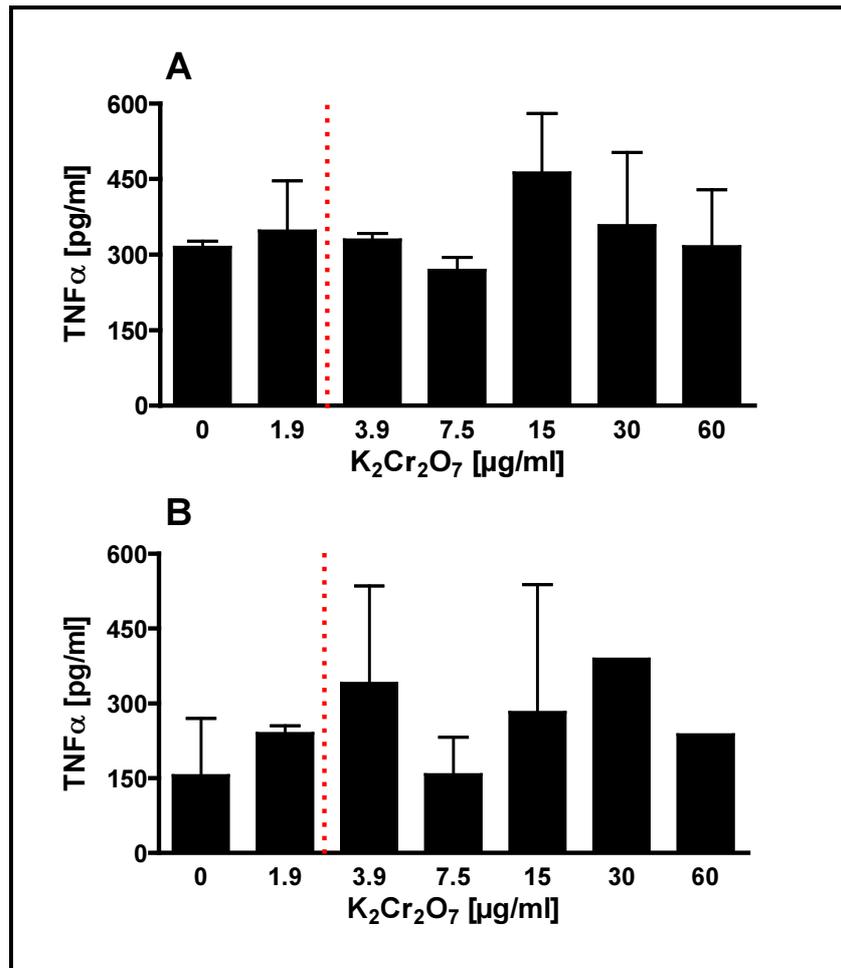
Kaliumdichromat bewirkte eine konzentrationsabhängige Freisetzung von LDH in PCLS (Abb. 37). 3.9  $\mu\text{g/ml}$  Kaliumdichromat löste eine LDH-Freisetzung von 22 % aus, die durch höhere Konzentrationen (> 3.9  $\mu\text{g/ml}$ ) bis zu 53 % gesteigert wurde.



**Abb. 37: LDH-Freisetzung von PCLS nach 24 h Inkubation mit 1.9-60 µg/ml Kaliumdichromat (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) in DMEM**

Die Vitalität wurde als relative LDH-Aktivität im PCLS-Überstand im Vergleich zum gesamten LDH Gehalt (100 %) nach der Gewebelyse mit Triton X-100 kalkuliert. Mittelwert ± SEM. n=2. Statistik durch *unpaired t*-Test: im Vergleich zur Gewebekontrolle wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Die TNF $\alpha$ -Produktion wurde mittels ELISA untersucht. Nach Exposition mit Kaliumdichromat wurden bezüglich TNF $\alpha$  weder extra- noch intrazellulär signifikante Unterschiede im Vergleich zu Gewebekontrolle nachgewiesen (Abb. 38A und B). Tendenziell wurden nach einer Exposition mit 1.9 µg/ml Kaliumdichromat die extrazellulären TNF $\alpha$ -Konzentrationen um 32 % und die intrazellulären um 84 % erhöht (Abb. 38A und B). Kaliumdichromat-Konzentrationen, die höher als 1.9 µg/ml waren, bewirkten stark variierende TNF $\alpha$ -Produktionen in PCLS (Abb. 38A und B). Ein konzentrationsabhängiger Effekt von Kaliumdichromat auf TNF $\alpha$  konnte extra- und intrazellulär nicht nachgewiesen werden (Abb. 38A und B).



**Abb. 38: Konzentrationsabhängige TNF $\alpha$ -Produktion nach Exposition von PCLS mit Kaliumdichromat in DMEM**

PCLS wurden 24 h mit 0.9-60  $\mu\text{g/ml}$  Kaliumdichromat inkubiert. Die extrazellulären (A) und intrazellulären (B) TNF $\alpha$ -Levels wurden durch ELISA bestimmt. Die rote senkrechte Linie markiert die toxische Grenze. Mittelwert  $\pm$  SEM.  $n=1-2$ . Statistik durch *unpaired t*-Test: im Vergleich zur Gewebekontrolle wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

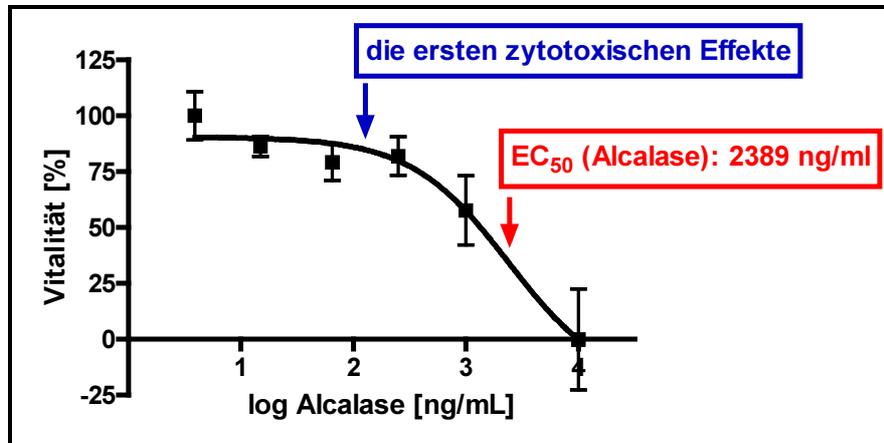
### 5.1.2.3.6 Bestimmung der Toxizität des Waschmittelenzyms Alcalase in PCLS

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die zytotoxischen Effekte des hochmolekularen Allergens Alcalase in PCLS untersucht. Die toxisch wirksame Alcalase-Konzentration wurde im MTT-Assay bestimmt, weil die enzymatische Umsetzung durch LDH in Zellkulturüberständen durch Alcalase gestört wird und Calcein AM auch durch die proteolytische Aktivität der Alcalase umgesetzt werden kann.

Hierzu wurden PCLS hergestellt, 16 h mit Alcalase (4 ng/ml, 15 ng/ml, 65 ng/ml, 250 ng/ml, 1000 ng/ml und 10000 ng/ml) inkubiert (Abb. 39) und danach mit MTT versetzt. Im MTT-Test wurde die Vitalität unbehandelter Lungenschnitte als 100 % definiert. Dabei zeigte sich, dass die enzymatische Umsetzung von MTT in Mitochondrien vitaler Zellen durch

## Ergebnisse

> 65 ng/ml Alcalase empfindlich gestört war (Abb. 39). In PCLS betrug  $EC_{50}$  für Alcalase 2389 ng/ml.



**Abb. 39: Vitalität der PCLS nach 16 h Inkubation mit ansteigenden Alcalase-Konzentrationen (4-10000 ng/ml)**

Die Vitalität der PCLS wurde 16 h nach Inkubation mit Alcalase im MTT-Assay bestimmt. Alcalase-Konzentrationen > 65 ng/ml zeigten erste toxische Effekte in PCLS (blau markiert), der  $EC_{50}$  betrug 2389 ng/ml (rot markiert). Mittelwert  $\pm$  SEM, n=3.

### 5.1.2.4 Hochregulation und Suppression von Zelloberflächenproteinen antigenpräsentierender Zellen in PCLS

Die Veränderung der Expression von Proteinen auf der Zelloberfläche immunologisch aktiver Zellen spielt eine Schlüsselrolle bei der Induktion einer Immunreaktion als Reaktion auf einen immunologischen Stimulus. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression der Oberflächenmarker MHCII, CD80 und CD86 auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC) in PCLS nach Aktivierung mit LPS und nach Unterdrückung dieser Antwort mit Dexamethason untersucht. T-Zellen stehen unter der Kontrolle von professionellen APCs und vermitteln als Effektorzellen die Immunität. Die reziproke Interaktion, nämlich der Einfluss von T-Zellen auf DC wurde in Co-Kultur von PCLS mit Ovalbumin-spezifischen  $CD4^+$ -Zellen aus DO11.10 transgenen Mäusen intensiver untersucht. Hierbei wurden Zelloberflächenmarker dendritischer Zellen, wie MHC Klasse II und CD86 mittels CLSM untersucht und IL-2 als T-Zell-Aktivierungsmarker mittels ELISA ermittelt.

In PCLS aus den Lungen naiver BALB/c Mäuse erfolgte die mikroskopische Untersuchung der Expression von MHC Klasse II, CD11c und CD86. Die Co-Expression von CD11c und MHC Klasse II konnte durch Verwendung von PCLS aus Lungen CD11c-EYFP transgener Mäuse detektiert werden. CD11c-EYFP transgene Mäuse exprimierten EYFP unter der

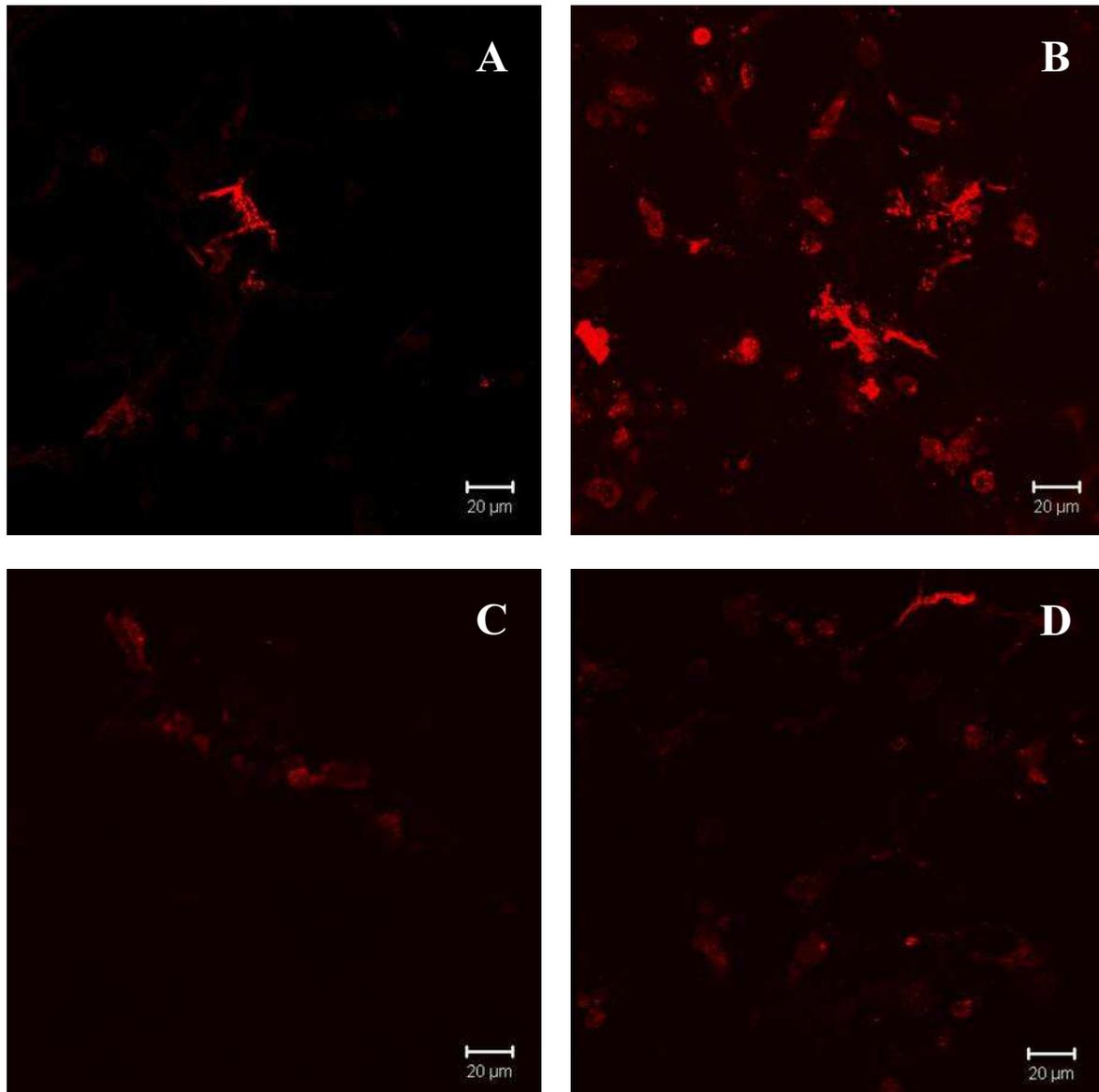
Kontrolle des CD11c-Promotors (Lindquist *et al.*, 2004), was eine Differenzierung von MHC Klasse II<sup>+</sup>- und CD11c<sup>+</sup>-Zellen erlaubte. MHC Klasse II wurde durch immunhistochemische Fluoreszenzfärbung mit einem Cy5-markierten Antikörper nachgewiesen.

#### MHC Klasse II in PCLS aus BALB/c und CD11c-EYFP transgenen Mäusen:

PCLS aus Lungen von BALB/c und CD11c-EYFP transgenen Mäusen wurden mit 500 ng/ml LPS und in Kombination mit 50 µg/ml Dexamethason 24 h inkubiert. Nach immunhistochemischer Färbung der Lungenschnitte mit einem monoklonalen Cy5-markierten anti-MHCII-Antikörper wurde die Expression von MHC Klasse II mittels CLSM untersucht.

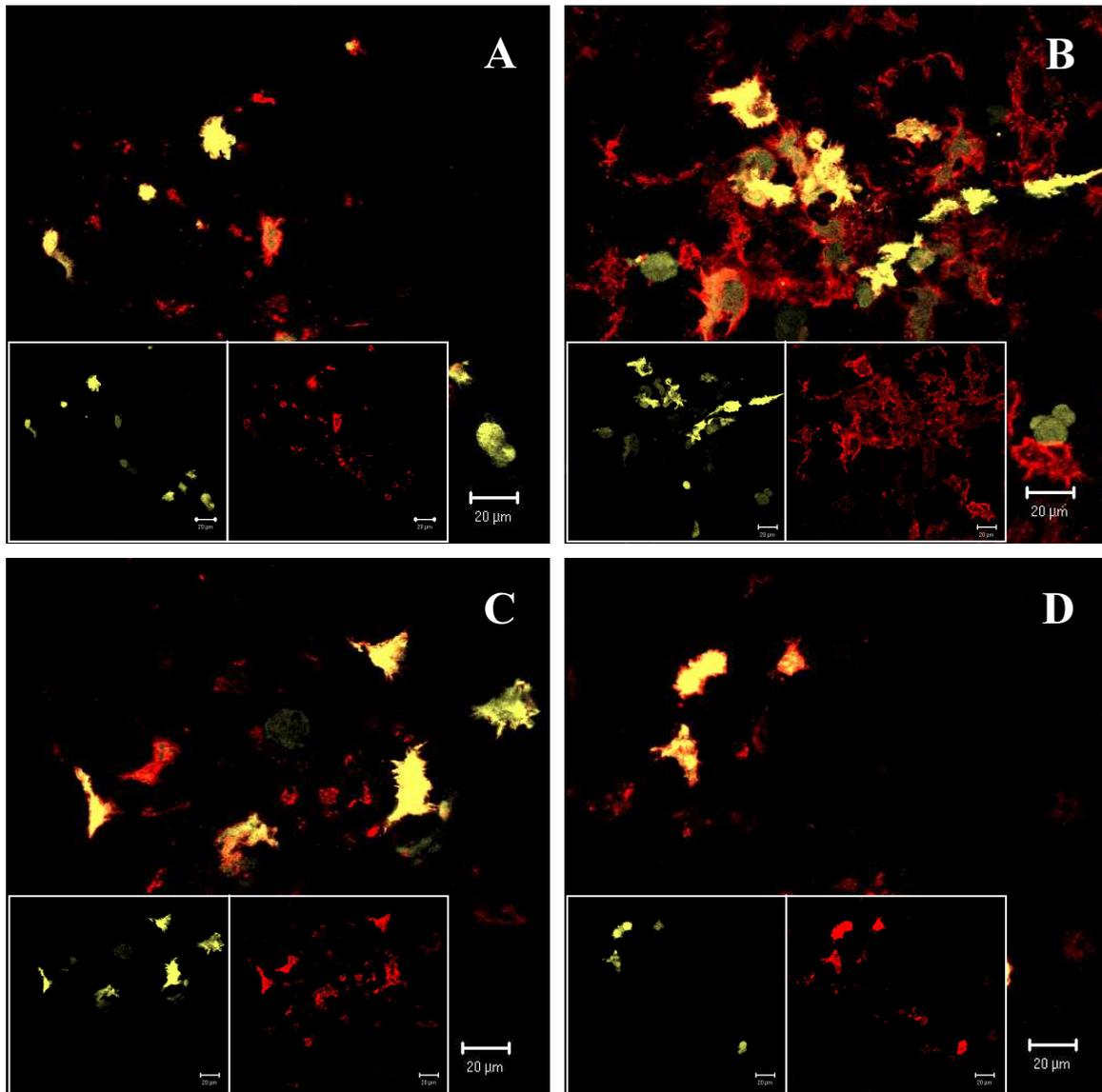
Dabei zeigte sich ohne Aktivierung mit LPS nur eine relativ schwache Expression von MHC Klasse II im Lungengewebe (Abb. 40 A und Abb. 41 A). MHC Klasse II<sup>+</sup>-Zellen wiesen die charakteristische Morphologie dendritischer Zellen (DC) auf (Abb. 40 A und Abb. 41 A). LPS induzierte eine verstärkte Expression von MHC Klasse II (Abb. 40 A und B). Dieses Ergebnis konnte auch in PCLS aus CD11c-EYFP transgenen Mäusen nach Exposition mit LPS bestätigt werden (Abb. 41 A und B). Es konnten Populationen beobachtet werden, die MHC Klasse II/CD11c doppelpositiv, sowie nur MHC Klasse II<sup>+</sup> oder CD11c<sup>+</sup> waren. Dabei wurde nachgewiesen, dass auch in CD11c-negativen Zellen durch LPS die Expression des Zelloberflächenproteins MHC Klasse II initiiert wird (Abb. 41 A und B). Dexamethason supprimierte eindeutig die LPS-induzierte Expression von MHC Klasse II (Abb. 40C und Abb. 41C) sowohl in PCLS aus Lungen von Wildtyp- als auch transgenen Tieren.

Das Verhältnis von MHC Klasse II-positiven zu den CD11c-EYFP positiven Zellen wurde durch quantitative 3D-Bildanalyse quantifiziert (Abb. 41 und Tab 8). Die Aktivierung des Lungengewebes mit LPS resultierte in einem 3-fach höheren Volumenverhältnis von MHC Klasse II/CD11c im Vergleich zum unstimulierten Gewebe (Tab 8). Durch Co-Inkubation mit LPS und Dexamethason wurde das Volumenverhältnis von MHC Klasse II/CD11c im Vergleich zu LPS-Stimulation um die Hälfte minimiert (Tab 8).



**Abb. 40: Immunfluoreszenzfärbung von MHC Klasse II in PCLS von BALB/c Mäusen nach 24 h Inkubation mit LPS und Dexamethason**

PCLS wurden behandelt mit 500 ng/ml LPS (B), 500 ng/ml LPS and 10 µg/ml Dexamethason (C) und 10 µg/ml Dexamethason (D) und mit der Gewebekontrolle verglichen (A). Die 3D-Aufnahmen wurden durch CLSM generiert (40x Wasserimmersionsobjektiv, Anregungswellenlängen 633 nm, Emissionslangpassfilter 650 nm, Z-Stapelstärke 20 µm). Die dargestellten Aufnahmen repräsentieren die Ergebnisse von mindestens drei Experimenten.



**Abb. 41: Immunfluoreszenzfärbun von MHC Klasse II in PCLS von CD11c-EYFP-transgenen Mäusen nach 24 h Inkubation mit LPS und Dexamethason**

PCLS wurden mit 500 ng/ml LPS (B), 500 ng/ml LPS and 10 µg/ml Dexamethason (C) und 10 µg/ml Dexamethason (D) stimuliert und mit der unbehandelten Gewebekontrolle verglichen (A). Die 3D-Aufnahmen wurden durch CLSM generiert (40x Wasserimmersionsobjektiv, Anregungswellenlängen 488 nm and 633 nm, Emissionsbreitpassfilter 505-530 nm und -langpassfilter 650 nm, Z-Stapeldicke 20 µm). Dargestellt sind die Overlay-Aufnahmen von zwei Fluoreszenz-Kanälen (rote Fluoreszenz: für MHC Klasse II und gelbe Fluoreszenz für CD11c) und als Einzel-Fluoreszenzkanäle (die kleinen Bilder). Die dargestellten Aufnahmen repräsentieren die Ergebnisse von mindestens drei Experimenten.

**Tab 8.** Verhältnis der Volumina MHC Klasse II- und EYFP-CD11c-positiver Zellen nach Fluoreszenzfärbung von PCLS aus einer CD11c-EYFP-transgenen Maus.

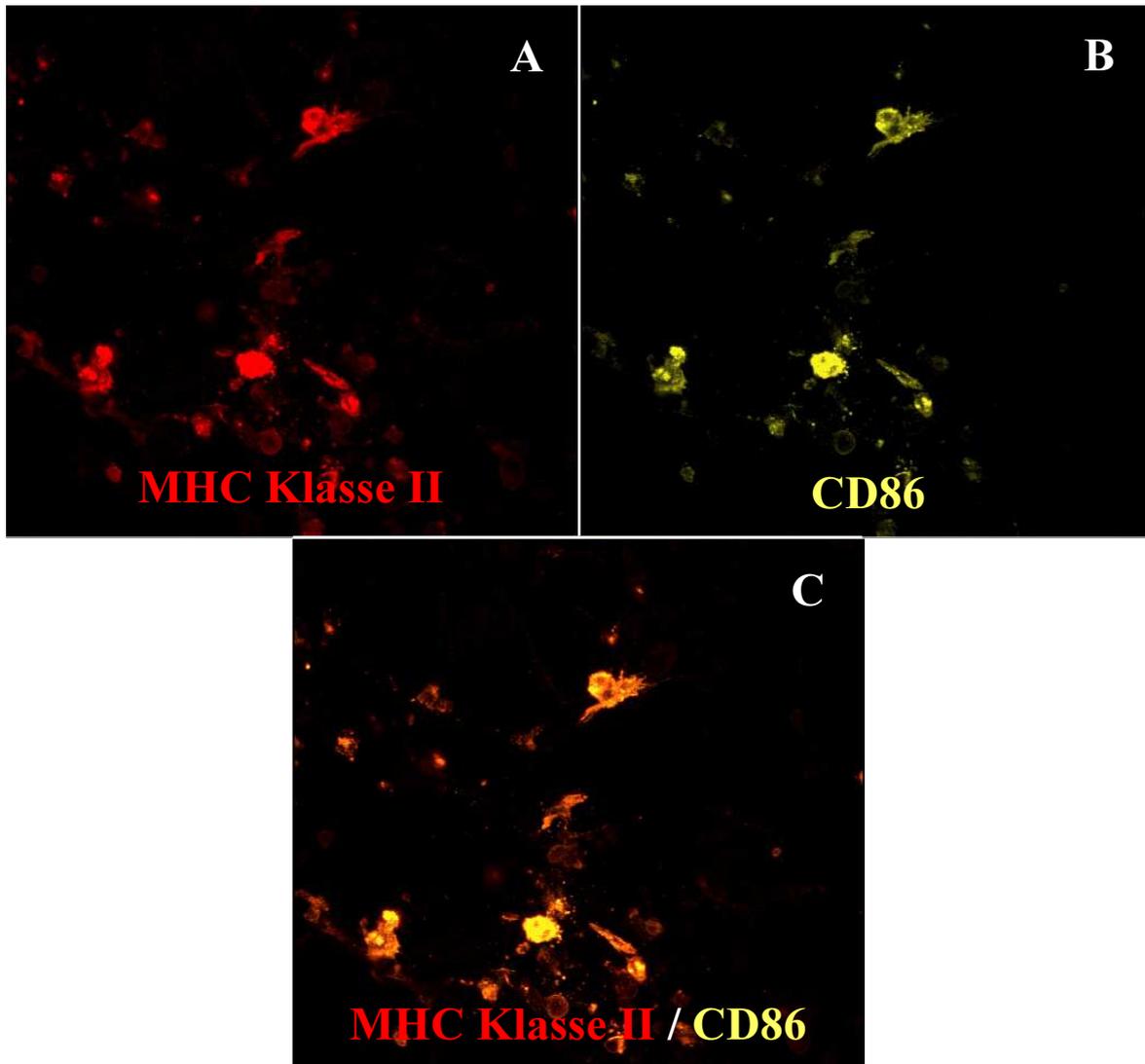
	<b>MHC Klasse II [<math>\mu\text{m}^3</math>]</b>	<b>EYFP-CD11c [<math>\mu\text{m}^3</math>]</b>	<b>MHC Klasse II/EYFP- CD11c</b>
<b>Gewebekontrolle</b>	5913	2346	2.5
<b>500 ng/ml LPS</b>	42162	5176	8.6
<b>500 ng/ml LPS/ 10 <math>\mu\text{g/ml}</math> Dexamethason</b>	12210	3446	3.5
<b>10 <math>\mu\text{g/ml}</math> Dexamethason</b>	10952	2560	4.3

#### Die Expression des Corezeptors CD86 in PCLS

Die Expression des Corezeptors CD86 konnte nicht auf der Oberfläche dendritischer Zellen (DCs) in PCLS nach Aktivierung mit LPS nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

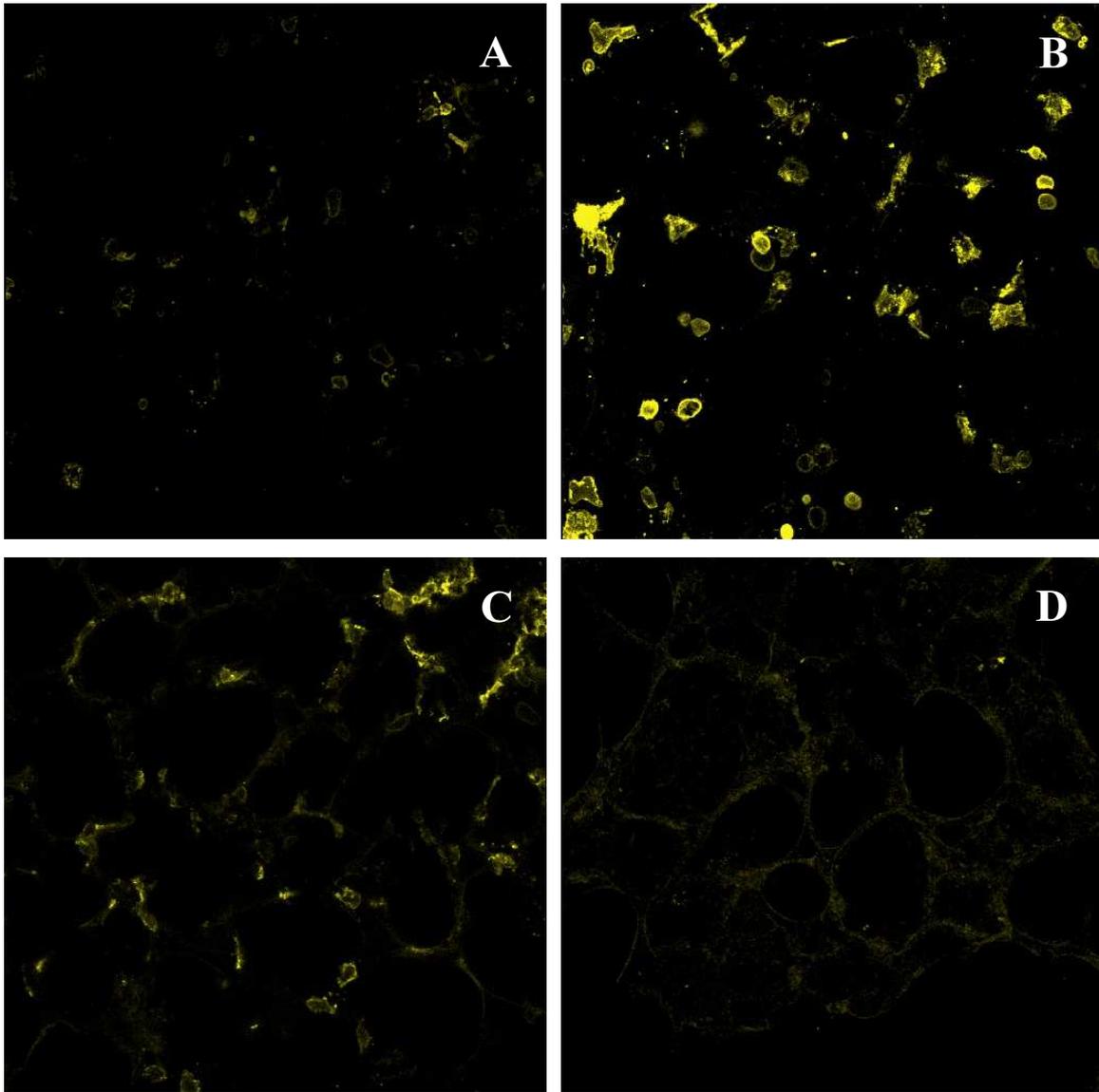
T-Zellen besitzen ein gewisses Potential, DC zu aktivieren und auszudifferenzieren. Aus diesem Grund wurden die Lungenschnitte naiver BALB/c Mäusen mit Ovalbumin-spezifischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, dem spezifischen Allergen Ovalbumin sowie LPS und Dexamethason inkubiert. Nach 24 h Inkubation von PCLS mit CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und 1 mg/ml Ovalbumin konnte eine Co-Expression von MHC Klasse II und CD86 in Zellen mit typischer DC Morphologie nachgewiesen werden (Abb. 42 und Abb. 43). Durch Zugabe von 500 ng/ml LPS konnte die CD86-Expression in PCLS nicht weiter gesteigert werden (Daten nicht gezeigt). Dexamethason in einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  inhibierte die CD86-Expression (Abb. 43 C).

Im gleichen Ansatz erfolgte die extrazelluläre Bestimmung des Proliferationsmarkers IL-2 mit ELISA. Ohne T-Zellen waren nur geringe Mengen IL-2 nachweisbar. Die Antigen-spezifische Aktivierung des Lungengewebes mit Ovalbumin bei gleichzeitiger Präsenz von Ovalbumin-spezifischen CD4<sup>+</sup>-Zellen zeigte dagegen eine erheblich gesteigerte Sekretion von IL-2, ein Effekt, der auch in Kombination mit LPS beobachtet werden konnte (Abb. 44). Im Vergleich dazu wurde bei Ovalbumin-spezifischen CD4<sup>+</sup>-Zellen, die mit Con A stimuliert wurden nur eine geringfügig höhere IL-2-Sekretion nachgewiesen (Abb. 44). Dexamethason inhibierte die Ovalbumin- und Ovalbumin/LPS-induzierte IL-2-Freisetzung (Abb. 44). Ovalbumin-spezifische CD4<sup>+</sup>-Zellen, die mit Ovalbumin stimuliert wurden, produzierten nur geringe Mengen IL-2 (Abb. 44).



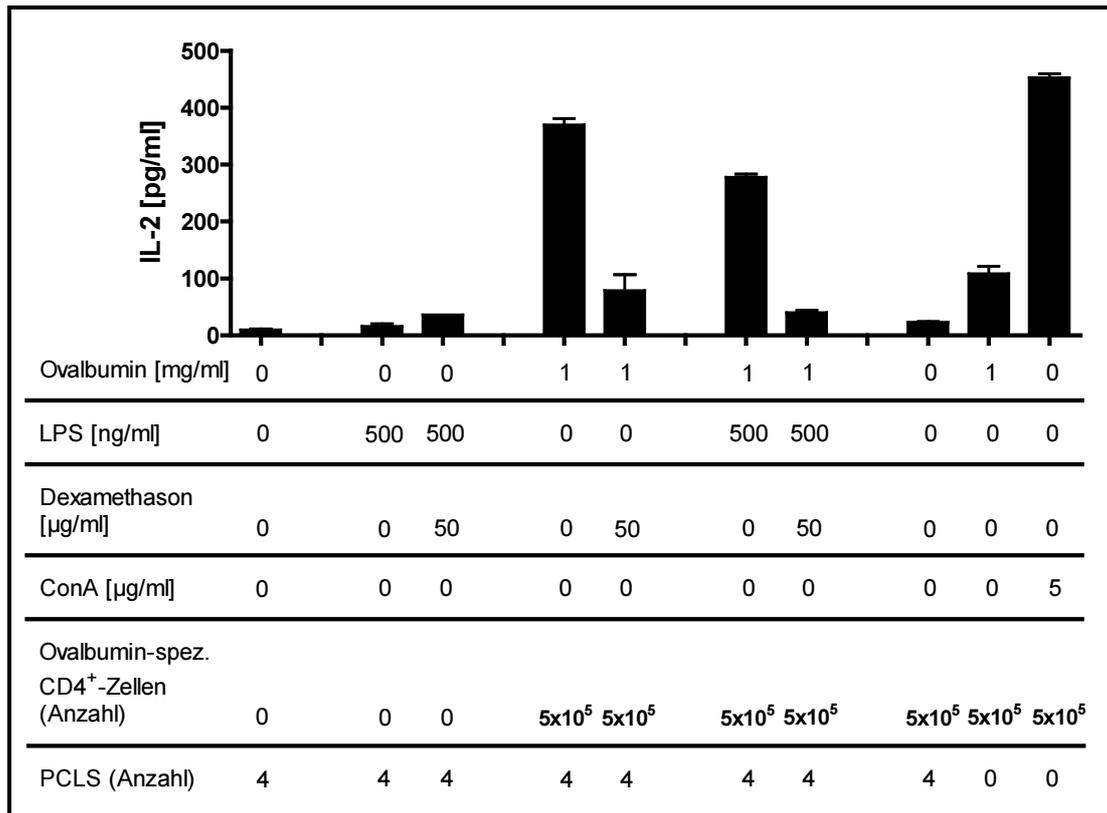
**Abb. 42: Immunhistochemischer Nachweis der Co-Expression von MHC Klasse II und CD86 *ex vivo* in PCLS nach 24 h Inkubation mit Ovalbumin-spezifischen CD4<sup>+</sup>-Zellen und 1 mg/ml Ovalbumin**

Die 3D-Aufnahmen wurden durch CLSM generiert (40x Wasserimmersionsobjektiv, Anregungswellenlängen 488 nm and 543 nm, Emissionsbreitpassfilter 505-530 nm und -langpassfilter 560 nm, Z-Stapelstärke 20  $\mu\text{m}$ ). Dargestellt sind die Einzel-Fluoreszenzkanäle (A und B) und die Overlay-Aufnahme (C) von zwei Fluoreszenz-Kanälen (rote Fluoreszenz: für MHC Klasse II und gelbe Fluoreszenz für CD86). Die dargestellten Aufnahmen repräsentieren die Ergebnisse von mindestens drei Experimenten.



**Abb. 43: Immunhistochemischer Nachweis der CD86 Expression nach Co-Kultur von PCLS mit Ovalbumin-spezifischen CD4<sup>+</sup>-Zellen**

PCLS in Co-Kultur mit Ovalbumin-spezifischen CD4<sup>+</sup>-Zellen wurden mit 1 mg/ml Ovalbumin (B) und in Kombination mit 50 µg/ml Dexamethason (C) 24 h inkubiert und mit der Gewebekontrolle (A, ohne CD4<sup>+</sup>-Zellen) verglichen. Die 3D-Aufnahmen wurden durch CLSM generiert (40x Wasserimmersionsobjektiv, Anregungswellenlänge 488 nm und Emissionsbreitpassfilter 505-530 nm, Z-Stapeldicke 20 µm). Die dargestellte Färbung mit dem Isotyp-Antikörper (D) wurde nach Stimulation von PCLS mit Ovalbumin-spezifischen CD4<sup>+</sup>-Zellen und 1 mg/ml Ovalbumin bei gleichen Einstellungen detektiert. Die dargestellten Aufnahmen repräsentieren die Ergebnisse von mindestens drei Experimenten.



**Abb. 44: IL-2-Freisetzung nach 24 h Inkubation von PCLS mit Ovalbumin-spezifischen CD4<sup>+</sup>-Zellen, Ovalbumin, LPS und Dexamethason im Vergleich zu Con A oder Ovalbumin stimulierten Ovalbumin-spezifischen CD4<sup>+</sup>-Zellen**

Die IL-2-Sekretion wurde mittels ELISA untersucht. Mittelwert ± SEM. n=1.

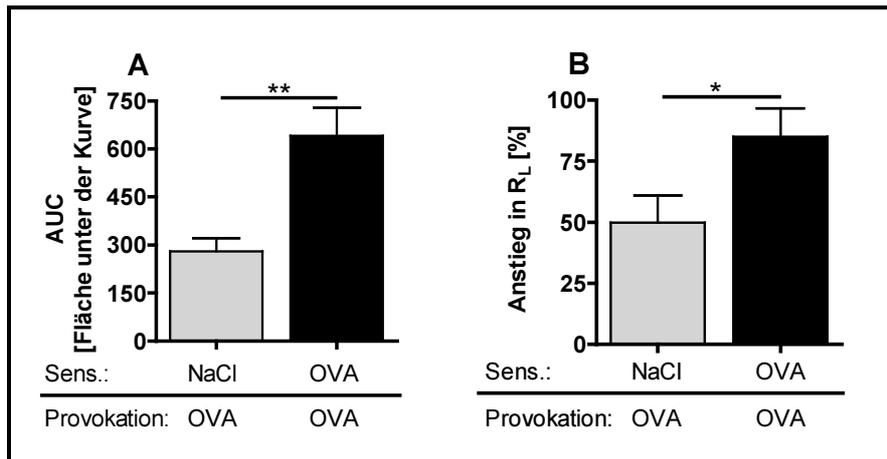
## **5.2 *In vivo* und *ex vivo* Lungenfunktionsmessungen**

Im Rahmen des Projektes „Vermeidung von *In-vivo*-Lungenfunktionsmessungen in pharmakologischen und toxikologischen Untersuchungen" sollte die Messung der Bronchokonstriktion in lebenden Lungenschnitten im Vergleich zu *in vivo* Lungenfunktionsmessungen validiert werden. Dazu wurden verschiedene allergische Asthmamodellen der Maus und der Ratte genutzt. Zunächst wurden die Tiere mit dem künstlichen Modellallergen Ovalbumin immunisiert und induzierte Veränderungen der Lungenfunktion *in vivo* und *ex vivo* gemessen. Die EAR, d.h. die Änderungen der Lungenfunktion während und unmittelbar Allergenprovokation, wurde *in vivo* und *ex vivo* in sensibilisierten und nicht-sensibilisierten Tieren untersucht. Die Messung der AHR als unspezifische Bronchokonstriktion auf Methacholin oder Acetylcholin erfolgte 24 oder 48 h nach Allergenprovokation. Durch die Korrelation dieser *ex vivo* und *in vivo* Resultate wurden die optimalen Bedingungen zur parallelen Messung der EAR bzw. AHR in lebenden Lungenschnitten aus aktiv sensibilisierten Tieren ermittelt.

Weiterhin wurde die *in vivo* und *ex vivo* Lungenfunktionsmessung zur Testung niedermolekularer Allergene (Industriechemikalien) etabliert. Dabei erfolgte die Sensibilisierung der Tiere mit bekannten Allergenen TMA und DNCB. Im Anschluss wurde die Wirkung dieser Substanzen auf die Lungenfunktion *in vivo* und *ex vivo* untersucht und charakterisiert.

### **5.2.1 *In vivo* versus *ex vivo* Lungenfunktion und bronchiale Entzündung im Ovalbumin Rattenmodell**

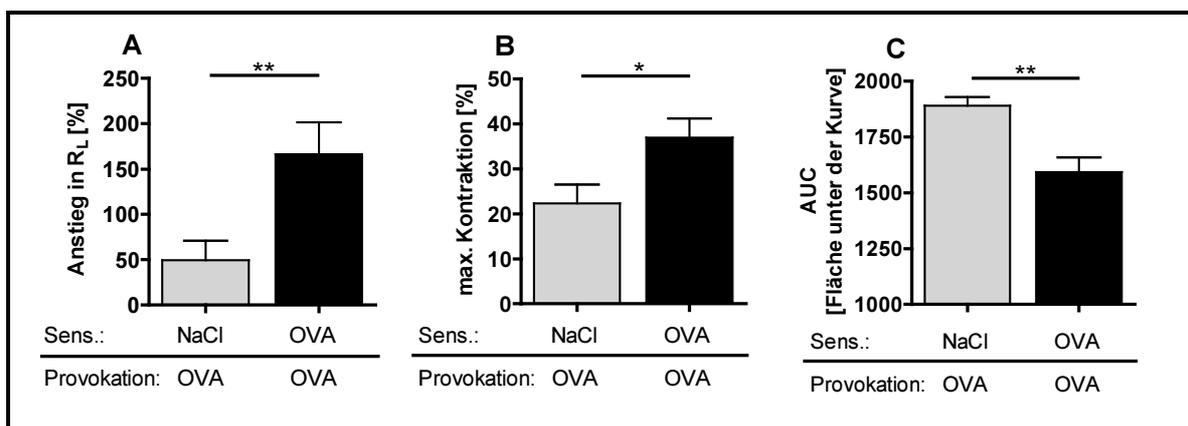
Im Verlauf des Projektes wurden insgesamt vier verschiedene Studien an Ovalbumin sensibilisierten BN Ratten durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studie bestätigten, dass die *in vivo* in asthmatischen Tieren gemessene Lungenfunktionsänderungen d.h. die direkte Bronchokonstriktion in Antwort auf eine Allergenprovokation auch *ex vivo* gezeigt werden kann (Abb. 45). Dabei wurden *ex vivo* und *in vivo* signifikante Unterschiede zwischen den sensibilisierten und Kontrolltiergruppen nachgewiesen (Abb. 45). Der zeitliche Verlauf der Kontraktion der Atemwege über 20 min in PCLS wurde als AUC dargestellt (Abb. 45A). Die allergische Reaktion auf inhalative Ovalbumin-Provokation *in vivo* wurde als Anstieg in  $R_L$  dargestellt (Abb. 45 B).



**Abb. 45: Ex vivo EAR (A) und in vivo EAR (B)**

Allergische Frühphasenreaktion der Atemwege während und nach der Allergenprovokation ist am Tag 21 *ex vivo* als AUC (*area under the curve*) und *in vivo* als prozentualer R<sub>L</sub>-Anstieg dargestellt.  $n_{A(\text{NaCl/OVA})}=6$ ,  $n_{A(\text{OVA/OVA})}=6$ ;  $n_{B(\text{NaCl/OVA})}=14$ ,  $n_{B(\text{OVA/OVA})}=14$ . Mittelwert ± SEM, Statistik durch *unpaired* t-Test: \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ .

In einer Studie konnte die EAR *in vivo* und *ex vivo* in einzelnen Tieren korreliert werden. In der Abb. 46 ist der R<sub>L</sub>-Anstieg *in vivo* (Abb. 46 A) wie auch die maximale Kontraktion (Abb. 46 B) und die Fläche unter der Kurve (AUC) (Abb. 46 C) der *ex vivo* EAR dargestellt. Die maximale Kontraktion steht für die Stärke der Kontraktion, während die AUC darüber hinaus noch die Kontraktionsdauer berücksichtigt.

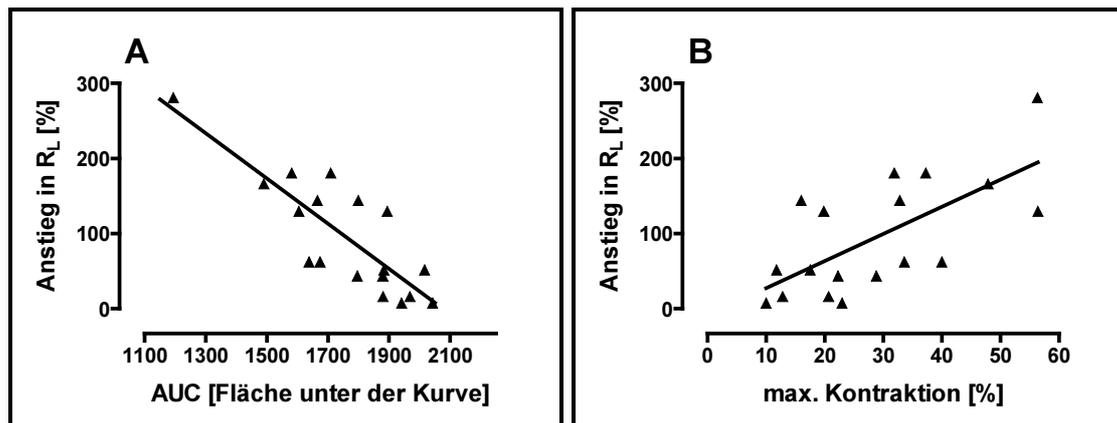


**Abb. 46: In vivo EAR am Tag 21 (A) und ex vivo EAR am Tag 28 als max. Kontraktion (B) und Fläche unter der Kurve (C)**

Allergische Frühphasereaktion der Atemwege während und nach der Allergenprovokation ist am Tag 21 *in vivo* als Anstieg in R<sub>L</sub> und am Tag 28 *ex vivo* als max. Kontraktion und Fläche unter der Kurve dargestellt.  $n_{A(\text{NaCl/OVA})}=5$ ,  $n_{A(\text{OVA/OVA})}=5$ ;  $n_{B(\text{NaCl/OVA})}=5$ ,  $n_{B(\text{OVA/OVA})}=5$ ;  $n_{C(\text{NaCl/OVA})}=5$ ,  $n_{C(\text{OVA/OVA})}=5$ . Mittelwert ± SEM, Statistik durch *unpaired* t-Test: \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ .

## Ergebnisse

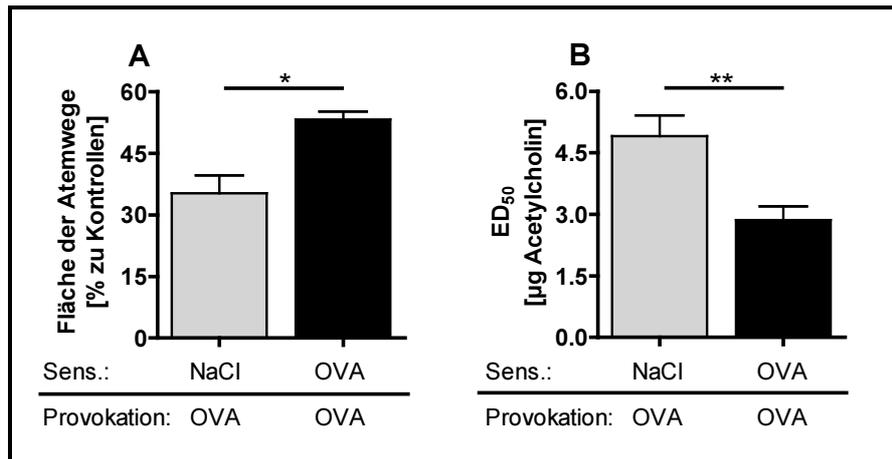
Die nicht parametrische Analyse von *in vivo* und *ex vivo* EAR-Daten (*in vivo*-R<sub>L</sub> gegen AUC), die aus denselben Tieren erhalten wurden, zeigte eine deutliche Korrelation (p=0.011) (Abb. 47 A). Hingegen führt der Vergleich von *in vivo* R<sub>L</sub>-Anstieg und maximaler Kontraktion (Abb. 47B) zu keiner signifikanten Korrelation. Dies bedeutet, dass außer der Kontraktionsstärke auch die Kontraktionsdauer berücksichtigt werden muss.



**Abb. 47: Korrelation der EAR *in vivo* und *ex vivo* nach der Allergenprovokation**

Der Vergleich zwischen den Lungenfunktionsparametern der EAR *in vivo* (prozentualer R<sub>L</sub>-Anstieg) und *ex vivo* (Area under the curve, AUC, Abb. A oder maximale Kontraktion, Abb. B) wurde mit JMP5.1 durchgeführt. Bei der „nicht parametrischen Analyse“ (Kendall's Tau b) ergab sich für die Korrelation ein p-Wert von 0,011 (*in vivo*-R<sub>L</sub> gegen AUC) bzw. von 0.103 (*in vivo*-R<sub>L</sub> gegen max. Kontraktion).

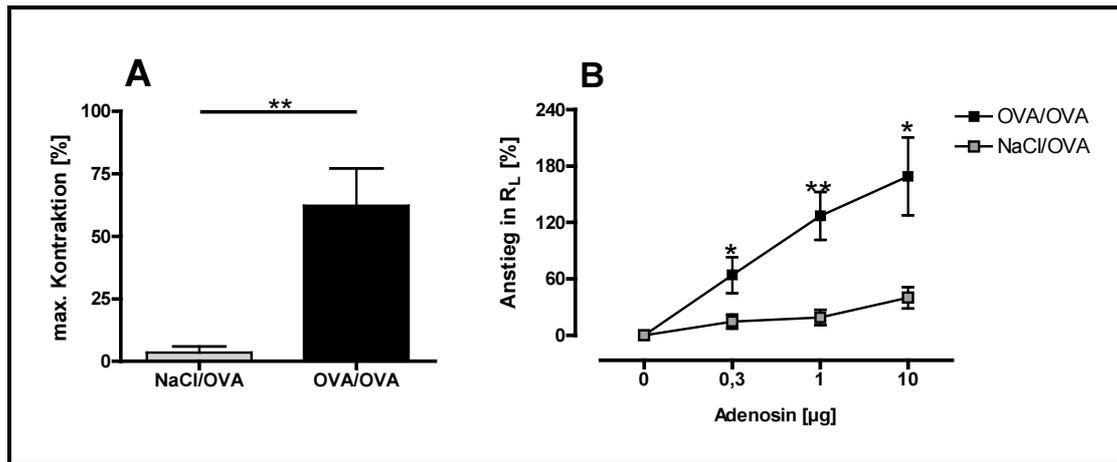
Durch die Messung der Acetylcholin induzierten Bronchokonstriktion *ex vivo* 24 h nach der Ovalbumin-Provokation wurde ein signifikanter Unterschied zwischen sensibilisierten und nicht-sensibilisierten Tiergruppen gezeigt (Abb. 48 A; Fläche der Atemwege im Vergleich zu Kontrollbronchien: 35 % vs. 53 %). *In vivo* konnte 24 h nach Allergenprovokation auch eine deutlich erhöhte Hyperreagibilität der Atemwege auf die Acetylcholin-Provokation bei sensibilisierten Ratten nachgewiesen werden (Abb. 48 B; 3 µg vs. 5 µg Acetylcholin). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass 48 h nach Allergenprovokation kein Unterschied in der AHR *in vivo* zwischen den immunisierten und nicht-immunisierten Tieren besteht (Daten nicht gezeigt). Die Untersuchung der AHR *ex vivo* 48 h nach Allergen-Restimulation ist nicht möglich. Die Ursache dafür ist vermutlich, dass durch Mediumwechsel nach 24 h die Entzündungsmediatoren entfernt wurden. Da ein Mediumwechsel zur Erhaltung der PCLS-Vitalität notwendig ist, wurden die *ex vivo* und *in vivo* Messungen der bronchialen Reaktion nach Acetylcholin-Exposition 24 h nach Allergenprovokation durchgeführt.



**Abb. 48: Ex vivo AHR am Tag 22 (A) und in vivo AHR am Tag 29 (B), 24 h nach Allergenprovokation**

Die Hyperreagibilität der Atemwege als Reaktion auf Acetylcholin-Provokation ist am Tag 22 *ex vivo* als Airway area (hohe Werte zeigen eine hohe AHR auf Acetylcholin) und am Tag 29 *in vivo* ED<sub>50</sub> (inhalative Acetylcholin-Dosis die für einen 50-%igen R<sub>L</sub>-Anstieg erforderlich ist) dargestellt.  $n_{A(\text{NaCl/OVA})}=5$ ,  $n_{A(\text{OVA/OVA})}=5$ ;  $n_{B(\text{NaCl/OVA})}=8$ ,  $n_{B(\text{OVA/OVA})}=12$ . Mittelwert  $\pm$  SEM, Statistik durch *unpaired* t-Test: \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ .

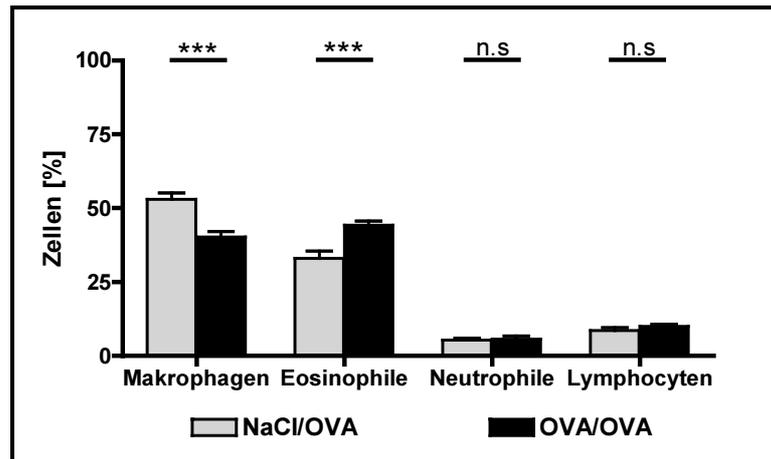
Eine deutliche AHR mit Adenosin bei sensibilisierten Tieren konnte in mehreren Studien *ex vivo* nachgewiesen werden (Abb. 49 A). Dabei wurde die Atemwegshyperreagibilität als Reaktion auf Provokation mit 10 mM Adenosin, parallel zur EAR oder 24 h nach Ovalbumin-Provokation, bestimmt. *In vivo* Hyperreagibilität der Atemwege nach inhalativer Adenosin-Provokation war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. In einer Studie konnte erfolgreich die *in vivo* AHR auf Adenosin nach intervenöser Applikation etabliert werden. Am Tag 21, 3 h nach Ovalbumin-Provokation wurde *in vivo* intravenös in die Schwanzvene 0,3, 1 und 10 µg Adenosin appliziert und die Veränderung der Lungenfunktion wurde während der Provokation und danach gemessen. Wie in Abb. 49 gezeigt, bewirkt Adenosin *ex vivo* und *in vivo* einen signifikanten Unterschied in der Bronchokonstriktion zwischen sensibilisierten und Kontrolltiergruppen.



**Abb. 49: Ex vivo (A) und in vivo (B) AHR als Reaktion auf Adenosin-Provokation**

*Ex vivo* Hyperreagibilität der Atemwege ist als Anstieg der Atemwegskontraktion nach der Exposition der PCLS mit 10 mM Adenosin, 24 h nach Allergenprovokation dargestellt. *In vivo* Reaktion auf intravenöse Adenosin-Applikation, 3 h nach Ovalbumin-Provokation, ist als dosisabhängiger R<sub>L</sub>-Anstieg dargestellt.  $n_{A(\text{NaCl/OVA})}=4$ ,  $n_{A(\text{OVA/OVA})}=4$ ;  $n_{B(\text{NaCl/OVA})}=6$ ,  $n_{B(\text{OVA/OVA})}=6$ . Mittelwert  $\pm$  SEM, Statistik durch *unpaired t*-Test: \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ .

Die lokale Entzündungsreaktion in der Lunge wurde durch Differenzierung der Zellen in der BAL charakterisiert. 48 h nach inhalativer Allergenprovokation, am Tag 23 konnte bezüglich des Anteils eosinophiler Zellen in BAL ein signifikanter Unterschied zwischen sensibilisierten und Kontrolltieren nachgewiesen werden (Abb. 50). Dabei waren 30 % der Zellen in BAL von Kontrolltieren Eosinophile (Abb. 50). Eine zweite inhalative Ovalbumin-Provokation, am Tag 28 induzierte gleiche Anteile eosinophiler Zellen in sensibilisierten und Kontrolltieren (Daten nicht gezeigt). Der prozentuale Anteil von Makrophagen in BAL sensibilisierter Tiere war niedriger im Vergleich zu Kontrolltieren (Abb. 50). Neutrophile und Lymphozyten wurden durch die Ovalbumin-Sensibilisierung und -Provokation nicht beeinflusst.

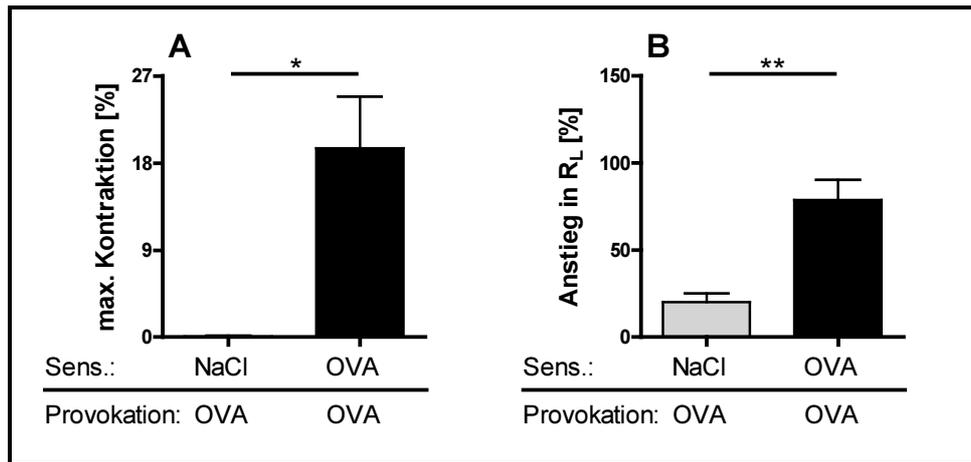


**Abb. 50: Zelldifferenzierung in BAL am Tag 23, 48 h nach Allergenprovokation**

Die Lungen wurden unmittelbar nach der *In-vivo*-Lungenfunktionsmessung (AHR, 48 h nach Ovalbumin-Provokation) lavagiert und die Zellen der BAL differenziert.  $n_{(\text{NaCl/OVA})}=8$ ,  $n_{(\text{OVA/OVA})}=8$ . Mittelwert  $\pm$  SEM, Statistik durch *unpaired* t-Test: n.s. = nicht signifikant, \*\*\* =  $p < 0,001$ .

### 5.2.2 *In vivo* versus *ex vivo* Lungenfunktion und bronchiale Entzündung im Ovalbumin Mausmodell

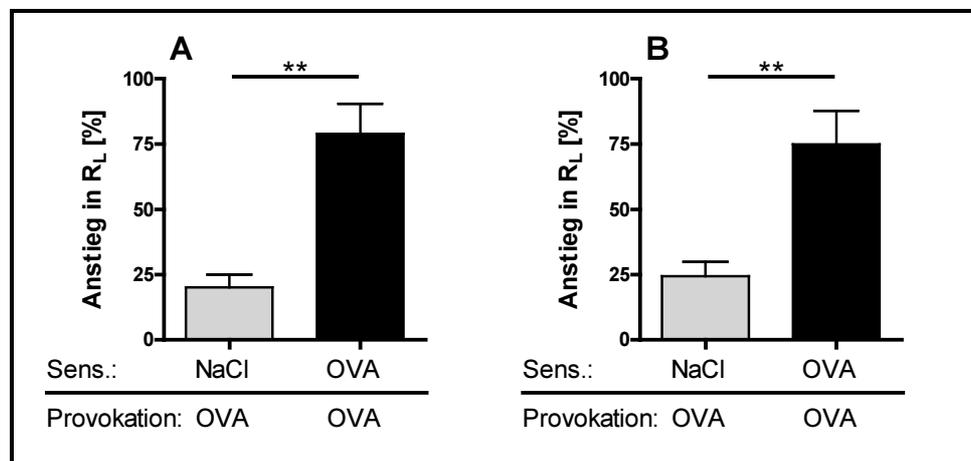
In einer der Studien dieses Vorhabens wurde die Lungenfunktion *in vivo* und *ex vivo* an Ovalbumin-sensibilisierten BALB/c Mäusen untersucht. Durch diese Experimente sollte die Messung der *ex vivo* Bronchokonstriktion an PCLS aus aktiv sensibilisierten Mäusen etabliert und mit den *in vivo* Ergebnissen verglichen werden. Wie in Abb. 51 gezeigt, kann die allergische Frühphasereaktion in aktiv immunisierten BALB/c Mäusen sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* mit vergleichbaren Ergebnissen erfasst werden (Abb. 51 A und B).



**Abb. 51: Ex vivo (A) und in vivo (B, C und D) EAR am Tag 35**

Die allergische Frühphasenreaktion der Atemwege während und nach der Allergenprovokation wurde am Tag 35 *in vivo* als R<sub>L</sub>-Anstieg und *ex vivo* als maximale Kontraktion gemessen und verglichen.  $n_{A(NaCl/OVA)}=4$ ,  $n_{A(OVA/OVA)}=8$ ;  $n_{B(NaCl/OVA)}=10$ ,  $n_{B(OVA/OVA)}=18$ . Mittelwert  $\pm$  SEM, Statistik durch *unpaired t*-Test: \* =  $p<0,05$ , \*\* =  $p<0,01$ .

Zwischen der *in vivo* EAR-Messung an den Tagen 35 und 42 konnte kein Unterschied gefunden werden (Abb. 52 A und B). Am Tag 35 wie auch 42 wurde ein signifikant höherer R<sub>L</sub>-Anstieg in sensibilisierten als in Kontrolltieren gemessen (Abb. 52).

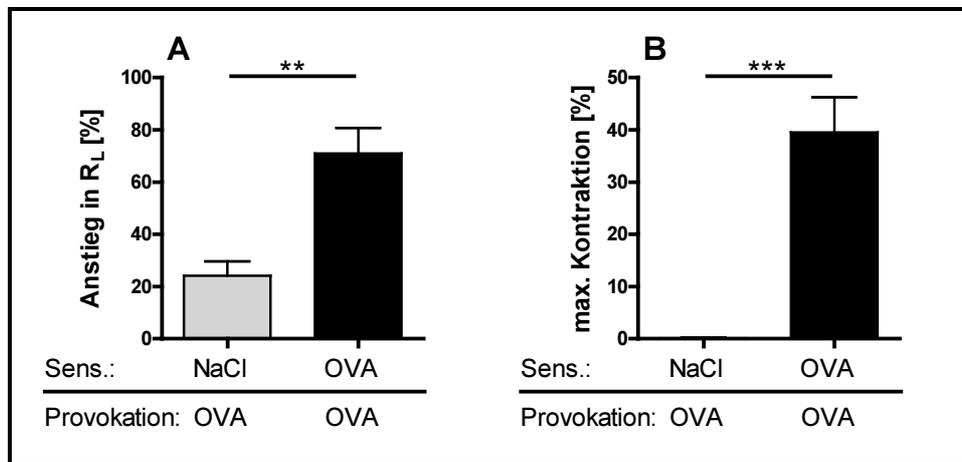


**Abb. 52: In vivo EAR am Tag 35 (A) und 42 (B)**

Die allergische Frühphasenreaktion der Atemwege während und nach der Allergenprovokation wurde am Tag 35 (A) und 42 (B) als R<sub>L</sub>-Anstieg gemessen.  $n_{A(NaCl/OVA)}=10$ ,  $n_{A(OVA/OVA)}=18$ ;  $n_{B(NaCl/OVA)}=5$ ,  $n_{B(OVA/OVA)}=9$ . Mittelwert  $\pm$  SEM, Statistik durch *unpaired t*-Test: \*\* =  $p<0,01$ .

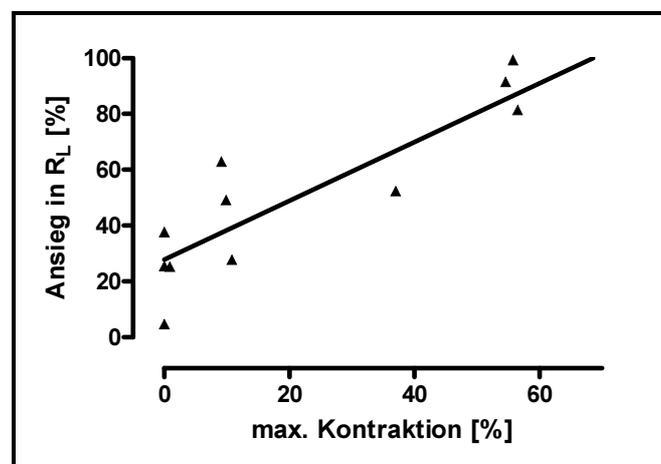
In der Abb. 53 ist die allergische Frühphasereaktion als R<sub>L</sub>-Anstieg *in vivo* am Tag 35 (Abb. 53 A) und als maximale Kontraktion (Abb. 53 B) *ex vivo* am Tag 42 dargestellt. Es ist

möglich gewesen, die EAR *in vivo* und *ex vivo* in den einzelnen BALB/c Mäusen zu korrelieren (Abb. 54).



**Abb. 53: *In vivo* EAR am Tag 35 (A) und *ex vivo* EAR am Tag 42 (B)**

Die allergische Frühphasenreaktion der Atemwege während und nach der Allergenprovokation wurde am Tag 35 (A) und 42 (B) als R<sub>L</sub>-Anstieg und maximale Kontraktion der Atemwege in PCLS gemessen.  $n_{A(NaCl/OVA)}=5$ ,  $n_{A(OVA/OVA)}=9$ ;  $n_{B(NaCl/OVA)}=5$ ,  $n_{B(OVA/OVA)}=9$ . Mittelwert  $\pm$  SEM, Statistik durch *unpaired* t-Test: \*\* =  $p < 0,01$ .



**Abb. 54: Korrelation der EAR *in vivo* und *ex vivo* nach der Allergenprovokation**

Der Vergleich zwischen den Lungenfunktionsparametern der EAR *in vivo* (prozentualer R<sub>L</sub>-Anstieg) und *ex vivo* (max. Kontraktion) wurde mit JMP5.1 durchgeführt. Bei der „nicht parametrischen Analyse“ (Kendall's Tau b) ergab sich für die Korrelation ein p-Wert von  $< 0,01$ .

Die Entwicklung einer Hyperreagibilität der Atemwege als Reaktion auf eine Methacholin-Provokation ließ sich *in vivo* am Tag 36, 24 h nach inhalativer Allergenprovokation sehr gut darstellen (Abb. 55 A). Am Tag 42, sieben Tage nach EAR und am Tag 43, 24 h nach zweiter inhalativer Allergen- und Methacholin-Provokation wurde auch ein signifikanter Unterschied zwischen Ovalbumin-sensibilisierten und Kontrolltieren gezeigt (Abb. 55 B und C). Die

## Ergebnisse

Unterschiede zwischen Ovalbumin-sensibilisierten und Kontrolltiergruppen sind am Tag 42 und 43 deutlich geringer als am Tag 36 (Abb. 55; **A**: 0.2 µg vs. 1.3 µg Methacholin, **B**: 0.2 µg vs. 0.8 µg Methacholin, **C**: 0.3 µg vs. 0.6 µg Methacholin).

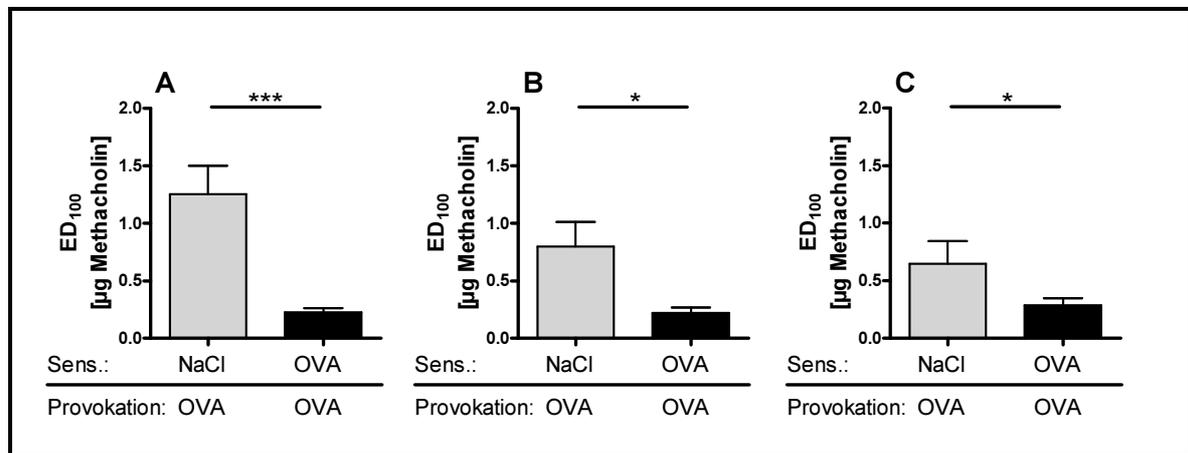
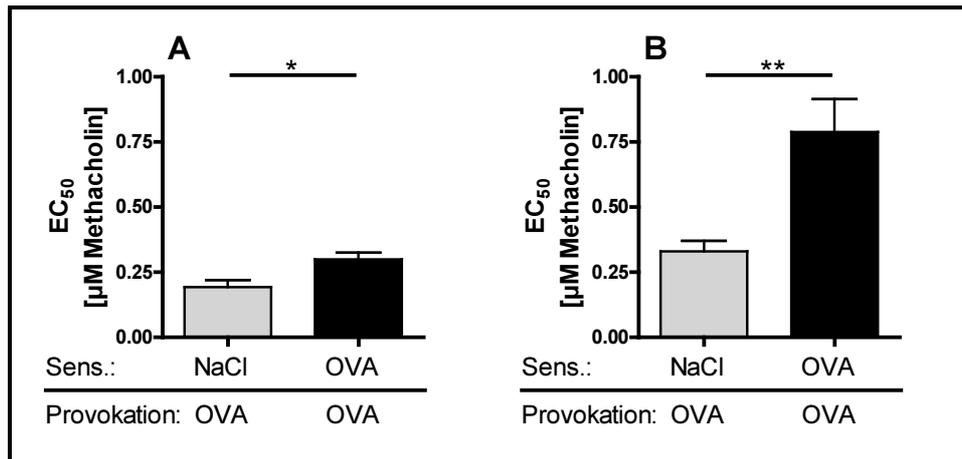


Abb. 55: *In vivo* AHR 24 h (A), sieben Tage (B) nach erster und 24 h nach zweiter inhalativer Allergenprovokation (C)

Die Hyperreagibilität der Atemwege als Reaktion auf Methacholin-Provokation an Tagen 36 (A), 42 (B) und 43 (C) ist *in vivo* als ED<sub>100</sub> (inhalative MCh-Dosis die für einen 100-%igen R<sub>L</sub>-Anstieg erforderlich ist) dargestellt.  $n_{A(NaCl/OVA)}=8$ ,  $n_{A(OVA/OVA)}=14$ ;  $n_{B(NaCl/OVA)}=5$ ,  $n_{B(OVA/OVA)}=4$ . Mittelwert ± SEM, Statistik durch *unpaired* t-Test: \* =  $p < 0,05$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

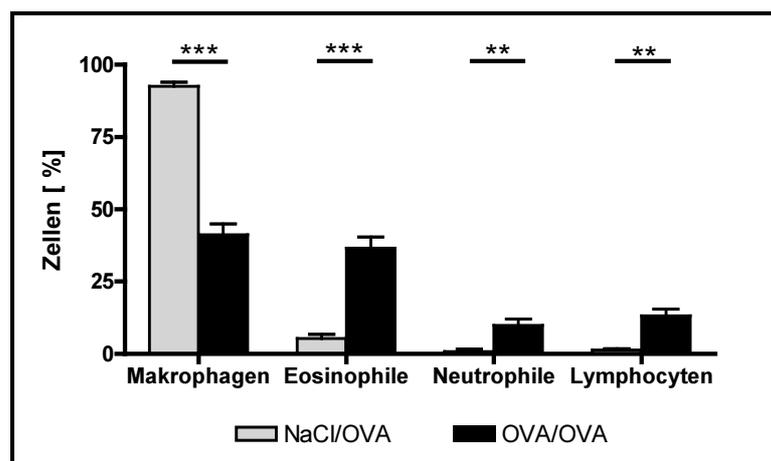
Die *in vivo* Ergebnisse für AHR (an Tagen 36, 42 und 43) ließen sich *ex vivo* nicht reproduzieren. Als Reaktion auf eine Methacholin-Provokation wurde in PCLS eine Atemwegshyporeaktivität anstelle der Atemwegshyperreaktivität, sowohl vier Stunden nach PCLS-Präparation (ohne Allergen-Restimulation) als auch 16 h nach *ex vivo* Ovalbumin-Provokation gemessen (Abb. 56). Bei der bronchialen Reaktion auf Methacholin an PCLS von sensibilisierten Tieren fiel auf, dass diese bereits vorkontrahiert waren. Diese Vorkontraktion der Atemwege war auch durch einen erhöhten Atemwegswiderstand *in vivo* sichtbar.



**Abb. 56:** *Ex vivo* AHR 4 h nach OP (A) und 16 h (B) nach Allergenprovokation

Die Hyperreagibilität der Atemwege als Reaktion auf Methacholin-Provokation am Tag 42 und 43 *ex vivo* als EC<sub>50</sub>-Werte (Hyperreagibilität der Atemwege auf MCh).  $n_{A(NaCl/OVA)}=4$ ,  $n_{A(OVA/OVA)}=8$ ;  $n_{B(NaCl/OVA)}=4$ ,  $n_{B(OVA/OVA)}=8$ . Mittelwert  $\pm$  SEM, Statistik durch *unpaired* t-Test: \* =  $p<0,05$ , \*\* =  $p<0,01$ .

Zur Bestimmung der allergischen Entzündung wurden die Lungen der Mäuse am Tag 42 (Abb. 57) und 43 (Daten nicht gezeigt) unmittelbar nach der *in vivo* Messung der MCh-Reaktion lavagiert. Es konnte gezeigt werden, dass in den Lungen von Ovalbumin-sensibilisierten Mäusen eine allergische Entzündung mit einem signifikant erhöhten Anteil von eosinophilen Zellen vorlag (Abb. 57). Neben dem Einstrom eosinophiler Zellen konnte auch ein signifikanter Anstieg im prozentualen Anteil von Neutrophilen und Lymphozyten in die BAL sensibilisierter Mäuse gezeigt werden.



**Abb. 57:** Zelldifferenzierung in BAL am Tag 42

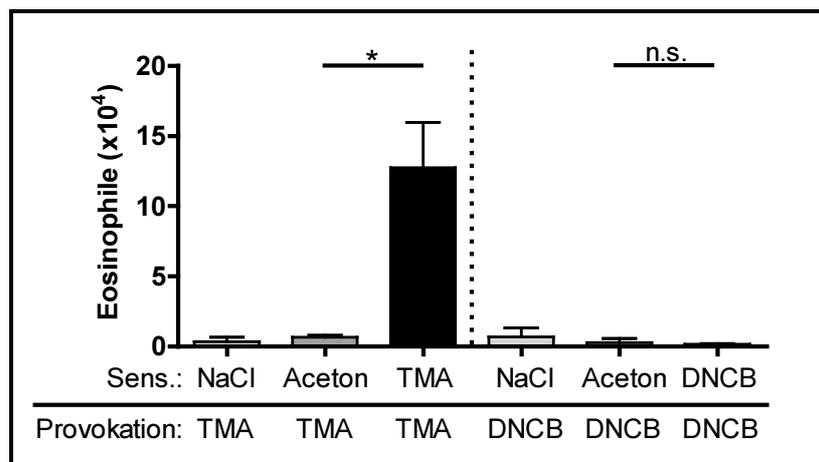
Die Lungen wurden unmittelbar nach der *In-vivo*-Lungenfunktionsmessung (24 h nach Ovalbumin-Provokation) lavagiert und die Zellen der BAL differenziert.  $n_{(NaCl/OVA)}=6$ ,  $n_{(OVA/OVA)}=10$ . Mittelwert  $\pm$  SEM, Statistik durch *unpaired* t-Test: \*\* =  $p<0.01$  und \*\*\* =  $p<0.001$ .

### 5.2.3 *In vivo* versus *ex vivo* Lungenfunktion und bronchiale Entzündung nach TMA und DNCB Sensibilisierung im Mausmodell

In dieser Studie wurde das *ex vivo* alternative Model PCLS gegen *in vivo* Lungenfunktionsmessungen an sensibilisierten BALB/c Mäusen in einem durch Industriechemikalien induzierten Allergiemodell korreliert. Hierzu wurden die Tiere mit zwei bekannten niedermolekularen Allergenen, TMA und DNCB, sensibilisiert und provoziert.

Unspezifische Atemwegsirritationen, die möglicherweise durch zu hoch dosierte Allergene ausgelöst werden, konnten im Rahmen dieser Studie durch zytotoxische Voruntersuchungen in PCLS (Abb. 28 und Abb. 31) und *in vivo* (Daten nicht gezeigt) ausgeschlossen werden.

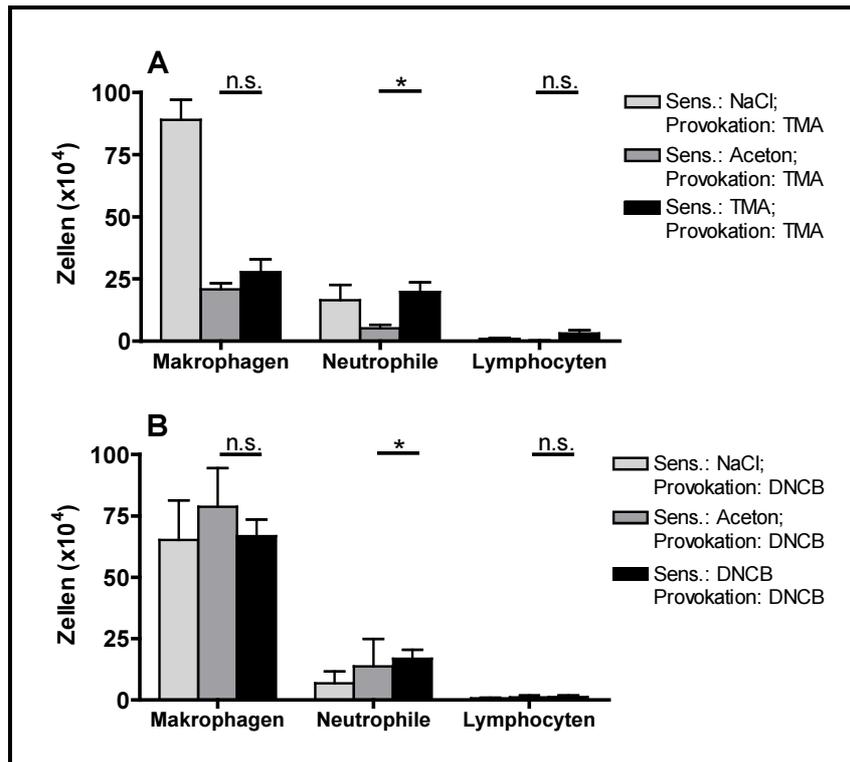
Durch Zelldifferenzierung konnte die allergische Entzündung mit signifikant erhöhter Anzahl von eosinophilen Zellen in BAL von TMA-sensibilisierten im Vergleich zu Kontrolltieren gezeigt werden (Abb. 58). In der BAL DNCB-sensibilisierter Tiere wurden keine eosinophile Zellen nachgewiesen.



**Abb. 58: Anzahl eosinophiler Zellen in BAL**

Die Lungen wurden am Tag 22 unmittelbar nach der *in vivo* Lungenfunktion lavagiert und die Zellen der BAL differenziert.  $n_{A(\text{NaCl/TMA})}=3$ ,  $n_{A(\text{Aceton/TMA})}=6$ ,  $n_{A(\text{TMA/TMA})}=12$ ,  $n_{A(\text{NaCl/DNCB})}=3$ ,  $n_{A(\text{Aceton/DNCB})}=5$ ,  $n_{A(\text{DNCB/DNCB})}=4$ . Mittelwert  $\pm$  SEM, Statistik durch *unpaired* t-Test: n.s. = nicht signifikant, \* =  $p < 0,05$ .

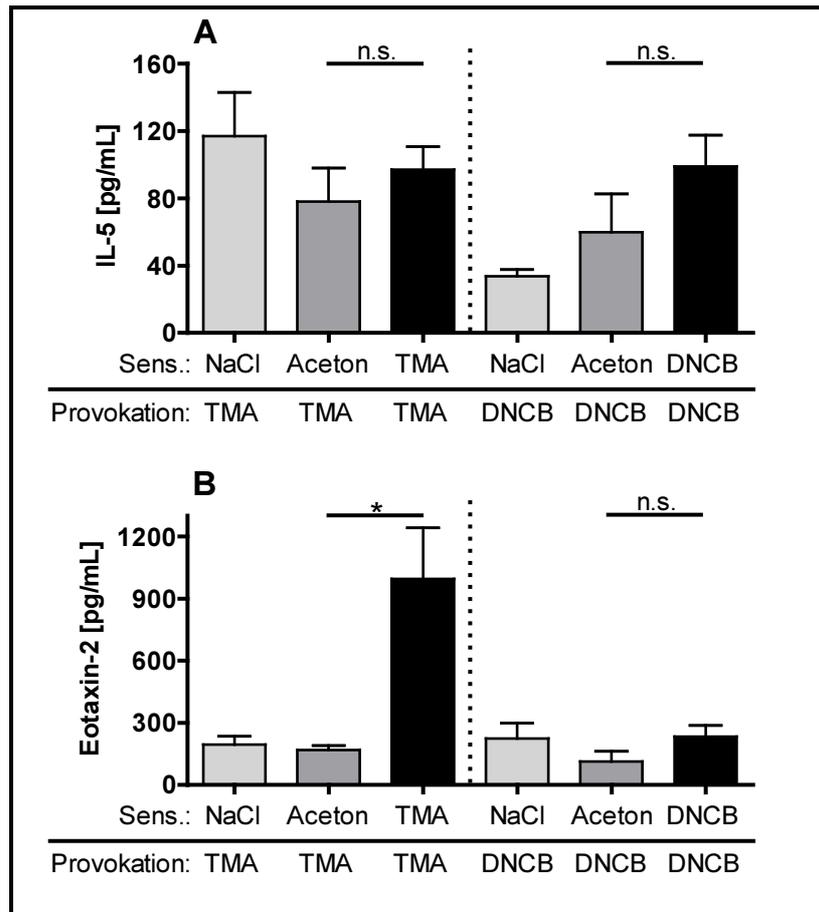
Des Weiteren wurde in der BAL TMA- und DNCB-sensibilisierter Tiergruppen eine signifikant erhöhte Anzahl von neutrophilen Zellen gefunden (Abb. 59). Die Anzahl von Makrophagen und Lymphozyten in BAL wurde durch TMA und DNCB Sensibilisierungen nicht verändert (Abb. 59).



**Abb. 59: Zelldifferenzierung in BAL 24 h nach TMA- (A) und DNCB- (B) Provokation**

Die Lungen wurden am Tag 22 unmittelbar nach der *in vivo* Lungenfunktion lavagiert.  $n_{A(\text{NaCl/TMA})}=3$ ,  $n_{A(\text{Aceton/TMA})}=6$ ,  $n_{A(\text{TMA/TMA})}=12$ ,  $n_{B(\text{NaCl/TMA})}=3$ ,  $n_{B(\text{Aceton/DNCB})}=5$ ,  $n_{B(\text{DNCB/DNCB})}=4$ . Mittelwert  $\pm$  SEM, Statistik durch *unpaired t*-Test: n.s. = nicht signifikant, \* =  $p < 0,05$ .

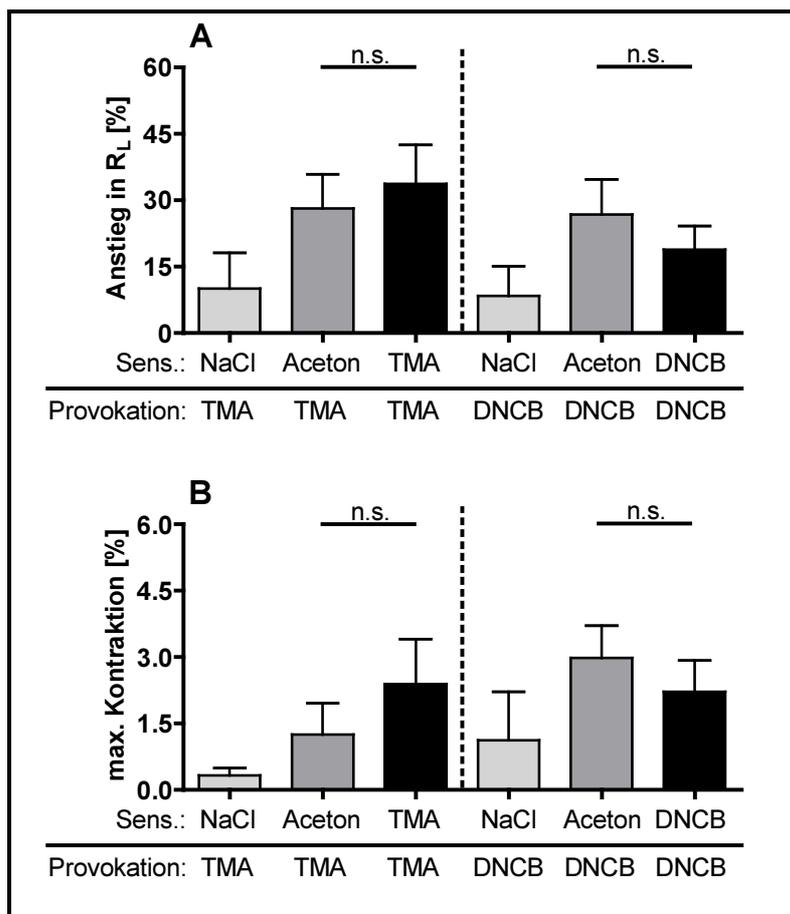
In BAL-Überständen wurden das typische Th2-Cytokin IL-5 und das auf eosinophile Zellen chemotaktisch wirkende Protein Eotaxin-2 mittels ELISA bestimmt. Die Messung von IL-5 zeigte keinen Unterschied zwischen den TMA-sensibilisierten und Kontrolltieren (Abb. 60 A). Durch die Bestimmung von Eotaxin-2 konnte ein signifikanter Unterschied zwischen TMA-sensibilisierten und (Aceton-) Kontrolltieren nachgewiesen werden (Abb. 60 B). Im BAL-Überstand DNCB-sensibilisierter Tiere konnten keine Unterschiede bezüglich IL-5 und Eotaxin-2 im Vergleich zur Acetongruppe gezeigt werden (Abb. 60 A und B).



**Abb. 60: IL-5 (A) und Eotaxin-2 (B) Konzentrationen in BAL-Überständen 24 h nach inhalativer Provokation mit TMA und DNCB**

$n_{A(\text{NaCl/TMA})}=3$ ,  $n_{A(\text{Aceton/TMA})}=6$ ,  $n_{A(\text{TMA/TMA})}=12$ ,  $n_{A(\text{NaCl/DNCB})}=3$ ,  $n_{A(\text{Aceton/DNCB})}=6$ ,  $n_{A(\text{DNCB/DNCB})}=10$ ;  $n_{B(\text{NaCl/TMA})}=5$ ,  $n_{B(\text{Aceton/TMA})}=5$ ,  $n_{B(\text{TMA/TMA})}=11$ ,  $n_{B(\text{NaCl/DNCB})}=5$ ,  $n_{B(\text{Aceton/DNCB})}=5$ ,  $n_{B(\text{DNCB/DNCB})}=10$ . Mittelwert  $\pm$  SEM, Statistik durch *unpaired* t-Test: n.s. = nicht signifikant, \* =  $p < 0,05$ .

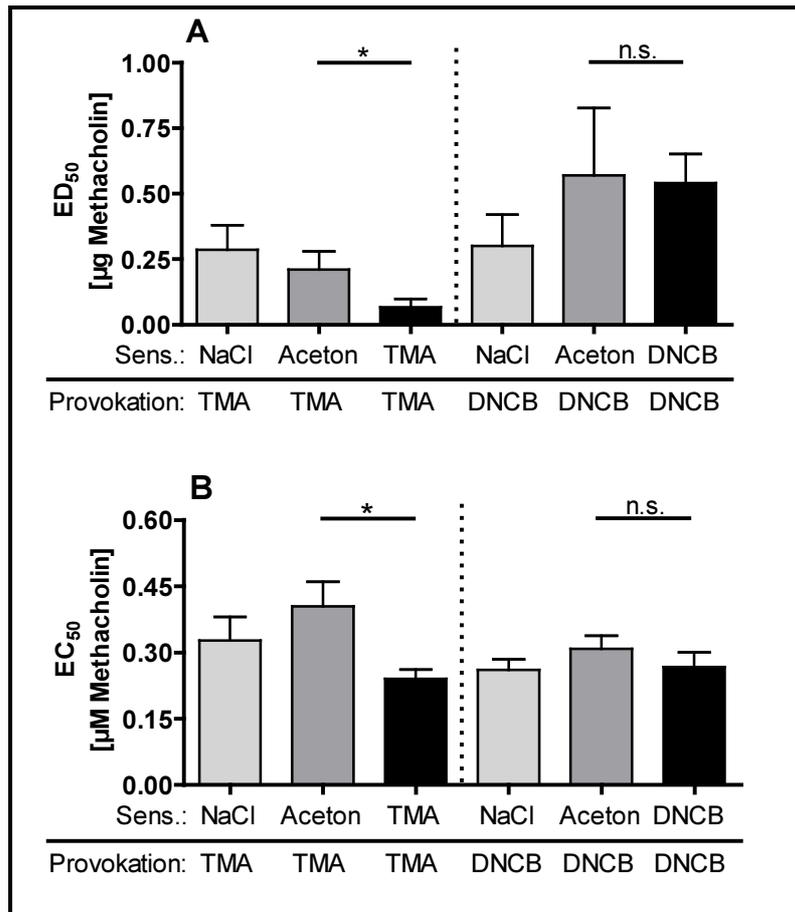
Die direkte Bronchokonstriktion als Antwort auf eine Allergenprovokation *in vivo* und *ex vivo* konnte nicht gezeigt werden (Abb. 61 A und B). Eine geringe, jedoch nicht signifikante Erhöhung des Atemwegwiderstandes war *in vivo* als Reaktion auf die inhalative TMA-Provokation in TMA-sensibilisierten Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren nachweisbar (Abb. 61 A). Die inhalative DNCB-Provokation führt dagegen zu einem höheren  $R_L$ -Anstieg bei Aceton-Kontrolltieren als bei DNCB-sensibilisierten Tieren (Abb. 61 A). In PCLS konnte im Gegensatz zu Messungen mit Ovalbumin keine allergische Frühphasenreaktion *ex vivo* gezeigt werden (Abb. 61 B). Weder DNCB noch TMA hatten einen direkten Effekt und bewirkten daher auch keine Kontraktion der Atemwege (Abb. 61 B).



**Abb. 61: *In vivo* (A) und *ex vivo* (B) EAR am Tag 21 als Reaktion auf eine Provokation mit TMA und DNCB**

Die allergische Frühphasenreaktion der Atemwege während und nach der Allergenprovokation wurde am Tag 21 *in vivo* als  $R_L$ -Anstieg und *ex vivo* als maximale Kontraktion gemessen und verglichen.  $n_{A(\text{NaCl/TMA})}=5$ ,  $n_{A(\text{Aceton/TMA})}=6$ ,  $n_{A(\text{TMA/TMA})}=12$ ,  $n_{A(\text{NaCl/DNCB})}=4$ ,  $n_{A(\text{Aceton/DNCB})}=6$ ,  $n_{A(\text{DNCB/DNCB})}=10$ ;  $n_{B(\text{NaCl/TMA})}=6$ ,  $n_{B(\text{DMSO/TMA})}=6$ ,  $n_{B(\text{TMA/TMA})}=11$ ,  $n_{B(\text{NaCl/DNCB})}=6$ ,  $n_{B(\text{DMSO/DNCB})}=6$ ,  $n_{B(\text{DNCB/DNCB})}=9$ . Mittelwert  $\pm$  SEM, Statistik durch *unpaired t*-Test: n.s. = nicht signifikant.

Die Entwicklung einer Atemwegshyperreagibilität nach Methacholin-Provokation wurde am Versuchstag 22, 24 h nach letzter Allergenprovokation, *in vivo* als  $R_L$ -Anstieg und *ex vivo* als maximale Kontraktion von Atemwegen gemessen (Abb. 62 A und B). Dabei konnte *in vivo* ein signifikanter Unterschied zwischen TMA-sensibilisierten und Kontrolltieren gezeigt werden (Abb. 62 A). Auch in PCLS wurde ein vergleichbares Ergebnis erhalten (Abb. 62 B). *In vivo* und *ex vivo* konnte kein Unterschied zwischen den DNCB-sensibilisierten und Kontrolltieren beobachtet werden (Abb. 62 A und B).



**Abb. 62: *In vivo* (A) und *ex vivo* (B) AHR am Tag 22, 24 h nach TMA bzw. DNCB Provokation**

Die Hyperreagibilität der Atemwege als Reaktion auf Methacholin-Provokation am Tag 22 ist *in vivo* als ED<sub>50</sub> (inhalative MCh-Dosis die für einen 50-%igen R<sub>L</sub>-Anstieg erforderlich ist) und *ex vivo* als EC<sub>50</sub> (die Hälfte der Konzentration, die für eine maximale Reaktion erforderlich ist) dargestellt.  $n_{A(\text{NaCl/TMA})}=5$ ,  $n_{A(\text{Aceton/TMA})}=5$ ,  $n_{A(\text{TMA/TMA})}=12$ ,  $n_{A(\text{NaCl/DNCB})}=4$ ,  $n_{A(\text{Aceton/DNCB})}=5$ ,  $n_{A(\text{DNCB/DNCB})}=10$ ;  $n_{B(\text{NaCl/TMA})}=6$ ,  $n_{B(\text{DMSO/TMA})}=6$ ,  $n_{B(\text{TMA/TMA})}=12$ ,  $n_{B(\text{NaCl/DNCB})}=6$ ,  $n_{B(\text{DMSO/DNCB})}=6$ ,  $n_{B(\text{DNCB/DNCB})}=10$ . Mittelwert  $\pm$  SEM, Statistik durch *unpaired t*-Test: n.s. = nicht signifikant, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ .

## 6 Diskussion

### 6.1 *Ex vivo* immuntoxikologische Untersuchungen in PCLS

#### 6.1.1 Charakterisierung der Zellvitalität in PCLS

Eines der Ziele dieser Arbeit stellte die Charakterisierung induzierter lokaler respiratorischer Irritationen und Inflammationen im *ex vivo* System PCLS dar. PCLS wurden dazu mit Mitogenen, synthetischen Lipopeptiden und Chemikalien exponiert. Anschließend wurde die Zytotoxizität ermittelt und die induzierte Zytokin/Chemokin-Produktion quantifiziert.

Die Grundlage bildete die zuverlässige Bestimmung der Vitalität kultivierter Lungenschnitte. Die Vitalität von Lungenschnitten wurde einerseits durch enzym-vermittelte Zytotoxizitätstests, wie Bestimmung der LDH-Aktivität und der MTT-Umsetzung in lebenden Zellen von PCLS charakterisiert. Andererseits erfolgte die Untersuchung der Vitalität durch quantitative Analyse von Fluoreszenzfärbungen mit Calcein/EthD-1.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch die Bestimmung der LDH-Aktivität in Überständen in Kombination mit der qualitativen und quantitativen 3D-Bildanalyse der Calcein/EthD-1-Färbung gezeigt werden, dass PCLS bis 24 h im serumfreien Medium ohne Mediumwechsel kultiviert werden können (Abb. 10 und Abb. 11). Dabei blieben über 80 % der Zellen in PCLS bis 24 h vital. Inkubationen von PCLS länger als 24 h (48 h und 72 h) waren durch einen signifikanten Vitalitätsverlust charakterisiert (Abb. 9 und Abb. 11).

Die Kombination von Fluoreszenzfarbstoffen, die lebende (Calcein) und tote Zellen (EthD-1) markieren, ermöglichte eine zuverlässige mikroskopische Untersuchung der PCLS-Vitalität. Dabei konnte die alveolare Struktur in den Lungenschnitten durch Calcein im Zytoplasma lebender Zellen visualisiert werden. Des Weiteren war es möglich, das Verhältnis von EthD-1-gefärbten Zellkernen (tote Zellen) zum Calcein-markierten Volumen (Zytoplasma lebender Gewebezellen) zu ermitteln. Wie in Abb. 10 gezeigt, waren Calcein- und EthD-1-gefärbte Zellen nicht doppelpositiv, d.h. EthD-1-markierte Zellkerne waren nicht von einem Calcein-gefärbten Zytoplasma umgeben.

Die Charakterisierung der PCLS-Vitalität durch LDH-Bestimmung und qualitative Analyse der Calcein/EthD-1-Färbung mittels Zweiphotonenmikroskopie wurde bereits veröffentlicht [Held *et al.*, 1999, Umachandran *et al.*, 2004, Ressmeyer *et al.*, 2006]. Einige Arbeitsgruppen charakterisierten die Vitalität von Lungenschnitten auch durch Messung der Frequenz des

Zilienschlages oder durch Bestimmung von ATP [Kurosawa *et al.*, 1995, De Kanter *et al.*, 2002].

In den Arbeiten von Umachandran *et al.* wurde übereinstimmend mit den präsentierenden Daten gezeigt, das PCLS höchstens 24 h kultiviert werden können [Umachandran *et al.*, 2004, Umachandran *et al.*, 2006]. Dabei zeigten Umachandran *et al.* (2004), dass LDH in PCLS-Überständen die Zell-Zytotoxizität nur bis etwa 24 h zuverlässig widerspiegelt [Umachandran *et al.*, 2004]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine zeitabhängige Akkumulation von LDH in PCLS-Überständen bis 48 h nachgewiesen werden. Nach 72 h wurde eine geringere LDH-Aktivität im Vergleich zum 48 h Zeitpunkt gemessen, weil die Stabilität von LDH begrenzt ist.

In bereits veröffentlichten Publikationen wurde gezeigt, dass PCLS bis 48 h vital bleiben [Held *et al.*, 1999, Ressmeyer *et al.*, 2006]. Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen nicht im Widerspruch zu diesen Publikationen, weil hierbei PCLS unter verschiedenen Bedingungen kultiviert wurden [Held *et al.*, 1999, Ressmeyer *et al.*, 2006]. Diese Arbeitsgruppe kultivierte einzelne Lungenschnitte in 1 ml Medium [Held *et al.*, 1999, Ressmeyer *et al.*, 2006]. In der vorliegenden Arbeit wurden vier PCLS in jeweils 0.5 ml Medium inkubiert. Die Inkubation von vier PCLS in 0.5 ml Medium war erforderlich, weil nur so eine detektierbare Menge von Zytokinen und Chemokinen in PCLS-Überständen akkumuliert wurde. Inkubationen mit weniger als vier PCLS in 0.5 ml Medium zeigten zu geringe Proteinmengen im PCLS-Überstand, die unter den Detektionsgrenzen im ELISA waren. Die Inkubationen mit mehr als vier PCLS in 0.5 ml Medium induzierten eine deutlich verringerte Vitalität nach 24 h (Daten nicht gezeigt).

Zur Verbesserung der Vitalität wurde eine Kultivierung von PCLS in DMEM mit zugesetztem FCS geprüft. Nach FCS-Zugabe wurde das Zellkulturmedium entweder nicht oder zweimal täglich erneuert. Ohne Mediumwechsel wurde die Zytotoxizität durch FCS-Zugabe zwischen 24-72 h nicht beeinflusst (Abb. 12 A). Bei gleichzeitiger regelmäßiger Erneuerung des Zellkulturmediums blieb die Vitalität von PCLS auch ohne FCS-Zugabe bis 48 h erhalten (Abb. 12 B). Dieses Ergebnis stimmt mit den Experimenten von Ressmeyer *et al.*, (2006), die eine unveränderte Vitalität von PCLS bis 72 h Kultivierung durch regelmäßige Erneuerungen des Zellkulturmediums erreichen konnten [Ressmeyer *et al.*, 2006]. In der vorliegenden Arbeit verhinderte die FCS-Zugabe in Kombination mit den gleichzeitigen Erneuerungen des serumreichen Mediums weitgehend die Zytotoxizität nach 72 h Kultivierung. Dabei wurde dennoch ein Vitalitätsverlust von mehr als 20 % nachgewiesen.

Das Medium wurde während den Inkubationen von PCLS im Rahmen dieser Arbeit nicht gewechselt, weil die Akkumulation von Proteinen in PCLS-Überständen erwünscht war. Entsprechend wurde dem Medium kein FCS hinzugefügt, weil ohne Mediumwechsel kein Effekt auf die Vitalität nachweisbar war (Abb. 12).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass PCLS bis zu 24 h vital bleiben. Dabei spielt es keine Rolle, ob FCS dem Medium zugesetzt wird oder nicht. Da FCS eine komplexe Mischung aus Wachstumsfaktoren und Proteinen darstellt, wurde im Hinblick auf eine spätere zuverlässige Quantifizierung von Zytokinen und Chemokinen an dieser Stelle auf FCS verzichtet. Zu diesem Zweck wurden die Lungenschnitte bis 24 h mit Substanzen inkubiert und das Medium währenddessen nicht erneuert. Eine Kultivierung von PCLS unter dem Aspekt der Untersuchung von unmittelbar ausgelösten Reaktion, wie z.B. einer *ex vivo* Bronchokonstriktion erlaubt ein Mediumwechsel und Kultivierung für länger als 24 h [Ressmeyer *et al.*, 2006].

Die Zytotoxizität von Mitogenen, synthetischen Lipopeptiden und Chemikalien wurden hauptsächlich durch LDH-Bestimmung und quantitative Analyse der Calcein/EthD-1-Färbung bestimmt.

Im Falle der Bestimmung der LDH-Aktivität wurde die erste toxische Konzentration definiert, die einen Vitalitätsverlust von mehr als 20 % induziert. Bei der Ermittlung der Chemikalien-induzierten Toxizität durch die quantitative Analyse der Calcein/EthD-1-Färbung wurde das Verhältnis von EthD-1-markierten Zellkernen im Calcein-gefärbten Gewebevolumen in Chemikalien-behandelten PCLS und den entsprechenden Kontrollen bestimmt und verglichen. Im Vergleich zu Kontrollen wurden Chemikalien-Konzentrationen, die eine höhere Anzahl toter Zellen (Anzahl EthD-1-markierter Zellkerne) im lebenden Gewebevolumen der PCLS (Calcein-gefärbtes Zytoplasma lebender Zellen) induzierten als toxisch definiert. Diese Definition wurde durch die qualitative (mikroskopische) Untersuchung dieser zytotoxischen Färbung im gesamten Lungenschnitt bestätigt oder widerlegt.

Eine Einschätzung der Zytotoxizität von TMA und DNCB auf das Lungengewebe war durch Bestimmung der LDH-Aktivität nicht möglich. Dabei zeigte sich über einen weiten Konzentrationsbereich keine Erhöhung der freigesetzten LDH-Aktivität. Möglicherweise kam es zu einer Inhibierung der LDH durch TMA und DNCB, wodurch die Funktionalität des Tests beeinträchtigt war. Diese Ergebnisse stimmen mit Daten aus einer Studie von Kending

## Diskussion

und Tarloff (2007) überein, die eine Inaktivierung von LDH im Zellkulturüberstand nach Inkubation von Zellen mit reaktiven Chemikalien, wie *para*-Aminophenol und Menadion zeigen konnten [Kendig *et al.*, 2007]. In Fällen von Chemikalien, die LDH-Bestimmung in PCLS beeinträchtigten, wurde die Vitalität von Lungenschnitten durch die qualitative und quantitative Analyse der Calcein/EthD-1-Färbung kontrolliert.

Eine Ermittlung der PCLS-Vitalität durch Messung der intrazellulären MTT-Umsetzung ist auch möglich, wie dies im Falle eines Waschmittelenzyms (Alcalase) gezeigt wurde. Alcalase wurde als Vertreter hochmolekularer Allergene zur Testung irritativer und toxischer Effekte in PCLS ausgewählt. Erste toxische Effekte des Proteins konnten in PCLS ab Konzentrationen von 65 ng/ml nachgewiesen werden. Dabei betrug der EC<sub>50</sub>-Wert für Alcalase 2.39 µg/ml, ein Wert, der nur marginal über der irritativen Grenze *in vivo* liegt. Wie damit in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist die Bestimmung toxischer und irritativer Effekte von proteolytischen Enzymen (z.B. Alcalase) *ex vivo* in PCLS möglich.

Alcalase ist eines der ersten Waschmittelenzyme, die durch Fermentationstechnik in großen Maßstäben hergestellt wurden (Novozymes, Dänemark). Bei Arbeitern der Waschmittelindustrie wurden erstmalig 1969 durch Exposition mit Waschmittelenzymen aus *Bacillus subtilis* verursachte Atemwegserkrankungen nachgewiesen [Pepys *et al.*, 1969]. Die Immunisierung von Mäusen mit dem hochmolekularen Allergen Alcalase wurden in verschiedenen Publikationen beschrieben [Kawabata *et al.*, 1996, Robinson *et al.*, 1996]. Dabei wurden die Tiere intratracheal oder intranasal mit Alcalase sensibilisiert und im Anschluss die Konzentration der Immunglobuline IgE und IgG1 im Serum gemessen. Zur Bestimmung irritativer Reaktionen wurde die Anzahl neutrophiler Zellen in BAL bestimmt und eine irritative Reaktion ab 1 µg/ml nachgewiesen [Kawabata *et al.*, 1996, Robinson *et al.*, 1996]. Durch die *ex vivo* Untersuchungen in PCLS besteht die Möglichkeit die *in vivo* Bestimmungen toxischer Dosen von proteolytischen Enzymen zu vermeiden. Im Falle von Enzymen muss allerdings auch die Enzymaktivität zusätzlich ermittelt und bei den Vergleichen zu den *in vivo* Daten berücksichtigt werden.

Eine möglichst genaue Definition und Festlegung subtoxischer Konzentrationen ist insofern sehr wichtig, da Irritationen im Gewebe meist von unspezifischen Immunreaktionen, wie z.B. Ausschüttung pro-inflammatorischer Proteine TNF $\alpha$  und IL-1 $\alpha$  begleitet sind [Newby *et al.*, 2000]. Aus diesem Grund wurden für alle verwendeten Substanzen toxische und subtoxische Konzentrationen ermittelt (Tab. 9). Eine Aussage, mit welcher Genauigkeit die toxischen *in vivo* Konzentrationen in PCLS vorherbestimmt werden können und inwieweit die EC<sub>50</sub>-Werte

mit den *in vivo* LD<sub>50</sub>-Daten korrelieren, ist noch nicht möglich. Hierzu sind Untersuchungen von zytotoxischen Effekten in PCLS und Vergleiche zu *in vivo* Daten weiterer Substanzen notwendig. Diese Untersuchungen werden im Rahmen nachfolgender Projekte angestrebt.

**Tab. 9:** Zusammenfassung toxischer Konzentrationen und EC<sub>50</sub>-Werte in PCLS.

Substanzname	EC <sub>50</sub>		toxische Konzentrationen in PCLS	
	[µg/ml]	[µM]	[µg/ml]	[µM]
<b>TMA</b>	13.7	71	> 3	> 16
<b>DNCB*</b>			> 0.75	> 3.6
<b>SDS</b>	8.86	31	> 5	> 17
<b>Formaldehyd</b>	24.3	807	> 8.75	> 291
<b>Kaliumdichromat</b>	5.81	20	> 1.9	> 6.5
<b>Alcalase</b>	2.39		> 0.065	

\* EC<sub>50</sub> (DNCB) wurde nicht berechnet, weil durch verwendete Konzentrationen nur erste toxischen Effekte erfasst waren.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass PCLS eine viel versprechende alternative Methode zum Tierversuch zur Bestimmung toxischer und irritativer Effekte von nieder- und hochmolekularen Substanzen darstellt.

## **6.1.2 Modulation von lokalen Immunreaktionen in PCLS durch bakterielle Membranbestandteile und Kortikosteroide**

### **6.1.2.1 Bakteriell-LPS vermittelte Produktion von Zytokinen und Chemokinen in PCLS**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit LPS exponierte PCLS untersucht, weil die immunstimulatorischen Eigenschaften von LPS wie auch die LPS-induzierte intrazelluläre Signalweiterleitung in Zellen von Vertebraten hinreichend bekannt sind. In diesen *ex vivo* Untersuchungen in PCLS wurde LPS unter zwei Aspekten verwendet. Zum einen erfolgte die Etablierung von funktionellen Parametern nach Exposition von PCLS mit LPS. Zum anderen wurde LPS als Maßstab für die maximale Stimulation der lokalen Immunantwort in PCLS

## Diskussion

verwendet. Dabei wurden zunächst die LPS-induzierten Änderungen der Produktion von pro-inflammatorischer Zytokinen und Chemokinen untersucht.

Die präsentierten Ergebnisse zeigen, dass eine pro-inflammatorische Reaktion von Lungengewebe auf LPS auch *ex vivo* in PCLS erfasst werden kann. Die beobachteten Reaktionen lassen sich hierbei ausschließlich auf die immunaktivierende Wirkung von LPS zurückführen, da die eingesetzten Konzentrationen nicht toxisch waren. Die LPS-induzierte akute pro-inflammatorische Reaktion in Lungenschnitten zeigte sich in einer schnellen Akkumulation pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine wie TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-5, RANTES, MCP-1, IL-8, IL-6 und MIP-1 $\beta$ .

Vor allem TNF $\alpha$  spielt eine wichtige Rolle bei entzündlichen Atemwegserkrankungen, wie z.B. Asthma oder COPD [Mukhopadhyay *et al.*, 2006]. Die präsentierten Ergebnisse stimmen auch mit Arbeiten überein, die eine Hochregulation von TNF $\alpha$ , IL-1 und IL-6 nach *in vitro* Stimulation von Monozyten und Makrophagen mit LPS zeigten [Bailly *et al.*, 1990, Mathison *et al.*, 1992].

Die zeitabhängigen Freisetzungen von TNF $\alpha$  und IL-1 $\alpha$  in PCLS wurden in zwei Diplomarbeiten, im Rahmen des gleichen Forschungsprojektes untersucht. Die TNF $\alpha$ -Freisetzung wurde durch LPS-Stimulation zeitabhängig erhöht, wobei bereits nach 4 h Inkubation signifikante Unterschiede zur Gewebekontrolle nachweisbar waren (Diplomarbeit von Simone-Monika Switalla, 2005). Im Gegensatz dazu stimulierte LPS die IL-1 $\alpha$ -Freisetzung erst nach 16 h und 24 h Inkubation signifikant zu Gewebekontrolle (Diplomarbeit von Diana Kaiser, 2006).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Freisetzung und intrazelluläre -Akkumulation mit vergleichbaren Ergebnissen in PCLS aus Maus, Ratte und Rhesusaffen nachgewiesen werden. Eine deutliche Freisetzung von IL-8, G-CSF und IL-1 $\beta$  in Pavian-PCLS konnte nach Inkubation mit LPS induziert werden.

Im Lungengewebe von einzelnen Pavianen (Donor #7 und #8) oder Rhesusaffen (Donor #2 und #3) wurde eine gewisse LPS-Resistenz nach Exposition von PCLS mit 500 ng/ml LPS nachgewiesen. Dieses Ergebnis lässt sich nicht auf einen Verlust der Vitalität der Lungenschnitte zurückführen, wie durch Messung von LDH und Calcein/EthD-1-Fluoreszenzfärbung gezeigt wurde. Die Tatsache, dass es sich bei den einzelnen Donoren um Individuen verschiedenen Alters (teilweise sehr junge Tiere mit unheilbaren Erkrankungen oder altersschwache Individuen), Geschlechts und Gesundheitszustandes handelte, könnte die

Ursache sehr variierender Immunreaktionen sein. Altersabhängige Schwankungen von Mitogen-induzierten Zytokin- und Chemokin-Freisetzungen in PBMCs von Primaten wurden bereits beschrieben und bestätigen zum Teil die Feststellungen in dieser Arbeit [Mascarucci *et al.*, 2001, Mascarucci *et al.*, 2002]. In der Arbeit von Mascarucci *et al.* (2001) wurden allerdings in PBMCs von Rhesusaffen keine altersabhängigen Effekte auf TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  nachgewiesen [Mascarucci *et al.*, 2001].

#### **6.1.2.2 Spezifische Inhibierung pro-inflammatorischer Effekte durch das Kortikosteroid Dexamethason**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Dexamethason zur Immunsuppression der lokalen Immunantwort in PCLS verwendet, weil die anti-inflammatorischen Effekte dieses Kortikosteroids sehr gut bekannt sind. Dexamethason wurde bereits in verschiedenen *in vitro* Studien zur Suppression einer Immunantwort (z.B. Suppression der Zytokinfreisetzung) verwendet [Barnes, 2006, Culpitt *et al.*, 2003]. Kortikosteroide inhibieren hauptsächlich die Expression von inflammatorischen Proteinen, beeinflussen dadurch auch teilweise den Einstrom von Entzündungszellen, wie z.B. neutrophilen und eosinophilen Zellen [Barnes, 2006].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass Dexamethason die Akkumulation inflammatorischer Zytokine und Chemokine in PCLS supprimiert. Diese *ex vivo* Daten sind entsprechend zu Arbeiten, die eine Suppression von IL-4, IL-5, GM-CSF und RANTES nach Inhalation von Kortikosteroiden *in vivo* zeigen konnten [Hart *et al.*, 2000].

Die molekulare Ursache der Kortikosteroid-induzierten Suppression ist noch nicht in allen Details geklärt und wird seit Jahren in verschiedenen Forschungsansätzen untersucht [Barnes, 2006]. Klar ist, dass durch Kortikosteroide eine Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF- $\kappa$ B und AP-1 induziert wird. Dabei binden Kortikosteroide vermutlich an Kortikosteroid-Rezeptoren (GRs) im Zytoplasma [Barnes, 2006, O' Neill, 2006]. Zytoplasmatische GRs binden üblicherweise an molekulare Chaperone, wie z.B. Hitzeschockprotein 90 und werden dadurch aktiviert [Barnes, 2006]. Anschließend binden aktivierte GRs im Zellkern an *glucocorticoid response elements* (GREs) in den Promotor-Regionen von Steroid-sensitiven Genen und aktivieren dadurch die Transkription anti-inflammatorischer Gene, wie z.B. Mitogen-aktivierte Protein Kinase Phosphatase-1 (MKP-1), I $\kappa$ B- $\alpha$  und IL-1 Rezeptor Agonisten [Barnes, 2006]. Im Zellkern lokalisierte GRs interagieren

auch mit co-aktivierenden Molekülen, wie *cAMP-response-element-binding-protein-(CREB) binding protein* (CBP), die durch NF- $\kappa$ B Transkription aktiviert werden [Barnes, 2006]. Durch die Interaktion von Kortikosteroid-aktivierten GRs mit Molekülen, die eine Transkription von NF- $\kappa$ B induzieren, wird die Aktivierung von mehreren Genen und die Expression pro-inflammatorischer Proteine wie TNF $\alpha$ , IL-1, IL-8, IL-6 und IL-5 reduziert [Barnes, 2006, Kern *et al.*, 1988, Held *et al.*, 2001, Rolfe *et al.*, 1992].

### **6.1.2.3 LPS-induzierte Hochregulation und Dexamethason-vermittelte Suppression von MHC Klasse II in lebenden Lungenschnitten**

Ein anderes kritisches Ereignis in der Initiierung einer lokalen Immunantwort durch LPS stellt die Hochregulation von Zelloberflächenmarkern in APCs dar [Weigt *et al.*, 2003]. APCs bilden in der Lunge ein Netzwerk zwischen Epithelium und *Lamina propria*, sind hier in höherer Anzahl vertreten als im Lungenparenchym und spielen eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Immunantwort auf inhalierte Allergene [Veres *et al.*, 2007].

Die phänotypische Charakterisierung und Bestimmung der Lokalisation von APCs, die auf LPS mit einer Hochregulation der Expression von Zelloberflächenmarkern im Lungenparenchym von PCLS reagierten, erfolgte durch immunhistochemische Färbung von MHC Klasse II, CD40 und CD86. Ohne LPS-Stimulation wurde in den alveolären Regionen von PCLS nur eine geringe Anzahl MHC Klasse II<sup>+</sup>-Zellen, die eine DC-ähnliche Morphologie zeigten, nachgewiesen. LPS-Stimulation induzierte in PCLS die Expression von MHC Klasse II in verschiedenen Zellpopulationen.

Zur genaueren histologischen Differenzierung MHC Klasse II<sup>+</sup>-Zellen wurden Lungenschnitte von CD11c-EYFP-transgenen Mäusen verwendet. Dabei wurde zum einen gezeigt, dass die Morphologie von CD11c<sup>+</sup>-Zellen sehr heterogen ist. Durch die immunhistochemische Färbung von MHC Klasse II konnte zum anderen eine MHC Klasse II<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup>-Zellpopulation nachgewiesen werden.

In einer veröffentlichten Studie wurde gezeigt, dass die MHC Klasse II<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup>-Zellpopulation hauptsächlich im Lungenparenchym lokalisiert ist und DCs myeloiden Ursprungs dargestellt [von Garnier *et al.*, 2005]. Myeloide DCs präsentieren Antigene und induzieren eine T-Zell-Proliferation [Ito *et al.*, 2005]. Die Zellen im Lungenparenchym, die CD11c hoch exprimieren, aber nur geringe Mengen MHC Klasse II auf ihrer Zelloberfläche aufweisen, sind langlebige Alveolarmakrophagen [von Garnier *et al.*, 2005, Fulton *et al.*,

2004]. Die Differenzierung verschiedener Zell-Subtypen erfolgte in verschiedenen Arbeiten durch quantitative durchflusszytometrische Analyse von exprimierten Zelloberflächenmarkern [Calder *et al.*, 2004, O'Keeffe *et al.*, 2003, Liu, 2001].

Im Rahmen dieser Arbeit konnten CD11c<sup>+</sup>- und MHC Klasse II<sup>+</sup>-Zellen in PCLS aufgrund ihrer Morphologie mithilfe der konfokalen Mikroskopie unterschieden werden. MHC Klasse II<sup>+</sup>-Zellen, die lange Ausläufer und einen unscheinbaren Zellkörper zeigten, wurden als DC identifiziert. Zellen, die MHC Klasse II in nicht so hohen Mengen auf ihrer Zelloberflächen exprimieren, einen runden Zellkörper haben und keine Ausläufer bilden, wurden als Alveolarmakrophagen klassifiziert. Es ist bekannt, dass erst nach einer Aktivierung mit inflammatorischen Stimulantien das Zelloberflächenprotein MHC Klasse II in DCs in höheren Mengen exprimiert wird [Cella *et al.*, 1997, Ito *et al.*, 2005]. Nach ihrer Reifung exprimieren DCs co-stimulatorische Moleküle wie CD40, CD80, CD83 und CD86 und weisen eine hohe Expression von MHC Klasse II auf [Banchereau *et al.*, 1998, Lambrecht *et al.*, 2001]. Die reifen DCs migrieren und stimulieren in lokalen Lymphknoten die Proliferation von T-Zellen [Banchereau *et al.*, 1998, Lambrecht *et al.*, 2001]. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass die CD86-Expression erst nach einer Migration zum Lymphknoten induziert wird [Banchereau *et al.*, 1998, Lambrecht *et al.*, 2001].

Da in PCLS eine Wanderung von DCs in die lokalen Lymphknoten nicht möglich ist, konnte eine Expression von Corezeptoren, wie CD86 und CD40 nach Inkubation mit LPS nicht nachgewiesen werden. Zum Nachweis der Expression von CD86 wurden die PCLS mit Ovalbumin-spezifischen CD4<sup>+</sup>-Zellen aus DO11.10 Mäusen co-kultiviert. Die Stimulation dieser Co-Kultur mit Ovalbumin induzierte eine hochregulierte CD86-Expression in PCLS. Dabei exprimierten auch Zellen, die im Lungenparenchym lokalisiert sind CD86 auf ihrer Oberfläche. Durch eine immunhistochemische Färbung der Lungenschnitte mit Antikörpern gegen MHC Klasse II und CD86 wurde eine Co-Expression dieser Zelloberflächenmarker nachgewiesen. Es wurde festgestellt, dass Zellen in PCLS, die geringe Mengen MHC Klasse II exprimieren auch nur geringe Mengen CD86 aufweisen. Der Nachweis einer Co-Expression von MHC Klasse II und CD86 gelang nur in PCLS, die mit Ovalbumin-spezifischen CD4<sup>+</sup>-Zellen und dem Allergen Ovalbumin inkubiert waren. Durch Zugabe von LPS wurde die CD86-Expression nicht weiter hochreguliert. Eine Suppression dieser Ovalbumin-induzierten CD86-Expression konnte durch Dexamethason erreicht werden. Die Expression des Zelloberflächenmarkers CD86 ist in diesem Versuchansatz möglich gewesen, weil hierbei die antigenspezifische Interaktion zwischen APCs und T-Zellen induziert wurde.

## Diskussion

Dabei wurde eine Aufnahme des Antigens (Ovalbumin) durch APCs in PCLS, die Antigenpresentation und Interaktion des aus MHC Klasse II und Antigenpeptids bestehenden Komplexes auf APCs mit dem antigenspezifischen TCR auf den Ovalbumin-spezifischen T-Zellen induziert. Im Rahmen dieser Interaktionen mit antigenspezifischen T-Zellen exprimierten APCs in PCLS den Corezeptor CD86.

Zudem konnte eine Freisetzung von IL-2 nachgewiesen werden. IL-2 wird von aktivierten T-Zellen freigesetzt [Burchill *et al.*, 2007]. Es ist bekannt, dass die Bindung von IL-2 an IL-2 Rezeptor (IL-2R) einen bedeutenden Faktor bei der Induktion der *in vitro* T-Zell-Proliferation darstellt [Burchill *et al.*, 2007]. *In vivo* konnte in den letzten Jahren nachgewiesen werden, dass IL-2 und die IL-2R $\beta$ -abhängige Signaltransduktion eine Schlüsselrolle in der Entwicklung und der Homöostase regulatorischer T-Zellen spielen [Burchill *et al.*, 2007].

Die Freisetzung von IL-2 durch Ovalbumin-spezifische CD4<sup>+</sup>-Zellen konnte in dieser Arbeit durch Dexamethason inhibiert werden. Eine der möglichen Erklärungen für diese Inhibition ist, dass in erster Linie die Expression von Zelloberflächenmarkern, wie MHC Klasse II und CD86 inhibiert wird, wie in Abb. 40, Abb. 41 und Abb. 43 gezeigt wurde. In Folge dessen wäre die T-Zell-Aktivierung und damit auch die IL-2-Freisetzung verhindert. Indem Dexamethason nicht nachträglich zu den Versuchansätzen hinzugefügt wurde, sondern die Co-Kultur mit Ovalbumin und Dexamethason co-inkubiert wurde, ist dies auch die wahrscheinlichste Möglichkeit. Diese Hypothese wird durch bereits veröffentlichte Arbeiten gestützt, in denen eine Dexamethason-vermittelte Suppression von MHC Klasse II in humanen Zellen und MHC Klasse II, CD86 und CD40 in murinen DCs beschrieben wurde [Schwiebert *et al.*, 1995, Pan *et al.*, 2001].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die lokale Immunantwort in PCLS durch LPS stimuliert und Kortikosteroid Dexamethason supprimiert werden konnte. Eine ausgeprägte LPS-induzierte Akkumulation von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, wie TNF $\alpha$  konnte in Maus-, Ratte- und Primate-PCLS nachgewiesen werden. In Maus-PCLS war es auch möglich, eine LPS-induzierte Expression von MHC Klasse II mikroskopisch zu detektieren. Die LPS-induzierten Effekte in PCLS konnten durch Dexamethason inhibiert werden. In Lungenschnitten können die DCs nicht zum Lymphknoten wandern, weil kein intaktes lymphatisches System mehr vorliegt. In einem artifiziiellen System, wie in einer Co-Kultur von PCLS mit antigenspezifischen T-Zellen und

nach einer Stimulation mit dem Antigen, war dennoch der Nachweis einer Interaktion von DC mit T-Zellen möglich. Dabei zeigte sich eine Expression des Corezeptors CD86 im Lungengewebe von PCLS.

#### **6.1.2.4 Bakterielle Lipopeptid-Derivate MALP-2 und BppCysMPEG als Auslöser einer Immunantwort in PCLS**

Lipopeptide und Proteoglycane grampositiver Bakterien stellen PAMPs-Agonisten, die wie LPS eine TLR vermittelte angeborene Immunabwehr auslösen können. MALP-2 und das von MALP-2 abgeleitete Konjugat BppCysMPEG stellen PAMP-Agonisten dar, die Signaltransduktionskaskaden über TLR 2/6 induzieren. MALP-2 wurde ursprünglich aus einem Klon von *Mycoplasma fermentas* isoliert und stellt den N-terminalen Teil von Lipoproteinen in der Zellmembran dieser gram-positiven Bakterien dar. Die, in dieser Arbeit verwendeten Lipopeptide MALP-2 und BppCysMPEG wurden synthetisch im GBF Braunschweig (Prof. Mühlrad, Prof. Guzman) hergestellt. Eine Kontamination von MALP-2 und BppCysMPEG wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Bestimmung des Endotoxingehaltes mittels Endotoxintests („Limulus“) ausgeschlossen.

In dieser Arbeit konnte nach einer Co-Inkubation von PCLS mit PAMP-Agonisten MALP-2 und IFN $\gamma$  die Induktion der Zytokin- und Chemokin-Produktion nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu bereits veröffentlichten *in vivo* und *in vitro* Studien konnten in PCLS keine oder nur geringfügige Effekte von MALP-2 auf TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-5, IL-12(p40), G-CSF, RANTES und Eotaxin ohne gleichzeitige Zugabe von IFN $\gamma$  nachgewiesen werden. In humanen Monozyten wurde dagegen bereits allein durch MALP-2 die Freisetzung von TNF $\alpha$ , IL-1, IL-8, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  induziert [Kaufmann *et al.*, 1999]. In PCLS wurde die Produktion von TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-12(p40) und RANTES nur nach einer Stimulation mit MALP-2 in Kombination mit IFN $\gamma$  induziert. Ähnliche Effekte wurden in einem *in vitro* Allergie-Modell festgestellt [Weigt *et al.*, 2004]. Dabei wurde in Co-Kultur von Allergen-stimulierten DCs mit autologen Lymphozyten die Reifung von DCs und die assoziierte TNF $\alpha$  und IL-12(p40)-Freisetzung nur dann nachgewiesen, wenn die unreifen DCs mit MALP-2 in Kombination mit IFN $\gamma$  vorbehandelt wurden [Weigt *et al.*, 2004].

Die präsentierten Daten zeigen, dass IFN $\gamma$  allein eine deutlich geringere Freisetzung von IL-12(p40) und RANTES induziert als in Kombination mit MALP-2. Die molekulare Ursache für diesen Synergismus zwischen MALP-2 und IFN $\gamma$  ist unklar. Eine Tatsache ist, dass

MALP-2 und IFN $\gamma$  zusammen eine ausgeprägte Aktivierung von APCs induzieren. Dies führt zu der Annahme, dass Aktivierung des IFN $\gamma$ -Rezeptors möglicherweise die Expression des TLR 2/6 stimuliert und dadurch das TLR 2/6-Signal amplifiziert wird. In einer Studie von Dalpke *et al.* (2003) wurde eine Kreuzreaktion zwischen TLR und IFN $\gamma$ -Rezeptor induzierten Signalwegen nachgewiesen [Dalpke *et al.*, 2003]. Dabei wurden die IFN $\gamma$  Signale durch eine Co-Stimulation mit TLR Agonisten CpG-Oligodeoxynukleotiden, LPS und lipoteichonische Säuren amplifiziert [Dalpke *et al.*, 2003]. Die Hypothese ist, dass das Hauptereignis im IFN $\gamma$ -Signalweg die Phosphorylierung von STAT1 bei diesem molekularen Mechanismus eine bedeutende Rolle spielt. Die Ergebnisse dieser Publikation [Dalpke *et al.*, 2003] erklären die nachgewiesenen Effekte durch Co-Stimulation mit MALP-2 und IFN $\gamma$  in PCLS.

BppCysMPEG wurde durch Kombination von MALP-2 mit Polyethylenglycol (PEG) synthetisch hergestellt. Die pro-inflammatorische Wirkungen von BppCysMPEG wurden auf Zytokine und Chemokine in PCLS untersucht. BppCysMPEG induzierte bereits in sehr geringen Konzentrationen ab 5 ng/ml in PCLS erste zytotoxische Schäden des Lungengewebes. In nicht-toxischen Konzentrationen induzierte BppCysMPEG ohne Zugabe von IFN $\gamma$  die Synthese und Sekretion von TNF $\alpha$  und IL-1 $\alpha$ . Durch 5 ng/ml BppCysMPEG wurde die Freisetzung von IL-12(p40) induziert. Dies entspricht den beschriebenen Wirkungen von MALP-2 auf Zytokine und Chemokine in Monozyten [Kaufmann *et al.*, 1999].

Die Wirkung der synthetischen Lipopeptide MALP-2 und BppCysMPEG sind *in vivo* in veröffentlichten Berichten sehr ähnlich. So wurde z.B. in einem akuten, Ovalbumin-induzierten Asthamodell die Reduktion einer Th2-vermittelten Immunantwort durch intranasale Applikation von MALP-2 und IFN $\gamma$  nachgewiesen [Weigt *et al.*, 2005]. In einem chronischen Graspollen-Allergiemodell konnte neulich gezeigt werden, dass BppCysMPEG in Kombination mit IFN $\gamma$  die Th2-vermittelte Inflammation in der Lunge und die Atemwegshypersensitivität auf MCh inhibiert [Basinski *et al.*, 2007]. In beiden *in vivo* Asthamodellen löste die Behandlung mit Lipopeptiden in Kombination mit IFN $\gamma$  eine Suppression Th2-induzierter und Induktion Th1-vermittelter lokaler Immunreaktionen (z.B. erhöhte Konzentration von Th1-Zytokinen in BAL) aus. Aus diesen Gründen sind MALP-2 und BppCysMPEG als Adjuvantien in Impfstoffen und Medikamenten für allergenspezifische Immuntherapien gut geeignet. Der Vorteil von BppCysMPEG im Vergleich zu MALP-2 ist

die höhere Stabilität, bessere Wasserlöslichkeit und niedrigere Produktionskosten [persönliche Kommunikation mit Prof. Guzman, GBF Braunschweig].

### 6.1.3 Bekannte Allergene induzieren Irritation und Inflammation in PCLS

Chemikalien-induzierte Erkrankungen des respiratorischen Traktes, wie allergisches *Asthma bronchiale* werden häufig am Arbeitsplatz beobachtet. Es ist bekannt, dass industrielle niedermolekulare organische Chemikalien, wie Isocyanate (z.B. Toluol Isocyanat) und Säureanhydride (z.B. TMA) respiratorische Allergien oder berufsbedingtes Asthma bei Menschen auszulösen [Baur *et al.*, 1995, Tee *et al.*, 1998, Zeiss *et al.*, 1977].

Chemikalien-induziertes Asthma wird durch Bestimmung des IgE-Levels im Serum und Untersuchung allergenspezifischer oder durch MCh-induzierter Änderungen der Lungenfunktion diagnostiziert. Einige Chemikalien (z.B. Formaldehyd) verursachen selbst keine respiratorische Allergie, aber verstärken bereits vorliegende chronische Entzündungen des respiratorischen Traktes. Die Reihe von Chemikalien, die allergische Kontaktdermatitis auslösen, ist ebenfalls sehr lang. So ist bekannt, dass organische Substanzen (z.B. DNCB), Formaldehyd und anorganische Salze (z.B. Kaliumdichromat oder Nickelsalze) eine Kontaktallergie auslösen können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Freisetzung und Akkumulation pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine nach der Exposition von PCLS mit verschiedenen Chemikalien untersucht. Dabei wurde unter der Beachtung toxisch wirkender Konzentrationen (Tab. 9) der Unterschied zwischen spezifischen und irritativen Effekten auf die lokale Inflammation in PCLS ermittelt. Des Weiteren wurde untersucht, inwieweit respiratorische und Kontaktallergene unterschiedliche lokale Immunreaktionen in PCLS aus Lungen nicht-immunisierter Tiere induzieren. Dabei wurden niedermolekulare Chemikalien (z.B. Säureanhydride, Halogenaromate, anorganische Salze) gewählt, deren Eigenschaften bereits gut bekannt sind.

Es ist bekannt, dass das Säureanhydrid TMA eine respiratorische Allergie und das Halogenaromat DNCB eine allergische Kontaktdermatitis bei Menschen auslöst. Die Chemikalien TMA und DNCB werden häufig zur Differenzierung von respiratorischen und Kontaktallergenen in verschiedenen *in vivo* und *in vitro* Modellen verwendet [Dearman *et al.*, 1998, Hayashi *et al.*, 2001, Vandbriel *et al.*, 2000, Dearman *et al.*, 1999] und wurden für die Untersuchung lokaler Irritationen und Inflammation in PCLS als Referenzsubstanzen gewählt.

## Diskussion

TMA induzierte extrazellulär im nicht-toxischen Bereich einen konzentrationsabhängigen Anstieg von  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\alpha$  und  $\text{MIP-1}\beta$ . Dabei wurden die extrazellulären Proteinkonzentrationen um weniger als 50  $\mu\text{g/ml}$  im Vergleich zu DMSO-Kontrolle erhöht. Die Ergebnisse stimmen mit Studien überein, die eine Freisetzung von  $\text{IL-1}\alpha$  durch Allergene und irritativ wirkende Substanzen, wie SDS in Überständen von Gewebekulturen (*human skin equivalents*) induzieren konnten [Spiekstra *et al.*, 2005, Faller *et al.*, 2002]. Dabei wurde im nicht toxischen Konzentrationsbereich auch nur eine geringfügige Änderung der  $\text{IL-1}\alpha$  Freisetzung nachgewiesen [Spiekstra *et al.*, 2005, Faller *et al.*, 2002]. In murinen Keratinozyten wurde ebenfalls gezeigt, dass erst toxische Konzentrationen von Tributyltin (bewirkt Hautirritationen) eine signifikant erhöhte Freisetzung von  $\text{IL-1}\alpha$  induzieren [Corsini *et al.*, 1996].

In PCLS konnten im Vergleich zu TMA durch DNCB geringere Effekte auf  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\alpha$  und  $\text{MIP-1}\beta$  festgestellt werden. In einer humanen Monozyten Zelllinie (THP-1) wurde allerdings durch Verwendung von 1  $\mu\text{g/ml}$  und 3  $\mu\text{g/ml}$  DNCB (in 0.1 % DMSO) ein stimulierender Effekt auf CD86, CD54 und HLA-DR gezeigt [Yoshida *et al.*, 2003].

Die einzigen Unterschiede zwischen dem respiratorischen Allergen TMA zum Kontaktallergen DNCB lagen in einer geringfügigen konzentrationsabhängigen Freisetzung von  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\alpha$  und  $\text{MIP-1}\beta$  durch TMA, wie auch in erhöhten intrazellulären Konzentrationen dieser Proteine durch die toxische TMA-Konzentration. Das bestätigt die Theorie, dass frühe Immunreaktionen auf allergene Chemikalien durch ähnliche Zytokinmuster gekennzeichnet sind und hierbei eine Differenzierung zwischen respiratorischen und Kontaktallergenen nicht möglich ist [Dearman *et al.*, 2002].

Zur Differenzierung allergeninduzierter und irritativer Effekte in PCLS wurde das nicht-sensibilisierende anionische Detergenz SDS als Negativkontrolle verwendet. Sensibilisierungen des Menschen mit SDS sind nicht bekannt. SDS zeigte in PCLS zytotoxische Effekte ab 10  $\mu\text{g/ml}$  (Tab. 9). Dabei wurde die  $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung weder durch nicht-toxische noch durch toxische SDS-Konzentrationen beeinflusst. Nicht toxische Konzentrationen von SDS lösten in PCLS keine  $\text{IL-1}\alpha$ - und  $\text{MIP-1}\beta$ -Freisetzung aus, aber induzierten konzentrationsabhängige Akkumulation von  $\text{TNF}\alpha$ . Die toxische Konzentration 50  $\mu\text{g/ml}$  SDS bewirkte eine erhöhte Freisetzung von  $\text{IL-1}\alpha$  um 80 % und von  $\text{MIP-1}\beta$  um 29 %.

Ähnliche Resultate wurden von Newby *et al.* (2000) veröffentlicht [Newby *et al.*, 2000]. Dabei untersuchte diese Arbeitsgruppe die Effekte von verschiedenen Phenolen und SDS auf die Freisetzung von IL-1 $\alpha$  und TNF $\alpha$  in normalen humanen epidermalen Keratinozyten [Newby *et al.*, 2000]. Sie konnten zeigen, dass toxische Konzentrationen von Phenol und SDS eine signifikante IL-1 $\alpha$ -Freisetzung induzieren und die TNF $\alpha$ -Ausschüttung nicht beeinflussen [Newby *et al.*, 2000]. Bei einer erhöhten IL-1 $\alpha$ -Konzentration im Zellkulturüberstand konnten Newby *et al.* (2000) eine Induktion der Chemokin-Produktion nachweisen [Newby *et al.*, 2000], was möglicherweise auch die Ursache für die erhöhte und mit IL-1 $\alpha$ -Produktion assoziierte MIP-1 $\beta$  Freisetzung in PCLS nach Exposition mit 50  $\mu$ g/ml SDS war.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Unterschiede im Zytokinprofil zwischen TMA, DNCB und SDS durch Bestimmung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  in PCLS nicht eindeutig (signifikant) erfasst werden konnten. Basierend auf der Freisetzung von TNF $\alpha$  können tendenziell Unterschiede nachgewiesen werden, denn nur TMA induzierte eine konzentrationsabhängige TNF $\alpha$ -Freisetzung unter der toxischen Grenze. Ähnliches wurde dagegen für DNCB und SDS nicht gefunden.

Aus diesen Gründen wurden die Untersuchungen von Zytokinen in PCLS auf TNF $\alpha$  fokussiert. Die Freisetzung von Zytokinen ist jedoch von zu vielen verschiedenen Faktoren abhängig, wie Inkubationsdauer, Temperaturstabilität des Proteins und Chemikalieneinflüsse, was die genaue Differenzierung zwischen spezifischen und unspezifischen Reaktionen gewissermaßen erschwert.

Um einer Erklärung für TMA-, DNCB- und SDS-induzierte Effekte näher zu kommen, wurden die PCLS aus Rattenlungen mit zwei weiteren bekannten Allergenen Formaldehyd und Kaliumdichromat inkubiert und deren Effekte auf TNF $\alpha$  untersucht.

Formaldehyd induzierte in PCLS eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität und im toxischen Konzentrationsbereich eine erhöhte TNF $\alpha$ -Produktion. Nicht-toxische Konzentrationen von Formaldehyd zeigten keinen Effekt auf TNF $\alpha$ . Im Vergleich zu den Untersuchungen von PCLS mit TMA, DNCB und SDS kann die Wirkung von Formaldehyd als Kontaktallergen bestätigt werden, weil diese Substanz im nicht-toxischen Konzentrationsbereich die Freisetzung von TNF $\alpha$  nicht beeinflusste. Diese Feststellung stimmt mit veröffentlichten Ergebnissen überein, die eine Induktion der Th1-vermittelten Immunreaktion (z.B. im LLNA) zeigten [Hilton *et al.*, 1996, Dearman *et al.*, 1999].

## Diskussion

Formaldehyd wird industriell bei Plastik- und Gummiherstellung verwendet und wird häufig Desinfektionsmitteln zugesetzt. Die Einstufung von Formaldehyd als respiratorisches oder Kontaktallergen ist seit Jahren umstritten. Es wurden einzelne Fälle von berufsbedingtem Formaldehyd-induzierten Asthma veröffentlicht [Grammer *et al.*, 1993, Kim *et al.*, 2001]. Dabei konnte Formaldehyd-spezifisches IgE im Serum [Grammer *et al.*, 1992] der Patienten und eine Veränderung der Lungenfunktion nach inhalativer Provokation [Kim *et al.*, 2001] nachgewiesen werden. Die Autoren selbst zweifelten an der Existenz von Formaldehyd-induziertem Asthma, weil bei den beschriebenen Fällen erhöhte IgE-Levels mit einer Änderung der Lungenfunktion nicht einhergehen [Grammer *et al.*, 1992]. In einem neueren Fallreport wurde Formaldehyd als Kontaktallergen eingestuft [Geier *et al.*, 2008].

Die Exposition von PCLS mit dem anorganischen Metallsalz Kaliumdichromat, was bei der Farben-Herstellung wie auch bei der Leder-Gerbung verwendet wird, induzierte eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität. Das sechswertige Chrom wird in Lösung schnell zum dreiwertigen Chrom reduziert. Diese Reduktion spielt eine entscheidende Rolle bei der Induktion von oxidativem Stress, DNA-Denaturierung und apoptotischem Zelltod [Wang *et al.*, 2006].

Die Freisetzung des pro-inflammatorischen Zytokins TNF $\alpha$  wurde in PCLS durch subtoxische Kaliumdichromat-Konzentrationen nicht beeinflusst, was mit Ergebnissen nach der Exposition von PCLS mit den Kontaktallergenen DNCB und Formaldehyd übereinstimmt. Diese Untersuchungen von Effekten in PCLS weisen darauf hin, das Kaliumdichromat als Kontaktallergen identifiziert werden kann. Dagegen konnte in einer veröffentlichten Studie in DCs durch das dreiwertige oder sechswertige Chrom ein signifikanter Anstieg der CD83 Expression, wie dies durch das Kontaktallergen NiSO $_4$  induziert wird, nicht nachgewiesen werden [Toebak *et al.*, 2006]. Im LLNA wurde jedoch gezeigt, dass Kaliumdichromat typische Immunreaktionen eines Kontaktallergens induziert [Basketter *et al.*, 1993, Hariya *et al.*, 1999].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass im Vergleich zu Stimulationen mit starken Immunaktivatoren (z.B. LPS) die induzierten Freisetzungen und Akkumulationen von Zytokinen und Chemokinen nach Exposition mit Allergenen relativ gering waren, was allerdings mit verschiedenen Literaturdaten übereinstimmt [Newby *et al.*, 2000, Spiekstra *et al.*, 2005, Faller *et al.*, 2002]. Aus diesem Grund können zwischen den mit Allergenen exponierten PCLS und entsprechenden Kontrollen bezüglich Zytokin- und Chemokin-Freisetzung keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Die Bestimmung

irritativer Effekte auf die Freisetzung und die Akkumulation pro-inflammatorischer ist in PCLS übereinstimmend mit veröffentlichten *in vitro* und *ex vivo* Untersuchungen [Newby *et al.*, 2000, Spiekstra *et al.*, 2005, Faller *et al.*, 2002] möglich. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Bestimmung der TNF $\alpha$  Freisetzung in PCLS einen viel versprechenden Ansatz zu Differenzierung zwischen respiratorischen und Kontaktallergenen darstellt.

## **6.2 Lungenfunktionsänderungen *ex vivo* in PCLS versus *in vivo* nach Sensibilisierung mit hoch- und niedermolekularen Allergenen**

Die Pathogenese des allergischen Asthmas und dessen therapeutische Intervention werden derzeit vor allem in Tierversuchen untersucht. Dabei kommen besonders Modelle in Maus und Ratte zum Einsatz, die einen Teil der Symptome des allergischen Asthmas widerspiegeln und mit lungenphysiologischen, immunologischen und histologischen Parametern erfasst werden. Eines der typischen Symptome für Asthma, die Bronchokonstriktion großer Atemwege bis in die feinen Bronchiolen kann nicht nur *in vivo* im Tiermodell ausgelöst werden, sondern lässt sich auch *ex vivo* in PCLS darstellen [Wohlsen *et al.*, 2001, Wohlsen *et al.*, 2003].

Eines der Ziele dieser Arbeit stellte die Etablierung von PCLS zur Messung der *ex vivo* Bronchokonstriktion im Vergleich zu invasiver *in vivo* Lungenfunktionsmessung dar. Diese Arbeiten wurden im Rahmen des BMBF-Projektes „Vermeidung von *in vivo* Lungenfunktionsmessungen in pharmakologischen und toxikologischen Untersuchungen“ in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Uhlig (RWTH Aachen, ehemals Forschungszentrum Borstel) durchgeführt.

### **6.2.1 Funktionalität des *ex vivo* Systems im Vergleich zu standardisierten *in vivo* Lungenfunktionsmessungen**

Eine bronchiale Entzündung in BN Ratten und BALB/c Mäusen mit begleitender Veränderung der Lungenfunktion wurde *in vivo* und *ex vivo* durch Sensibilisierung mit Ovalbumin nach bereits beschriebenen Protokollen [Glaab *et al.*, 2006, Nassenstein *et al.*, 2006] ausgelöst. Diese war charakterisiert durch signifikant erhöhte Anzahl eosinophiler Zellen in BAL, allergenspezifische und unspezifische (als Reaktion auf MCh, ACh und Adenosin) *in vivo* und *ex vivo* Bronchokonstriktion.

## Diskussion

Die endogene Eosinophilie kann bei BN Ratten unterschiedlich stark ausgeprägt auftreten [Germann *et al.*, 1998]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in den BN Ratten eine hohe initiale Eosinophilie festgestellt, die die Unterschiede in den Parametern EAR und AHR zwischen sensibilisierten und Kontrolltiergruppen in einigen Fällen verringerte. Trotz dieser Problematik wurden die Studien mit BN Ratten durchgeführt, weil dieser Zuchtstamm am häufigsten in toxikologischen und pharmakologischen Untersuchungen verwendet wird [Pauluhn *et al.*, 2002, Arts *et al.*, 1998, Zhang *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2006].

In aktiv mit Ovalbumin immunisierten BN Ratten und PCLS von diesen Tieren konnten EAR und AHR *in vivo* und *ex vivo* mit vergleichbaren Ergebnissen erfasst werden. Dabei wurde die EAR *in vivo* und *ex vivo* nach der Sensibilisierung des respiratorischen Traktes als Reaktion auf Ovalbumin-Provokation untersucht. Diese *in vivo* Daten stimmen mit Ergebnissen aus bereits veröffentlichten Arbeiten überein [Glaab *et al.*, 2006]. Die Korrelation der EAR *in vivo* versus *ex vivo* (Abb. 47) bestätigt die Vergleichbarkeit beider Methoden zur Untersuchung allergenspezifischer Änderungen der Lungenfunktion.

Die unspezifische Bronchokonstriktion konnte *ex vivo* und *in vivo* durch ACh, 24 h nach Allergenprovokation, ausgelöst werden. In PCLS aus aktiv sensibilisierten Ratten wurde hier erstmalig eine Ovalbumin- und Acetylcholin-induzierte *ex vivo* Bronchokonstriktion nachgewiesen. Eine unspezifische *ex vivo* Bronchokonstriktion als Reaktion auf MCh wurde bereits 1996 in PCLS aus nicht-sensibilisierten Mauslungen nachgewiesen [Martin *et al.*, 1996].

Eine Bronchokonstriktion als Reaktion auf Adenosin konnte in dieser Arbeit *in vivo* nur drei Stunden nach der inhalativer Ovalbumin-Provokation durch intervenöse Applikation verursacht werden. *Ex vivo* wurde eine Atemwegsreaktion auf Adenosin auch 24 h nach Allergenprovokation mit vergleichbaren Ergebnissen nachgewiesen. Die Untersuchung der Hyperreagibilität mit Adenosin wird häufig als Endpunkt in pharmakologischen Tierstudien verwendet [Hannon *et al.*, 2001]. Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit den veröffentlichten *in vivo* Daten überein [Hannon *et al.*, 2001].

Weiterhin zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass im Ovalbumin-induzierten Rattenmodell die *in vivo* Untersuchung der AHR durch *ex vivo* Messung der Bronchokonstriktion ersetzt werden kann.

Das Ovalbumin-induzierte allergische Asthmadmodell der Ratte wurde auf BALB/c Mäuse übertragen. Dabei wurde eine bronchiale Inflammation im Mausmodell für *Asthma bronchiale*

durch die Sensibilisierung der BALB/c Mäuse mit Ovalbumin nach bereits beschriebenen Protokollen durchgeführt [Glaab *et al.*, 2004]. Die lokale Charakterisierung der Inflammation in diesem Ovalbumin-induzierten Asthmamodell äußerte sich in einer signifikant erhöhten Anzahl eosinophiler Zellen in BAL 24 h und 7 Tage nach Allergenprovokation. Die präsentierten Daten zeigen, dass eine bronchiale Entzündung in der Lunge durch Ovalbumin induziert wurde.

Auch im Ovalbumin-induzierten Mausmodell konnte die allergische Frühphasereaktion *in vivo* und *ex vivo* mit vergleichbaren Ergebnissen erfasst werden kann. Die Korrelation der *in vivo* mit der *ex vivo* allergeninduzierter Bronchokonstriktion zeigte ebenfalls einen linearen Zusammenhang zwischen den beiden Datensätzen. Ein allergeninduzierter Anstieg der Lungenresistance *in vivo* wurde bei Ovalbumin-sensibilisierten Mäusen häufig beschrieben [Glaab *et al.*, 2005]. *Ex vivo* wurde die allergenspezifische Bronchokonstriktion in PCLS aus aktiv sensibilisierten Lungen bisher nicht untersucht. In passiv sensibilisierten humanen PCLS zeigten Wohlsen *et al.* (2003), dass eine Untersuchung der EAR grundsätzlich in lebenden Lungenschnitten möglich ist [Wohlsen *et al.*, 2003].

Die Atemwegshyperreagibilität nach inhalativer Exposition mit Methacholin konnte *in vivo* 24 h wie auch sieben Tage nach der Ovalbumin-Provokation erfasst werden. Die *in vivo* AHR-Daten stimmen mit veröffentlichten Arbeiten überein, die eine MCh-induzierte Atemwegshyperreagibilität 24 h nach Allergenprovokation zeigen konnten [Glaab *et al.*, 2006].

Eine Atemwegshyperreagibilität konnte *ex vivo* in dieser Studie nicht gezeigt werden, da die Atemwege sensibilisierter Tieren vorkontrahiert waren. Diese verringerte initiale Ausgangsfläche führte zu einer größeren Atemwegsfläche durch den Stimulus, was als Hyporeaktivität zu bezeichnen ist. Die *ex vivo* AHR-Daten dieser Mausstudie bestätigen die Erfahrungen der Arbeitsgruppe von Prof. Uhlig mit PCLS aus aktiv sensibilisierten Mäusen im Rahmen anderer Projekte (nicht veröffentlichte Daten). Aus diesem Grund wurden murine PCLS in anschließenden Studien mit  $\beta_2$ -Sympathomimetika vorbehandelt, um die Atemwege in Lungenschnitten von sensibilisierten und nicht sensibilisierten Tieren gleichermaßen zu relaxieren.

## **6.2.2 Chemikalien-induziertes allergisches Asthma führt *ex vivo* und *in vivo* zu Veränderung der Lungenfunktion**

Der Focus der im Folgenden diskutierten Studie lag auf der Charakterisierung von Symptomen, die durch eine allergische Sensibilisierung des Respirationstraktes mit den niedermolekularen Chemikalien TMA und DNCB verursacht wurden. Chemikalien-induzierte respiratorische Allergie wird häufig in Meerschweinchen oder wie im Rahmen der vorgelegten Arbeit in Maus untersucht. Zur Untersuchung von TMA und DNCB induzierten Veränderungen der Lungenfunktion wurde in Pilot-Studien im Fraunhofer ITEM ein murines Allergiemodell entwickelt und im Rahmen der vorgelegten Arbeit optimiert. Dieses Allergiemodell wurde zur Untersuchung der EAR und AHR *ex vivo* und *in vivo* nach Sensibilisierung mit TMA und DNCB verwendet.

TMA wurde als Prototyp für respiratorische Allergene verwendet und mit dem Kontaktallergen DNCB im murinen Model für respiratorische Allergie verglichen. Dabei erfolgte die Sensibilisierung der Tiere durch dermale Applikation der Substanzen.

Die dermale Exposition ist eine relevante Route zur Induktion der respiratorischen Hypersensitivität. Es ist bekannt, dass durch dermale Exposition und respiratorische Provokation von Mäusen mit Säure-Anhydriden, wie z.B. TMA eine respiratorische Allergie assoziiert mit einer Th2 Immunantwort induziert wird [Dearman *et al.*, 2000, Sailstad *et al.*, 2003]. Auch bei Menschen kann die dermale Exposition mit TMA zu einer Sensibilisierung und respiratorischer Hypersensitivität führen [Karol, 1986, Kimber *et al.*, 1992, Kimber *et al.*, 2001, Beck *et al.*, 2000]. AHR als Reaktion auf unspezifische Reize, wie ansteigende MCh-Dosen ist abhängig von einer bronchialen Entzündung mit Akkumulation von Th2 Zytokinen und Chemokinen mit begleitender Infiltration von Entzündungszellen [MacLean *et al.*, 1999].

Die Daten dieser Studie und bereits veröffentlichte Arbeiten [Arts *et al.*, 1998, Vanoirbeek *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2006] zeigten, dass TMA eine Th2-Immunreaktion induziert, die mit Akkumulation von typischen Mediatoren, wie Eotaxin-2 und pulmonalen Infiltration von Eosinophilen und Neutrophilen assoziiert ist. Sensibilisierung und inhalative Provokation mit DNCB beeinflussten in dieser Arbeit die lokale bronchiale Immunreaktion dagegen nicht. Vergleichbare DNCB-Effekte wurden in zwei unabhängigen Arbeiten publiziert [Dearman *et al.*, 2002, Farraj *et al.*, 2007].

Im Falle von Säure-Anhydriden (z.B. TMA) spielt IgE eine wichtige pathogene Rolle bei der Entwicklung von respiratorischer Allergie, die mit der Aktivierung von Th2-Zellen assoziiert

ist [Vanoirbeek *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2006]. Die Ergebnisse der Pilot-Studie im Fraunhofer ITEM (außerhalb dieser Arbeit) entsprechen bereits veröffentlichten Daten, die nach einer dermalen Sensibilisierung mit TMA erhöhte IgE-Levels im Serum von BN Ratten und BALB/c Mäusen zeigen konnten [Vanoirbeek *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2006]. Die Sensibilisierungen mit Kontaktallergenen, wie DNCB induzieren keine oder nur geringfügige Erhöhungen von IgE-Mengen im Serum [Vanoirbeek *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2006]. Die Daten der Vorstudie im Fraunhofer ITEM zeigten, dass die Unterscheidung von respiratorischen und Kontaktallergenen aufgrund IgE-vermittelter Reaktionen in dem hier verwendeten Allergiemodel möglich ist.

Im Gegensatz zu bereits publizierten Ergebnissen in Maus- [Vanoirbeek *et al.*, 2006] und Ratte-Allergiemodellen [Arts *et al.*, 1998, Zhang *et al.*, 2006] konnte im Rahmen dieser Arbeit die Entwicklung einer EAR in TMA- und DNCB-sensibilisierten Mäusen, wie auch in PCLS aus diesen Tieren nach Provokation mit TMA und DNCB nicht gezeigt werden. In der *in vivo* Vorstudie konnte auch keine spezifische (nicht durch irritative oder toxische Dosis verursachte) *in vivo* EAR nach TMA- und DNCB-Provokation nachgewiesen werden. Die toxischen und nicht-toxischen Konzentrationsbereiche von TMA und DNCB in DMSO wurden im Rahmen dieser Arbeit durch Untersuchung der PCLS-Vitalität bestimmt. Für die *ex vivo* Untersuchungen der Bronchokonstriktion wurden nicht-toxische TMA- und DNCB-Konzentrationen verwendet.

Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben TMA-induzierter EAR in dieser Arbeit ist, dass in der Studie von Vanoirbeek *et al.* (2006) die allergische Atemwegsreaktion durch die häufig diskutierte [Kirschvink *et al.*, 2005] nicht-invasive Technik („PenH system“) gemessen wurde [Vanoirbeek *et al.*, 2006]. Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurde eine invasive Lungenfunktionsmethode verwendet [Glaab *et al.*, 2004]. Da die Druckänderung in der Kammer stark von Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsschwankungen abhängt, können die Ergebnisse von PenH nicht eindeutig mit der Lungenresistance verglichen werden [Kirschvink *et al.*, 2005, Lomask, 2006]. Durch PenH werden auch Änderungen der oberen Atemwege wie bei einer allergischen Rhinitis erfasst. Somit entsprechen die Ergebnisse von Vanoirbeek *et al.* (2006) den bereits veröffentlichten Daten in Patienten mit allergischer Rhinitis nach Inhalation von TMA-Stäuben [Grammer *et al.*, 1993].

Die zweite mögliche Erklärung ist, dass im Rahmen dieser Arbeit die Provokation inhalativ mit trockenen Aerosolen durchgeführt wurde, wohingegen Vanoirbeek *et al.* (2006) die gelösten Allergene intranasal applizierten [Vanoirbeek *et al.*, 2006]. Zur Vermeidung von

## Diskussion

sekundären Lösungsmittelleffekten wurden in dieser Arbeit für inhalative Allergenprovokation Partikel mit einem definierten Durchmesser verwendet, die sich nur aus Allergenen zusammensetzten. Lösungsmittel wie DMSO und Aceton induzieren eine Irritation von Atemwegen und eine Penetration der Epithelschicht. Inhalation von Allergen Partikeln sollte außerdem so gut wie möglich die humane Situation am Arbeitsplatz widerspiegeln.

Die dritte mögliche Erklärung ist die Verwendung verschiedener Dosen zur Provokation einer Atemwegsreaktion. In der vorliegenden Arbeit wurden TMA- und DNCB-Konzentrationen verwendet, die im subtoxischen Bereich und um das 10-fache unter den verwendeten Dosen von Vanoirbeek *et al.*, (2006) lagen [Vanoirbeek *et al.*, 2006]. TMA reagiert als Anhydrid in wässriger Lösung zur entsprechenden Säure, wobei derzeit noch unklar ist, ob das Anhydrid oder die Säure sensibilisierend wirkt. Die TMA-Partikel, die Tieren in dieser Studie inhalativ appliziert wurden, waren schlecht wasserlöslich. Vermutlich wurden dadurch die effektiven Dosen nicht erreicht. Dagegen spricht allerdings, dass TMA in 0.05 % DMSO *ex vivo* ebenfalls keine Bronchokonstriktion induzierte.

Interessanterweise führte in dieser Studie die dermale Sensibilisierung mit TMA nicht zur Entwicklung einer EAR, aber zu einer sehr ausgeprägten AHR. Dabei wurde eine AHR als Reaktion auf stufenweise ansteigende Dosen MCh *in vivo* und *ex vivo* nachgewiesen. Andererseits konnte bei DNCB-sensibilisierten Mäusen keine AHR *in vivo* und in PCLS gezeigt werden. Die präsentierten *in vivo* und *ex vivo* Ergebnisse stimmen mit verschiedenen Publikationen überein, die einen Effekt von TMA nach dermalen Exposition auf die MCh Hyperreagibilität beschrieben haben [Arts *et al.*, 1998, Vanoirbeek *et al.*, 2006]. Die Daten dieser Arbeit bestätigen auch den Befund von Vanoirbeek *et al.* (2006), dass eine Sensibilisierung mit DNCB die AHR nur geringfügig oder gar nicht im Vergleich zu TMA beeinflusst [Vanoirbeek *et al.*, 2006].

Zusammenfassend kann an dieser Stelle festgestellt werden, dass nach dermalen Behandlung mit niedermolekularen Substanzen die respiratorische Allergie durch Charakterisierung von *in vivo* und *ex vivo* AHR sensitiv nachgewiesen werden kann. Weiterhin zeigte die exzellente Übereinstimmung von *ex vivo* und *in vivo* Ergebnissen, dass PCLS aus sensibilisierten Tieren zur Testung des respiratorisch sensibilisierenden Potentials von organischen Substanzen geeignet sind und eine Differenzierung zwischen respiratorischen und Kontaktallergenen in lebenden Lungenschnitten möglich ist. Durch Verwendung der *ex vivo* Messung der Bronchokonstriktion zur Identifizierung respiratorischer Allergene können die Tierversuche nicht vollständig ersetzt, aber zumindest vermindert werden.

Die *ex vivo* Lungenfunktionsmessung in aktiv, mit Ovalbumin, TMA oder DNCB sensibilisierten Tieren ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit hinreichend etabliert worden und kann für Untersuchungen in toxikologischen und pharmakologischen Studien verwendet werden. Da aus einer Maus- oder Rattenlunge mehrere Lungenschnitte hergestellt werden können, ist die Testung von bis zu 10-30 verschiedenen Konzentrationen einer Substanz möglich. In zukünftigen Untersuchungen durch die Arbeitsgruppe von Prof. Uhlig soll die *ex vivo* EAR und AHR in passiv sensibilisierten PCLS aus Maus- und Rattenlungen untersucht und mit den Datensätzen im Rahmen der vorgelegten Arbeit korreliert werden. Sollte die Untersuchung der Bronchokonstriktion in passiv und aktiv sensibilisierten PCLS vergleichbare Ergebnisse liefern, so können zukünftig Lungen nicht-sensibilisierten Tiere zur Testung pharmakologischer und toxikologischer Effekte verwendet werden.

## 7 Literatur

1. Arts, J. H., Droge, S. C., Spanhaak, S., Bloksma, N., Penninks, A. H., and Kuper, C. F. (1997). Local lymph node activation and IgE responses in brown Norway and Wistar rats after dermal application of sensitizing and non-sensitizing chemicals. *Toxicology* **117**, 229-234.
2. Arts, J. H., Kuper, C. F., Spoor, S. M., and Bloksma, N. (1998). Airway morphology and function of rats following dermal sensitization and respiratory challenge with low molecular weight chemicals. *Toxicol Appl Pharmacol* **152**, 66-76.
3. Baelder, R., Fuchs, B., Bautsch, W., Zwirner, J., Kohl, J., Hoymann, H. G., Glaab, T., Erpenbeck, V., Krug, N., and Braun, A. (2005). Pharmacological targeting of anaphylatoxin receptors during the effector phase of allergic asthma suppresses airway hyperresponsiveness and airway inflammation. *J Immunol* **174**, 783-789.
4. Bailly, S., Ferrua, B., Fay, M., and Gougerot-Pocidallo, M. A. (1990). Differential regulation of IL 6, IL 1 A, IL 1 beta and TNF alpha production in LPS-stimulated human monocytes: role of cyclic AMP. *Cytokine* **2**, 205-210.
5. Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252.
6. Barnes, P. J. (2006). Corticosteroid effects on cell signalling. *Eur Respir J* **27**, 413-426.
7. Barnes, P. J. (2008). Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol* **8**, 183-192.
8. Basketter, D. A., Selbie, E., Scholes, E. W., Lees, D., Kimber, I., and Botham, P. A. (1993). Results with OECD recommended positive control sensitizers in the maximization, Buehler and local lymph node assays. *Food Chem Toxicol* **31**, 63-67.
9. Baur, X., and Czuppon, A. (1995). Diagnostic validation of specific IgE antibody concentrations, skin prick testing, and challenge tests in chemical workers with symptoms of sensitivity to different anhydrides. *J Allergy Clin Immunol* **96**, 489-494.
10. Beck, L. A., and Leung, D. Y. (2000). Allergen sensitization through the skin induces systemic allergic responses. *J Allergy Clin Immunol* **106**, S258-S263.
11. Bergner, A., and Sanderson, M. J. (2002). Acetylcholine-induced calcium signaling and contraction of airway smooth muscle cells in lung slices. *J Gen.Physiol* **119**, 187-198.
12. Boverhof, D. R., Billington, R., Gollapudi, B. B., Hotchkiss, J. A., Krieger, S. M., Poole, A., Wiescinski, C. M., and Woolhiser, M. R. (2008). Respiratory sensitization and allergy: current research approaches and needs. *Toxicol Appl Pharmacol* **226**, 1-13.
13. Braun-Fahrlander, C., Riedler, J., Herz, U., Eder, W., Waser, M., Grize, L., Maisch, S., Carr, D., Gerlach, F., Bufe, A., Lauener, R. P., Schierl, R., Renz, H., Nowak, D.,

- and von Mutius, E. (2002). Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl.J Med* **347**, 869-877.
14. Burchill, M. A., Yang, J., Vang, K. B., and Farrar, M. A. (2007). Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis. *Immunol Lett.* **114**, 1-8.
  15. Calder, C. J., Liversidge, J., and Dick, A. D. (2004). Murine respiratory tract dendritic cells: isolation, phenotyping and functional studies. *J Immunol Methods* **287**, 67-77.
  16. Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J., and Lanzavecchia, A. (1997). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* **388**, 782-787.
  17. Corsini, E., Bruccoleri, A., Marinovich, M., and Galli, C. L. (1996). Endogenous interleukin-1 alpha associated with skin irritation induced by tributyltin. *Toxicol Appl Pharmacol* **138**, 268-274.
  18. Cotovio, J., Grandidier, M. H., Portes, P., Roguet, R., and Rubinstenn, G. (2005). The in vitro skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process. *Altern.Lab Anim* **33**, 329-349.
  19. Culpitt, S. V., Rogers, D. F., Shah, P., De Matos, C., Russell, R. E., Donnelly, L. E., and Barnes, P. J. (2003). Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **167**, 24-31.
  20. Dalpke, A. H., Eckerle, S., Frey, M., and Heeg, K. (2003). Triggering of Toll-like receptors modulates IFN-gamma signaling: involvement of serine 727 STAT1 phosphorylation and suppressors of cytokine signaling. *Eur J Immunol* **33**, 1776-1787.
  21. Dandurand, R. J., Wang, C. G., Phillips, N. C., and Eidelman, D. H. (1993). Responsiveness of individual airways to methacholine in adult rat lung explants. *J Appl Physiol* **75**, 364-372.
  22. De Kanter, R., De Jager, M. H., Draaisma, A. L., Jurva, J. U., Olinga, P., Meijer, D. K., and Groothuis, G. M. (2002). Drug-metabolizing activity of human and rat liver, lung, kidney and intestine slices. *Xenobiotica* **32**, 349-362.
  23. Dearman, R. J., Basketter, D. A., Evans, P., and Kimber, I. (1999a). Comparison of cytokine secretion profiles provoked in mice by glutaraldehyde and formaldehyde. *Clin Exp Allergy* **29**, 124-132.
  24. Dearman, R. J., Basketter, D. A., and Kimber, I. (1998). Selective induction of type 2 cytokines following topical exposure of mice to platinum salts. *Food Chem Toxicol* **36**, 199-207.
  25. Dearman, R. J., and Kimber, I. (1999b). Cytokine fingerprinting: characterization of chemical allergens. *Methods* **19**, 56-63.

26. Dearman, R. J., Skinner, R. A., Humphreys, N. E., and Kimber, I. (2003). Methods for the identification of chemical respiratory allergens in rodents: comparisons of cytokine profiling with induced changes in serum IgE. *J Appl Toxicol* **23**, 199-207.
27. Dearman, R. J., Warbrick, E. V., Humphreys, I. R., and Kimber, I. (2000). Characterization in mice of the immunological properties of five allergenic acid anhydrides. *J Appl Toxicol* **20**, 221-230.
28. Dearman, R. J., Warbrick, E. V., Skinner, R., and Kimber, I. (2002). Cytokine fingerprinting of chemical allergens: species comparisons and statistical analyses. *Food Chem Toxicol* **40**, 1881-1892.
29. Erpenbeck, V. J., Ziegert, M., Cavalet-Blanco, D., Martin, C., Baelder, R., Glaab, T., Braun, A., Steinhilber, W., Luetzig, B., Uhlig, S., Hoymann, H. G., Krug, N., and Hohlfeld, J. M. (2006). Surfactant protein D inhibits early airway response in *Aspergillus fumigatus*-sensitized mice. *Clin Exp Allergy* **36**, 930-940.
30. Faller, C., Bracher, M., Dami, N., and Roguet, R. (2002). Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics. *Toxicol In Vitro* **16**, 557-572.
31. Farraj, A. K., Boykin, E., Haykal-Coates, N., Gavett, S. H., Doerfler, D., and Selgrade, M. (2007). Th2 Cytokines in Skin Draining Lymph Nodes and Serum IgE Do Not Predict Airway Hypersensitivity to Intranasal Isocyanate Exposure in Mice. *Toxicol Sci* **100**, 99-108.
32. Fulton, S. A., Reba, S. M., Pai, R. K., Pennini, M., Torres, M., Harding, C. V., and Boom, W. H. (2004). Inhibition of major histocompatibility complex II expression and antigen processing in murine alveolar macrophages by *Mycobacterium bovis* BCG and the 19-kilodalton mycobacterial lipoprotein. *Infect Immun* **72**, 2101-2110.
33. Geier, J., Lessmann, H., Hellriegel, S., and Fuchs, T. (2008). Positive patch test reactions to formaldehyde releasers indicating contact allergy to formaldehyde. *Contact Dermatitis* **58**, 175-177.
34. Germann, P. G., Hafner, D., Hanauer, G., and Drommer, W. (1998). Incidence and severity of granulomatous pneumonia in Brown Norway (BN) rats: Breeder related variations. *Journal of Experimental Animal Science* **39**, 22-33.
35. Gibbs, R. A., Rogers, J., Katze, M. G., Bumgarner, R., Weinstock, G. M., Mardis, E. R., Remington, K. A., Strausberg, R. L., Venter, J. C., Wilson, R. K., Batzer, M. A., Bustamante, C. D., Eichler, E. E., Hahn, M. W., Hardison, R. C., Makova, K. D., Miller, W., Milosavljevic, A., Palermo, R. E., Siepel, A., Sikela, J. M., Attaway, T., Bell, S., Bernard, K. E., Buhay, C. J., Chandrabose, M. N., Dao, M., Davis, C., Delehaunty, K. D., Ding, Y., Dinh, H. H., Dugan-Rocha, S., Fulton, L. A., Gabisi, R. A., Garner, T. T., Godfrey, J., Hawes, A. C., Hernandez, J., Hines, S., Holder, M., Hume, J., Jhangiani, S. N., Joshi, V., Khan, Z. M., Kirkness, E. F., Cree, A., Fowler, R. G., Lee, S., Lewis, L. R., Li, Z., Liu, Y. S., Moore, S. M., Muzny, D., Nazareth, L. V., Ngo, D. N., Okwuonu, G. O., Pai, G., Parker, D., Paul, H. A., Pfannkoch, C., Pohl, C. S., Rogers, Y. H., Ruiz, S. J., Sabo, A., Santibanez, J., Schneider, B. W., Smith, S. M., Sodergren, E., Svatek, A. F., Utterback, T. R., Vattathil, S., Warren, W., White, C.

- S., Chinwalla, A. T., Feng, Y., Halpern, A. L., Hillier, L. W., Huang, X., Minx, P., Nelson, J. O., Pepin, K. H., Qin, X., Sutton, G. G., Venter, E., Walenz, B. P., Wallis, J. W., Worley, K. C., Yang, S. P., Jones, S. M., Marra, M. A., Rocchi, M., Schein, J. E., Baertsch, R., Clarke, L., Csuros, M., Glasscock, J., Harris, R. A., Havlak, P., Jackson, A. R., Jiang, H., Liu, Y., Messina, D. N., Shen, Y., Song, H. X., Wylie, T., Zhang, L., Birney, E., Han, K., Konkel, M. K., Lee, J., Smit, A. F., Ullmer, B., Wang, H., Xing, J., Burhans, R., Cheng, Z., Karro, J. E., Ma, J., Raney, B., She, X., Cox, M. J., Demuth, J. P., Dumas, L. J., Han, S. G., Hopkins, J., Karimpour-Fard, A., Kim, Y. H., Pollack, J. R., Vinar, T., Addo-Quaye, C., Degenhardt, J., Denby, A., Hubisz, M. J., Indap, A., Kosiol, C., Lahn, B. T., Lawson, H. A., Marklein, A., Nielsen, R., Vallender, E. J., Clark, A. G., Ferguson, B., Hernandez, R. D., Hirani, K., Kehrer-Sawatzki, H., Kolb, J., Patil, S., Pu, L. L., Ren, Y., Smith, D. G., Wheeler, D. A., Schenck, I., Ball, E. V., Chen, R., Cooper, D. N., Giardine, B., Hsu, F., Kent, W. J., Lesk, A., Nelson, D. L., O'Brien, W. E., Prufer, K., Stenson, P. D., Wallace, J. C., Ke, H., Liu, X. M., Wang, P., Xiang, A. P., Yang, F., Barber, G. P., Haussler, D., Karolchik, D., Kern, A. D., Kuhn, R. M., Smith, K. E., and Zwiag, A. S. (2007). Evolutionary and biomedical insights from the rhesus macaque genome. *Science* **316**, 222-234.
36. GINA (Global Initiative for Asthma), 2007. <http://www.ginasthma.org/>
37. Glaab, T., Daser, A., Braun, A., Neuhaus-Steinmetz, U., Fabel, H., Alarie, Y., and Renz, H. (2001). Tidal midexpiratory flow as a measure of airway hyperresponsiveness in allergic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **280**, L565-L573.
38. Glaab, T., Hecker, H., Stephan, M., Baelder, R., Braun, A., Korolewicz, R., Krug, N., and Hoymann, H. G. (2006). Comparison of non-invasive measures of cholinergic and allergic airway responsiveness in rats. *Acta Physiol (Oxf)* **186**, 301-308.
39. Glaab, T., Mitzner, W., Braun, A., Ernst, H., Korolewicz, R., Hohlfeld, J. M., Krug, N., and Hoymann, H. G. (2004). Repetitive measurements of pulmonary mechanics to inhaled cholinergic challenge in spontaneously breathing mice. *J Appl Physiol* **97**, 1104-1111.
40. Glaab, T., Taube, C., Braun, A., and Mitzner, W. (2007). Invasive and noninvasive methods for studying pulmonary function in mice. *Respir Res* **8**, 63.
41. Glaab, T., Ziegert, M., Baelder, R., Korolewicz, R., Braun, A., Hohlfeld, J. M., Mitzner, W., Krug, N., and Hoymann, H. G. (2005). Invasive versus noninvasive measurement of allergic and cholinergic airway responsiveness in mice. *Respir Res* **6**, 139.
42. Grammer, L. C., Harris, K. E., Cugell, D. W., and Patterson, R. (1993). Evaluation of a worker with possible formaldehyde-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* **92**, 29-33.
43. Guha, M., O'Connell, M. A., Pawlinski, R., Hollis, A., McGovern, P., Yan, S. F., Stern, D., and Mackman, N. (2001). Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis

- factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood* **98**, 1429-1439.
44. Hammad, H., and Lambrecht, B. N. (2007). Lung dendritic cell migration. *Adv.Immunol* **93**, 265-278.
  45. Hammad, H., and Lambrecht, B. N. (2008). Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol* **8**, 193-204.
  46. Hannon, J. P., Tigani, B., Williams, I., Mazzone, L., and Fozard, J. R. (2001). Mechanism of airway hyperresponsiveness to adenosine induced by allergen challenge in actively sensitized Brown Norway rats. *Br J Pharmacol* **132**, 1509-1523.
  47. Hariya, T., Hatao, M., and Ichikawa, H. (1999). Development of a non-radioactive endpoint in a modified local lymph node assay. *Food Chem Toxicol* **37**, 87-93.
  48. Harrigan, J. A., McGarrigle, B. P., Sutter, T. R., and Olson, J. R. (2006). Tissue specific induction of cytochrome P450 (CYP) 1A1 and 1B1 in rat liver and lung following in vitro (tissue slice) and in vivo exposure to benzo(a)pyrene. *Toxicol In Vitro* **20**, 426-438.
  49. Hart, L., Lim, S., Adcock, I., Barnes, P. J., and Chung, K. F. (2000). Effects of inhaled corticosteroid therapy on expression and DNA-binding activity of nuclear factor kappaB in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **161**, 224-231.
  50. Hartung, T., Bremer, S., Casati, S., Coecke, S., Corvi, R., Fortaner, S., Gribaldo, L., Halder, M., Roi, A. J., Prieto, P., Sabbioni, E., Worth, A., and Zuang, V. (2003). ECVAM's response to the changing political environment for alternatives: consequences of the European Union chemicals and cosmetics policies. *Altern.Lab Anim* **31**, 473-481.
  51. Hayashi, M., Higashi, K., Kato, H., and Kaneko, H. (2001). Assessment of preferential Th1 or Th2 induction by low-molecular-weight compounds using a reverse transcription-polymerase chain reaction method: comparison of two mouse strains, C57BL/6 and BALB/c. *Toxicol Appl Pharmacol* **177**, 38-45.
  52. Held, H. D., Boettcher, S., Hamann, L., and Uhlig, S. (2001). Ventilation-induced chemokine and cytokine release is associated with activation of nuclear factor-kappaB and is blocked by steroids. *Am J Respir Crit Care Med* **163**, 711-716.
  53. Held, H. D., Martin, C., and Uhlig, S. (1999). Characterization of airway and vascular responses in murine lungs. *Br J Pharmacol* **126**, 1191-1199.
  54. Hilton, J., Dearman, R. J., Basketter, D. A., Scholes, E. W., and Kimber, I. (1996). Experimental assessment of the sensitizing properties of formaldehyde. *Food Chem Toxicol* **34**, 571-578.
  55. Hilton, J., Dearman, R. J., Harvey, P., Evans, P., Basketter, D. A., and Kimber, I. (1998). Estimation of relative skin sensitizing potency using the local lymph node assay: a comparison of formaldehyde with glutaraldehyde. *Am J Contact Dermat.* **9**, 29-33.

56. Hoymann, H. G. (2007). Invasive and noninvasive lung function measurements in rodents. *J Pharmacol Toxicol Methods* **55**, 16-26.
57. Ito, T., Liu, Y. J., and Kadowaki, N. (2005). Functional diversity and plasticity of human dendritic cell subsets. *Int J Hematol*. **81**, 188-196.
58. Jackson, T. L., Griffin, L., Vote, B., Hillenkamp, J., and Marshall, J. (2005). An experimental method for testing novel retinal vital stains. *Exp Eye Res* **81**, 446-454.
59. Jagielo, P. J., Thorne, P. S., Watt, J. L., Frees, K. L., Quinn, T. J., and Schwartz, D. A. (1996). Grain dust and endotoxin inhalation challenges produce similar inflammatory responses in normal subjects. *Chest* **110**, 263-270.
60. Jarvis, D., Luczynska, C., Chinn, S., Potts, J., Sunyer, J., Janson, C., Svanes, C., Kunzli, N., Leynaert, B., Heinrich, J., Kerkhof, M., Ackermann-Lieblich, U., Anto, J. M., Cerveri, I., de Marco, R., Gislason, T., Neukirch, F., Vermeire, P., Wjst, M., and Burney, P. (2005). Change in prevalence of IgE sensitization and mean total IgE with age and cohort. *J Allergy Clin Immunol* **116**, 675-682.
61. Karol, M. H. (1986). Respiratory effects of inhaled isocyanates. *Crit Rev Toxicol* **16**, 349-379.
62. Kaufmann, A., Muhlradt, P. F., Gemsa, D., and Sprenger, H. (1999). Induction of cytokines and chemokines in human monocytes by *Mycoplasma fermentans*-derived lipoprotein MALP-2. *Infect Immun* **67**, 6303-6308.
63. Kawabata, T. T., Babcock, L. S., and Horn, P. A. (1996). Specific IgE and IgG1 responses to subtilisin Carlsberg (Alcalase) in mice: development of an intratracheal exposure model. *Fundam.Appl Toxicol* **29**, 238-243.
64. Kern, J. A., Lamb, R. J., Reed, J. C., Daniele, R. P., and Nowell, P. C. (1988). Dexamethasone inhibition of interleukin 1 beta production by human monocytes. Posttranscriptional mechanisms. *J Clin Invest* **81**, 237-244.
65. Kim, C. W., Song, J. S., Ahn, Y. S., Park, S. H., Park, J. W., Noh, J. H., and Hong, C. S. (2001). Occupational asthma due to formaldehyde. *Yonsei Med J* **42**, 440-445.
66. Kimber, I., Basketter, D. A., and Roggeband, R. (2001). Chemical respiratory allergy: classification and labelling. *Toxicology* **167**, 159-162.
67. Kimber, I., Gerberick, G. F., Van Loveren, H., and House, R. V. (1992). Chemical allergy: molecular mechanisms and practical applications. *Fundam.Appl Toxicol* **19**, 479-483.
68. Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R. J., Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Basketter, D. A., Scholes, E. W., Ladics, G. S., Loveless, S. E., House, R. V., and . (1995). An international evaluation of the murine local lymph node assay and comparison of modified procedures. *Toxicology* **103**, 63-73.
69. Kirschvink, N., Vincke, G., Onclinx, C., Peck, M. J., and Gustin, P. (2005). Comparison between pulmonary resistance and Penh in anaesthetised rats with

- tracheal diameter reduction and after carbachol inhalation. *J Pharmacol Toxicol Methods* **51**, 123-128.
70. Koeper, L. M., Schulz, A., Ahr, H. J., and Vohr, H. W. (2007). In vitro differentiation of skin sensitizers by cell signaling pathways. *Toxicology* **242**, 144-152.
  71. Kool, M., and Lambrecht, B. N. (2007). Dendritic cells in asthma and COPD: opportunities for drug development. *Curr.Opin.Immunol* **19**, 701-710.
  72. Krumdieck, C. L., dos Santos, J. E., and Ho, K. J. (1980). A new instrument for the rapid preparation of tissue slices. *Anal Biochem* **104**, 118-123.
  73. Kuhn, R., Rajewsky, K., and Muller, W. (1991). Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* **254**, 707-710.
  74. Kuipers, H., and Lambrecht, B. N. (2004). The interplay of dendritic cells, Th2 cells and regulatory T cells in asthma. *Curr.Opin.Immunol* **16**, 702-708.
  75. Kurosawa, H., Wang, C. G., Dandurand, R. J., King, M., and Eidelman, D. H. (1995). Mucociliary function in the mouse measured in explanted lung tissue. *J Appl Physiol* **79**, 41-46.
  76. Kuschner, W. G., D'Alessandro, A., Wong, H., and Blanc, P. D. (1996). Dose-dependent cigarette smoking-related inflammatory responses in healthy adults. *Eur Respir J* **9**, 1989-1994.
  77. Lambrecht, B. N., and Hammad, H. (2003). The other cells in asthma: dendritic cell and epithelial cell crosstalk. *Curr.Opin.Pulm.Med* **9**, 34-41.
  78. Lambrecht, B. N., Prins, J. B., and Hoogsteden, H. C. (2001). Lung dendritic cells and host immunity to infection. *Eur Respir J* **18**, 692-704.
  79. Larche, M. (2006). Immunoregulation by targeting T cells in the treatment of allergy and asthma. *Curr.Opin.Immunol* **18**, 745-750.
  80. Lim, Y. M., Moon, S. J., An, S. S., Lee, S. J., Kim, S. Y., Chang, I. S., Park, K. L., Kim, H. A., and Heo, Y. (2008). Suitability of macrophage inflammatory protein-1beta production by THP-1 cells in differentiating skin sensitizers from irritant chemicals. *Contact Dermatitis* **58**, 193-198.
  81. Liu, Y. J. (2001). Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* **106**, 259-262.
  82. Lomask, M. (2006). Further exploration of the Penh parameter. *Exp Toxicol Pathol* **57 Suppl 2**, 13-20.
  83. MacLean, J. A., Sauty, A., Luster, A. D., Drazen, J. M., and De Sanctis, G. T. (1999). Antigen-induced airway hyperresponsiveness, pulmonary eosinophilia, and chemokine expression in B cell-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* **20**, 379-387.
  84. Mapp, C. E., Boschetto, P., Maestrelli, P., and Fabbri, L. M. (2005). Occupational asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **172**, 280-305.

85. Martin, C., Held, H. D., and Uhlig, S. (2000). Differential effects of the mixed ET(A)/ET(B)-receptor antagonist bosentan on endothelin-induced bronchoconstriction, vasoconstriction and prostacyclin release. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **362**, 128-136.
86. Martin, C., Uhlig, S., and Ullrich, V. (1996). Videomicroscopy of methacholine-induced contraction of individual airways in precision-cut lung slices. *Eur Respir J* **9**, 2479-2487.
87. Mascarucci, P., Taub, D., Saccani, S., Paloma, M. A., Dawson, H., Roth, G. S., Ingram, D. K., and Lane, M. A. (2001). Age-related changes in cytokine production by leukocytes in rhesus monkeys. *Aging (Milano)* **13**, 85-94.
88. Mascarucci, P., Taub, D., Saccani, S., Paloma, M. A., Dawson, H., Roth, G. S., Lane, M. A., and Ingram, D. K. (2002). Cytokine responses in young and old rhesus monkeys: effect of caloric restriction. *J Interferon Cytokine Res* **22**, 565-571.
89. Mathison, J. C., Tobias, P. S., Wolfson, E., and Ulevitch, R. J. (1992). Plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein. A key component in macrophage recognition of gram-negative LPS. *J Immunol* **149**, 200-206.
90. Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* **1**, 135-145.
91. Moreno, L., Perez-Vizcaino, F., Harrington, L., Faro, R., Sturton, G., Barnes, P. J., and Mitchell, J. A. (2006). Pharmacology of airways and vessels in lung slices in situ: role of endogenous dilator hormones. *Respir Res* **7**, 111.
92. Mukhopadhyay, S., Hoidal, J. R., and Mukherjee, T. K. (2006). Role of TNFalpha in pulmonary pathophysiology. *Respir Res* **7**, 125.
93. Nassenstein, C., Dawbarn, D., Pollock, K., Allen, S. J., Erpenbeck, V. J., Spies, E., Krug, N., and Braun, A. (2006). Pulmonary distribution, regulation, and functional role of Trk receptors in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol* **118**, 597-605.
94. Newby, C. S., Barr, R. M., Greaves, M. W., and Mallet, A. I. (2000). Cytokine release and cytotoxicity in human keratinocytes and fibroblasts induced by phenols and sodium dodecyl sulfate. *J Invest Dermatol.* **115**, 292-298.
95. O'Byrne, P. M., and Inman, M. D. (2003). Airway hyperresponsiveness. *Chest* **123**, 411S-416S.
96. O'Keeffe, M., Hochrein, H., Vremec, D., Scott, B., Hertzog, P., Tatarczuch, L., and Shortman, K. (2003). Dendritic cell precursor populations of mouse blood: identification of the murine homologues of human blood plasmacytoid pre-DC2 and CD11c+ DC1 precursors. *Blood* **101**, 1453-1459.
97. Pan, J., Ju, D., Wang, Q., Zhang, M., Xia, D., Zhang, L., Yu, H., and Cao, X. (2001). Dexamethasone inhibits the antigen presentation of dendritic cells in MHC class II pathway. *Immunol Lett.* **76**, 153-161.

98. Parrish, A. R., Gandolfi, A. J., and Brendel, K. (1995). Precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology. *Life Sci* **57**, 1887-1901.
99. Pauluhn, J., Eidmann, P., Freyberger, A., Wasinska-Kempka, G., and Vohr, H. W. (2002). Respiratory hypersensitivity to trimellitic anhydride in Brown Norway rats: a comparison of endpoints. *J Appl Toxicol* **22**, 89-97.
100. Pepys, J., Longbottom, J. L., Hargreave, F. E., and Faux, J. (1969). Allergic reactions of the lungs to enzymes of *Bacillus subtilis*. *Lancet* **1**, 1181-1184.
101. Placke, M. E., and Fisher, G. L. (1987). Adult peripheral lung organ culture--a model for respiratory tract toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol* **90**, 284-298.
102. Plopper, C. G., and Hyde, D. M. (2008). The non-human primate as a model for studying COPD and asthma. *Pulm.Pharmacol Ther.*
103. Pushparajah, D. S., Umachandran, M., Plant, K. E., Plant, N., and Ioannides, C. (2007). Evaluation of the precision-cut liver and lung slice systems for the study of induction of CYP1, epoxide hydrolase and glutathione S-transferase activities. *Toxicology* **231**, 68-80.
104. Radon, K., Danuser, B., Iversen, M., Monso, E., Weber, C., Hartung, J., Donham, K., Palmgren, U., and Nowak, D. (2002). Air contaminants in different European farming environments. *Ann Agric.Environ Med* **9**, 41-48.
105. Ressmeyer, A. R., Larsson, A. K., Vollmer, E., Dahlen, S. E., Uhlig, S., and Martin, C. (2006). Characterisation of guinea pig precision-cut lung slices: comparison with human tissues. *Eur Respir J* **28**, 603-611.
106. Ritz, H. L., Evans, B. L., Bruce, R. D., Fletcher, E. R., Fisher, G. L., and Sarlo, K. (1993). Respiratory and immunological responses of guinea pigs to enzyme-containing detergents: a comparison of intratracheal and inhalation modes of exposure. *Fundam.Appl Toxicol* **21**, 31-37.
107. Robinson, M. K., Babcock, L. S., Horn, P. A., and Kawabata, T. T. (1996). Specific antibody responses to subtilisin Carlsberg (Alcalase) in mice: development of an intranasal exposure model. *Fundam.Appl Toxicol* **34**, 15-24.
108. Roggen, E. L., Soni, N. K., and Verheyen, G. R. (2006). Respiratory immunotoxicity: an in vitro assessment. *Toxicol In Vitro* **20**, 1249-1264.
109. Rolfe, F. G., Hughes, J. M., Armour, C. L., and Sewell, W. A. (1992). Inhibition of interleukin-5 gene expression by dexamethasone. *Immunology* **77**, 494-499.
110. Rougier, N., Redziniak, G., Schmitt, D., and Vincent, C. (1998). Evaluation of the capacity of dendritic cells derived from cord blood CD34+ precursors to present haptens to unsensitized autologous T cells in vitro. *J Invest Dermatol.* **110**, 348-352.
111. Sailstad, D. M., Ward, M. D., Boykin, E. H., and Selgrade, M. K. (2003). A murine model for low molecular weight chemicals: differentiation of respiratory sensitizers (TMA) from contact sensitizers (DNFB). *Toxicology* **194**, 147-161.

112. Schwiebert, L. M., Schleimer, R. P., Radka, S. F., and Ono, S. J. (1995). Modulation of MHC class II expression in human cells by dexamethasone. *Cell Immunol* **165**, 12-19.
113. Seitzer, U., Bussler, H., Kullmann, B., Petersen, A., Becker, W. M., and Ahmed, J. (2005). Mouse strain specificity of the IgE response to the major allergens of *Phleum pratense*. *Int Arch Allergy Immunol* **136**, 347-355.
114. Spiekstra, S. W., Toebak, M. J., Sampat-Sardjoepersad, S., van Beek, P. J., Boorsma, D. M., Stoof, T. J., von Blomberg, B. M., Scheper, R. J., Bruynzeel, D. P., Rustemeyer, T., and Gibbs, S. (2005). Induction of cytokine (interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha) and chemokine (CCL20, CCL27, and CXCL8) alarm signals after allergen and irritant exposure. *Exp Dermatol.* **14**, 109-116.
115. Stricker, R. B., Goldberg, B., and Epstein, W. L. (1997). Topical immune modulation (TIM): a novel approach to the immunotherapy of systemic disease. *Immunol Lett.* **59**, 145-150.
116. Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K., and Akira, S. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* **13**, 933-940.
117. Tee, R. D., Cullinan, P., Welch, J., Burge, P. S., and Newman-Taylor, A. J. (1998). Specific IgE to isocyanates: a useful diagnostic role in occupational asthma. *J Allergy Clin Immunol* **101**, 709-715.
118. Toebak, M. J., Pohlmann, P. R., Sampat-Sardjoepersad, S. C., von Blomberg, B. M., Bruynzeel, D. P., Scheper, R. J., Rustemeyer, T., and Gibbs, S. (2006). CXCL8 secretion by dendritic cells predicts contact allergens from irritants. *Toxicol In Vitro* **20**, 117-124.
119. Tuschl, H., and Kovac, R. (2001). Langerhans cells and immature dendritic cells as model systems for screening of skin sensitizers. *Toxicol In Vitro* **15**, 327-331.
120. Umachandran, M., Howarth, J., and Ioannides, C. (2004). Metabolic and structural viability of precision-cut rat lung slices in culture. *Xenobiotica* **34**, 771-780.
121. Umachandran, M., and Ioannides, C. (2006). Stability of cytochromes P450 and phase II conjugation systems in precision-cut rat lung slices cultured up to 72 h. *Toxicology* **224**, 14-21.
122. Van Och, F. M., Van Loveren, H., De Jong, W. H., and Vandebriel, R. J. (2002). Cytokine production induced by low-molecular-weight chemicals as a function of the stimulation index in a modified local lymph node assay: an approach to discriminate contact sensitizers from respiratory sensitizers. *Toxicol Appl Pharmacol* **184**, 46-56.
123. Vandebriel, R. J., De Jong, W. H., Spiekstra, S. W., Van Dijk, M., Fluitman, A., Garssen, J., and Van Loveren, H. (2000). Assessment of preferential T-helper 1 or T-helper 2 induction by low molecular weight compounds using the local lymph node assay in conjunction with RT-PCR and ELISA for interferon-gamma and interleukin-4. *Toxicol Appl Pharmacol* **162**, 77-85.

124. Vandenplas, O., and Malo, J. L. (2003). Definitions and types of work-related asthma: a nosological approach. *Eur Respir J* **21**, 706-712.
125. Veres, T. Z., Rochlitzer, S., Shevchenko, M., Fuchs, B., Prenzler, F., Nassenstein, C., Fischer, A., Welker, L., Holz, O., Muller, M., Krug, N., and Braun, A. (2007). Spatial interactions between dendritic cells and sensory nerves in allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **37**, 553-561.
126. von Garnier, C., Filgueira, L., Wikstrom, M., Smith, M., Thomas, J. A., Strickland, D. H., Holt, P. G., and Stumbles, P. A. (2005). Anatomical location determines the distribution and function of dendritic cells and other APCs in the respiratory tract. *J Immunol* **175**, 1609-1618.
127. Wang, X. F., Xing, M. L., Shen, Y., Zhu, X., and Xu, L. H. (2006). Oral administration of Cr(VI) induced oxidative stress, DNA damage and apoptotic cell death in mice. *Toxicology* **228**, 16-23.
128. Ward, M. D., and Selgrade, M. K. (2007). Animal models for protein respiratory sensitizers. *Methods* **41**, 80-90.
129. Weigt, H., Muhlradt, P. F., Larbig, M., Krug, N., and Braun, A. (2004). The Toll-like receptor-2/6 agonist macrophage-activating lipopeptide-2 cooperates with IFN-gamma to reverse the Th2 skew in an in vitro allergy model. *J Immunol* **172**, 6080-6086.
130. WHO (World Health Organisation), 2007. <http://www.who.int/respiratory/>.
131. Wohlsen, A., Martin, C., Vollmer, E., Branscheid, D., Magnussen, H., Becker, W. M., Lepp, U., and Uhlig, S. (2003). The early allergic response in small airways of human precision-cut lung slices. *Eur Respir J* **21**, 1024-1032.
132. Wohlsen, A., Uhlig, S., and Martin, C. (2001). Immediate allergic response in small airways. *Am J Respir Crit Care Med* **163**, 1462-1469.
133. Yoshida, Y., Sakaguchi, H., Ito, Y., Okuda, M., and Suzuki, H. (2003). Evaluation of the skin sensitization potential of chemicals using expression of co-stimulatory molecules, CD54 and CD86, on the naive THP-1 cell line. *Toxicol In Vitro* **17**, 221-228.
134. Zeiss, C. R., Patterson, R., Pruzansky, J. J., Miller, M. M., Rosenberg, M., and Levitz, D. (1977). Trimellitic anhydride-induced airway syndromes: clinical and immunologic studies. *J Allergy Clin Immunol* **60**, 96-103.
135. Zeldin, D. C., Eggleston, P., Chapman, M., Piedimonte, G., Renz, H., and Peden, D. (2006). How exposures to biologics influence the induction and incidence of asthma. *Environ Health Perspect.* **114**, 620-626.
136. Zhang, X. D., Andrew, M. E., Hubbs, A. F., and Siegel, P. D. (2006). Airway responses in Brown Norway rats following inhalation sensitization and challenge with trimellitic anhydride. *Toxicol Sci* **94**, 322-329.

137. Zhang, X. D., Fedan, J. S., Lewis, D. M., and Siegel, P. D. (2004). Asthmalike biphasic airway responses in Brown Norway rats sensitized by dermal exposure to dry trimellitic anhydride powder. *J Allergy Clin Immunol* **113**, 320-326.

## 8 Anhang

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: LPS- und Lipopeptid-induzierte Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen.....	7
Abb. 2: Schematische Darstellung der Aktivierung von T- und B-Zellen während der Sensibilisierung des respiratorischen Traktes .....	10
Abb. 3: Zentrale Rolle von DCs bei der Sensibilisierung des respiratorischen Traktes mit Ovalbumin in Maus [Abb. aus der Veröffentlichung von Lambrecht <i>et al.</i> 2003] .....	13
Abb. 4: Schematische Darstellung der Detektion von zwei verschiedenen Antigenen (a und b) in einer Probe durch Luminex-Technologie .....	38
Abb. 5: Studiendesign für Ovalbumin-induziertes allergisches Asthma im Rattenmodell mit <i>in vivo</i> und <i>ex vivo</i> Lungenfunktionsmessungen.....	45
Abb. 6: Studiendesign für Ovalbumin-induziertes allergisches Asthma im Tiermodell mit BALB/c Mäusen mit <i>in vivo</i> und <i>ex vivo</i> Lungenfunktionsmessungen.....	46
Abb. 7: Studiendesign für TMA- und DNCB-induzierte Sensibilisierung von BALB/c Mäusen und anschließende <i>in vivo</i> und <i>ex vivo</i> Lungenfunktionsmessungen .....	47
Abb. 8: Aerosolgenerierung und Detektionssysteme für die inhalative Provokation mit Substanzen .....	49
Abb. 9: Zeitabhängige LDH-Freisetzung von PCLS .....	54
Abb. 10: Fluoreszenzmikroskopische 3D-Bilder von PCLS, die mit 4 $\mu$ M Calcein AM and 4 $\mu$ M EthD-1 nach 4 h (A), 24 h (B), 48 h (C), and 72 h (D, E) Kultivierung und nach Gewebelyse (F) gefärbt wurden.....	55
Abb. 11: Die quantitative Analyse der Calcein/EthD-1-Färbung in PCLS.....	56
Abb. 12: Zeitabhängige Änderungen der PCLS-Vitalität nach 4 h bis 72 h Kultivierung mit 1 %, 3 % und 10 % FCS oder nach der Gewebelyse mit Triton X-100 .....	57
Abb. 13: Zytokin/Chemokin-Sekretionen in PCLS nach 24 h Inkubation mit 500 ng/ml LPS mit oder ohne 10 $\mu$ g/ml Dexamethason, die im Zytokin-Multiplex ( <i>9-plex</i> ) bestimmt wurden .....	59
Abb. 14: Intrazelluläre Zytokin/Chemokin-Akkumulationen in PCLS nach 24 h Inkubation mit 500 ng/ml LPS mit oder ohne 10 $\mu$ g/ml Dexamethason, die im Zytokin-Multiplex ( <i>9-plex</i> ) bestimmt wurden .....	59
Abb. 15: LPS-abhängige TNF $\alpha$ -Sekretion in PCLS nach 24 h Inkubation mit stufenweise ansteigenden LPS-Konzentrationen.....	60
Abb. 16: TNF $\alpha$ in Ratte-PCLS nach 24 h Exposition mit 500 ng/ml LPS .....	61
Abb. 17: Extrazelluläre Zytokin/Chemokin-Sekretion in Pavian-PCLS nach 24 h Inkubation mit 500 ng/ml LPS und mit oder ohne 10 $\mu$ g/ml Dexamethason .....	62
Abb. 18: Intrazelluläre Zytokin/Chemokin-Akkumulation in Pavian-PCLS nach 24 h Inkubation mit 500 ng/ml LPS und mit oder ohne 10 $\mu$ g/ml Dexamethason .....	63
Abb. 19: TNF $\alpha$ in Rhesusaffen-PCLS nach der Exposition mit LPS und Dexamethason.....	64
Abb. 20: Einfluss von MALP-2 und IFN $\gamma$ auf die Zytokin/Chemokin-Produktion in PCLS.....	65
Abb. 21: LDH-Freisetzung (A) und quantitative Analyse der Calcein/EthD-1-Färbung (B) von PCLS nach 24 h Inkubation mit BppCysMPEG .....	66
Abb. 22: Aktivierung von Lungenschnitten durch BppCysMPEG .....	67

Abb. 23: Effekte von BppCysMPEG auf TNF $\alpha$ in PCLS .....	67
Abb. 24: Effekte von BppCysMPEG auf IL-1 $\alpha$ in PCLS .....	68
Abb. 25: LDH-Freisetzung von PCLS nach 24 h Exposition mit TMA in DMEM mit 0.05 % DMSO .....	69
Abb. 26: 3D-Ansicht der Calcein/EthD-1-Färbung nach 16 h Exposition von PCLS mit TMA in DMEM mit 0.05 % DMSO .....	70
Abb. 27: Quantitative Analyse der Calcein/EthD-1-Färbung von PCLS nach 16 h Inkubation mit 3-50 $\mu$ g/ml TMA in DMEM (mit 0.05 % DMSO) .....	70
Abb. 28: Berechnung von EC <sub>50</sub> nach 16 h Inkubation mit TMA in DMEM (mit 0.05 % DMSO) .....	71
Abb. 29: Zytokine und Chemokine in PCLS nach 16 h Exposition mit TMA in DMEM, 0.05 % DMSO .....	72
Abb. 30: TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ und MIP-1 $\beta$ -Produktion nach 16 h Inkubation von PCLS mit 0.39-6 $\mu$ g/ml TMA in DMEM (mit 0.05 % DMSO) .....	73
Abb. 31: Quantitative Analyse der Calcein/EthD-1-Färbung von Maus-PCLS nach 16 h Inkubation mit 0.25-3 $\mu$ g/ml DNCB in DMEM (mit 0.01 % DMSO) .....	74
Abb. 32: TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ und MIP-1 $\beta$ -Produktion nach Exposition von Maus-PCLS mit DNCB in DMEM (mit 0.01 % DMSO) .....	75
Abb. 33: Quantitative Analyse der Calcein/EthD-1-Färbung von PCLS nach 16 h Inkubation mit 2.5-100 $\mu$ g/ml SDS in DMEM .....	76
Abb. 34: TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ und MIP-1 $\beta$ -Produktion nach Exposition von PCLS mit SDS in DMEM .....	77
Abb. 35: LDH-Freisetzung von PCLS nach 24 h Inkubation mit 4.3-140 $\mu$ g/ml Formaldehyd in DMEM .....	78
Abb. 36: TNF $\alpha$ -Produktion nach Exposition von PCLS mit Formaldehyd in DMEM .....	79
Abb. 37: LDH-Freisetzung von PCLS nach 24 h Inkubation mit 1.9-60 $\mu$ g/ml Kaliumdichromat (K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ) in DMEM .....	80
Abb. 38: Konzentrationsabhängige TNF $\alpha$ -Produktion nach Exposition von PCLS mit Kaliumdichromat in DMEM .....	81
Abb. 39: Vitalität der PCLS nach 16 h Inkubation mit ansteigenden Alcalase-Konzentrationen (4-10000 ng/ml) .....	82
Abb. 40: Immunfluoreszenzfärbung von MHC Klasse II in PCLS von BALB/c Mäusen nach 24 h Inkubation mit LPS und Dexamethason .....	84
Abb. 41: Immunfluoreszenzfärbung von MHC Klasse II in PCLS von CD11c-EYFP-transgenen Mäusen nach 24 h Inkubation mit LPS und Dexamethason .....	85
Abb. 42: Immunhistochemischer Nachweis der Co-Expression von MHC Klasse II und CD86 <i>ex vivo</i> in PCLS nach 24 h Inkubation mit Ovalbumin-spezifischen CD4 <sup>+</sup> -Zellen und 1 mg/ml Ovalbumin .....	87
Abb. 43: Immunhistochemischer Nachweis der CD86 Expression nach Co-Kultur von PCLS mit Ovalbumin-spezifischen CD4 <sup>+</sup> -Zellen .....	88
Abb. 44: IL-2-Freisetzung nach 24 h Inkubation von PCLS mit Ovalbumin-spezifischen CD4 <sup>+</sup> -Zellen, Ovalbumin, LPS und Dexamethason im Vergleich zu Con A oder Ovalbumin stimulierten Ovalbumin-spezifischen CD4 <sup>+</sup> -Zellen .....	89
Abb. 45: <i>Ex vivo</i> EAR (A) und <i>in vivo</i> EAR (B) .....	91
Abb. 46: <i>In vivo</i> EAR am Tag 21 (A) und <i>ex vivo</i> EAR am Tag 28 als max. Kontraktion (B) und Fläche unter der Kurve (C) .....	91

## Anhang

Abb. 47: Korrelation der EAR <i>in vivo</i> und <i>ex vivo</i> nach der Allergenprovokation.....	92
Abb. 48: <i>Ex vivo</i> AHR am Tag 22 (A) und <i>in vivo</i> AHR am Tag 29 (B), 24 h nach Allergenprovokation .....	93
Abb. 49: <i>Ex vivo</i> (A) und <i>in vivo</i> (B) AHR als Reaktion auf Adenosin-Provokation .....	94
Abb. 50: Zelldifferenzierung in BAL am Tag 23, 48 h nach Allergenprovokation .....	95
Abb. 51: <i>Ex vivo</i> (A) und <i>in vivo</i> (B, C und D) EAR am Tag 35.....	96
Abb. 52: <i>In vivo</i> EAR am Tag 35 (A) und 42 (B).....	96
Abb. 53: <i>In vivo</i> EAR am Tag 35 (A) und <i>ex vivo</i> EAR am Tag 42 (B).....	97
Abb. 54: Korrelation der EAR <i>in vivo</i> und <i>ex vivo</i> nach der Allergenprovokation.....	97
Abb. 55: <i>In vivo</i> AHR 24 h (A), sieben Tage (B) nach erster und 24 h nach zweiter inhalativer Allergenprovokation (C).....	98
Abb. 56: <i>Ex vivo</i> AHR 4 h nach OP (A) und 16 h (B) nach Allergenprovokation.....	99
Abb. 57: Zelldifferenzierung in BAL am Tag 42.....	99
Abb. 58: Anzahl eosinophiler Zellen in BAL .....	100
Abb. 59: Zelldifferenzierung in BAL 24 h nach TMA- (A) und DNCB-Provokation (B).....	101
Abb. 60: IL-5 (A) und Eotaxin-2 (B) Konzentrationen in BAL-Überständen 24 h nach inhalativer Provokation mit TMA und DNCB .....	102
Abb. 61: <i>In vivo</i> (A) und <i>ex vivo</i> (B) EAR am Tag 21 als Reaktion auf eine Provokation mit TMA und DNCB .....	103
Abb. 62: <i>In vivo</i> (A) und <i>ex vivo</i> (B) AHR am Tag 22, 24 h nach TMA bzw. DNCB Provokation .....	104

## 8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Industriechemikalien für <i>ex vivo</i> und <i>in vivo</i> Untersuchungen.....	27
Tab. 2: Konzentrationen und bekannte Eigenschaften von Substanzen, die zur Testung immunmodulatorischer Effekte in PCLS verwendet wurden.....	31
Tab. 3: Tabellarische Darstellung der Co-Kultur von PCLS mit Ovalbumin-spezifischen CD4+-Zellen, Ovalbumin und immunmodulatorischen Substanzen.....	33
Tab. 4: Die obersten und untersten Detektionsgrenzen von Zytokinen und Chemokinen in <i>Bio-Plex Cytokine Assays</i> .....	40
Tab. 5: Die verwendeten Konzentrationen der Antikörper, die Anregungs- und Emissionswellenlängen.....	43
Tab. 6: Inhalative Dosen der Allergenaerosole, die Expositionszeiten und MMADs.....	50
Tab. 7: Konzentrationen der verwendeten Substanzen zur Untersuchung der <i>ex vivo</i> Lungenfunktion.....	52
Tab. 8: Verhältnis der Volumina MHC Klasse II- und EYFP-CD11c-positiver Zellen nach Fluoreszenzfärbung von PCLS aus einer CD11c-EYFP-transgenen Maus.....	86
Tab. 9: Zusammenfassung toxischer Konzentrationen und EC50-Werte in PCLS.....	109

### 8.3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholinchlorid (Acetylcholin)
AHR	Atemwegshypereagibilität ( <i>airway hyperresponsiveness</i> )
Al(OH) <sub>3</sub>	Aluminiumhydroxid
<i>Aqua dest.</i>	<i>Aqua destillata</i>
APCs	antigenpräsentierende Zellen ( <i>antigen presenting cell</i> )
ATP	Adenosin-Triphosphat
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSA	Rinderserumalbumin
BppCysMPEG	synthetisches Lipopeptid (Konjugat aus MALP-2 und PEG)
°C	Grad Celsius
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
C <sub>dyn</sub>	dynamische <i>Compliance</i>
CLSM	Konfokales Laserscanning Mikroskop
Con A	Concanavalin (polyklonales Mitogen)
Cy5	Cyanin-Farbstoff
DC	Dendritische Zelle
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNCB	2,4-Dinitrochlorobenzol
EAR	allergische Frühphasereaktion ( <i>early allergic response</i> )
EBSS	Earle's Balanced Salt Solution
EC <sub>50</sub>	Effektive Konzentration von x %
ED <sub>(50, 100, 150 oder 200)</sub>	Effektive Dosis von 50 %, 100 %, 150 % oder 200 %
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked-Immunosorbant-Assay</i>
EthD-1	Ethidium-Homodimer-1
EYFP	<i>Enhanced Yellow Fluorescent Protein</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
G-CSF	<i>granulocyte colony stimulating factor</i>
HCl	Salzsäure

## Anhang

HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HMW	hochmolekular ( <i>high molecular weight</i> )
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettich Peroxidase
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
I-A/I-E	MHC Klasse II Alloantigene
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Kaliumdichromat
kDa	Kilodalton
LDH	Laktatdehydrogenase
LMW	niedermolekular ( <i>low molecular weight</i> )
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol pro Liter
<i>MACS</i>	magnetische Zellseparation ( <i>magnetic cell separation</i> )
MALP-2	<i>macrophage-activating lipopeptide of molecular mass 2 kDa</i>
MCh	Acetyl-β-Methylcholinchlorid (Methacholin)
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MFC	<i>mass flow controller</i> (Massedurchflussregler)
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIP-1β	Makrophagen-inflammatorisches Protein 1β
MMAD	Massenmediandurchmesser
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
NADP+	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (oxidiert)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduziert)
NaOH	Natronlauge
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PAMPs	pathogenassoziierte molekulare Muster
PCLS	<i>precision cut lung slices</i> (dt. Präzisionslungenschnitte)

PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglycol
RANTES	hauptsächlich von Endothelzellen freigesetztes Chemokin (chemotaktische Wirkung auf Monozyten, Eosinophile und T-Zellen)
R <sub>L</sub>	Lungenresistance
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Th-Zelle	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TMA	Trimellitsäureanhydrid
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
TCR	T-Zell-Rezeptor

Außerdem wurden die Abkürzungen der SI-Einheiten verwendet.

## 8.4 Eigene wissenschaftliche Veröffentlichungen zum Thema

### Zeitschriften:

- M. Henjakovic, K. Sewald, S. Switalla, D. Kaiser, M. Müller, T. Veres, C. Martin, S. Uhlig, N. Krug, A. Braun. *Ex vivo* testing of immune responses in precision cut lung slices. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008 Aug 15;231(1):68-76. Epub 2008 Apr 11.
- M. Henjakovic, C. Martin, H. G. Hoymann, K. Sewald, A. R. Ressmeyer, G. Pohlmann, N. Krug, S. Uhlig, A. Braun. *Ex vivo* lung function measurements in precision cut lung slice (PCLS) from chemical allergen sensitized mice represent a suitable alternative to in vivo studies. *Toxicol Sci.* 2008 Sep 4. [Epub ahead of print].

### Kurzberichte und Vorträge:

- K. Sewald, M. Henjakovic, S. Switalla, S. Uhlig, K. Rätz-Mensing, A. Wohlsen, N. Krug, A. Braun. Primate and Mouse Precision Cut Lung Slices (PCLS) as Alternative for *in vivo* Respiratory Toxicology Testing. *5th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences*, Berlin 2005. Poster.
- M. Henjakovic, K. Sewald, S. Switalla, T. Veres, K. Mätz-Rensing, N. Krug, A. Braun. Einsatz von Precision cut lung slices (PCLS) zur Prüfung des allergenen Potentials von Chemikalien. 18. Mainzer Allergie Workshop, Mainz 2006. Vortrag.
- M. Henjakovic, K. Sewald, S. Switalla, T. Veres, K. Mätz-Rensing, C. Martin, N. Krug, A. Braun. Precision Cut Lung Slices for Respiratory Immunotoxicology Testing: Focus on Dendritic Cells. *ATS 2006 San Diego International Conference*, Thematic Poster Session [B101], San Diego 2006. Poster.
- M. Henjakovic, K. Sewald, S. Switalla, T. Veres, K. Mätz-Rensing, N. Krug, A. Braun. Ermittlung des allergenen Potentials von Chemikalien in *Precision Cut Lung Slices* (PCLS). Workshop Immunmodulation - exogene Noxen, Leipzig 2006. Vortrag.
- M. Henjakovic, K. Sewald, S. Switalla, T. Veres, K. Mätz-Rensing, N. Krug, A. Braun. Ermittlung des allergenen Potentials von Chemikalien in Precision Cut Lung Slices (PCLS). *Pneumologie* 2007; 61. DOI: 10.1055/s-2007-967234, Mainz 2006. Vortrag.
- M. Henjakovic, K. Sewald, S. Switalla, T. Veres, K. Mätz-Rensing, N. Krug, A. Braun. *Ex vivo* Immunomodulatory Testing using Precision Cut Lung Slices: Focus on Dendritic Cells. *Keystone Symposia, Imaging Immune Responses*, Keystone 2007. Poster.
- M. Henjakovic, K. Sewald, S. Switalla, T. Veres, K. Mätz-Rensing, N. Krug, A. Braun. Precision cut lung slices (PCLS) for respiratory sensitisation potential testing of allergens and irritants. *Toxicology Letters* 2007; 172. DOI:10.1016/j.toxlet.2007.05.376, EUROTOX, Amsterdam 2007. Poster.
- K. Sewald, M. Henjakovic, S. Switalla, T. Veres, N. Krug, A. Braun, *Ex vivo* Immunomodulatory Testing using Precision Cut Lung Slices: Focus on Dendritic Cells. 37th Annual meeting of the German Society for Immunology, Heidelberg 2007. Poster.

- S. Switalla, K. Sewald, M. Henjakovic, T. Veres, N. Krug, A. Braun, Precision cut lung slices as tool for assessment of allergens. Toxicology Letters 2007; 172. DOI:10.1016/j.toxlet.2007.05.393, EUROTOX, Amsterdam 2007. Poster.
- M. Henjakovic, C. Martin, H. G. Hoymann, K. Sewald, S. Uhlig, N. Krug, A. Braun. Effect of TMA and DNCB on *in vivo* and *ex vivo* lung function in a mouse allergy model. ATS 2008 Toronto International Conference, Thematic Poster Session, Toronto 2008. Poster.
- C. Martin, A. R. Ressmeyer, C. Dassow, M. Henjakovic, K. Sewald, A. Braun, S. Uhlig. The asthmatic airway response in from mice. ATS 2008 Toronto International Conference, Thematic Poster Session, Toronto 2008. Poster.

## 8.5 *Curriculum Vitae*

### ***Persönliche Daten***

*Geburtsdatum* 04. Juni 1979  
*Geburtsort* Brcko (Bosnien und Herzegowina)  
*Nationalität* bosnisch  
*Familienstand* verheiratet  
*Anschrift* Kaiser-Wilhelm-Platz 9  
32545 Bad Oeynhausen

### ***Schulische Ausbildung***

*Sep 1986 - Mai 1992* 1-6 Schulklasse in Brcko (Bosnien und Herzegowina)  
*Sep 1992 - Dez 1992* Deutschsprachkurs an der Lutherschule, Städt. Gem.  
Hauptschule II in Bielefeld  
*Jan 1993 - Jun 1999* Martin-Niemöller-Gesamtschule in Bielefeld  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### ***Studium***

*WS 1999/2000 –*  
*WS 2004/2005* Diplomstudiengang Biochemie an der Fakultät für Chemie  
Universität Bielefeld  
*24.05.2004-31.01.2005* Diplomarbeit am Forschungsthema "Pseudoxanthoma  
elasticum" im Herz- und Diabeteszentrum NRW, in Bad  
Oeynhausen  
Abschluss: Diplom-Biochemikerin

### ***Dissertation***

*seit März 2005-* Arbeit an der Dissertation  
„Charakterisierung allergeninduzierter immunologischer  
Reaktionen im Asthmodell und *ex vivo* in *Precision cut lung  
slices* (PCLS)“  
als wissenschaftliche Mitarbeiterin im Fraunhofer Institut für  
Toxikologie and experimentelle Medizin (Fraunhofer ITEM), in  
Hannover  
interne Betreuung: Priv. Doz. Dr. rer. nat. Armin Braun  
(Fraunhofer ITEM, in Hannover)  
externe Betreuung: Prof. Dr. rer. nat. Dieter Steinhagen  
(Tierärztliche Hochschule Hannover, in Hannover)

Hannover, den 27.05.2008

Maja Henjakovic

## **Erklärung zur Dissertation**

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation

„Charakterisierung allergeninduzierter immunologischer Reaktionen im Asthmodell und *ex vivo* in *Precision cut lung slices* (PCLS)“

selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 27.05.2008

Maja Henjakovic

---

(Unterschrift)

Name: