

Untersuchungen zur Immunpathogenese der virusbedingten Asthma-Exazerbation im Mausmodell

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Rebecca Elisabeth Henriette Bodenstein-Sgró

Hamburg, 2020

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Roeder

Zweiter Gutachter:

PD Dr. Michael Wegmann

Tag der mündlichen Prüfung:

15. September 2020

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abstract	IV
Zusammenfassung.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Asthma bronchiale.....	1
1.1.1 Pathophysiologie	2
1.1.2 Immunpathogenese.....	3
1.1.3 Therapie.....	6
1.2 Asthma-Exazerbation	6
1.2.1 Pathogenese von Asthma-Exazerbationen	7
1.2.2 Modelle zur Untersuchung von Asthma-Exazerbationen	9
1.3 Zielsetzung	11
2 Material	13
2.1 Applikationen im Tierversuch.....	13
2.2 Viren.....	13
2.3 Puffer	14
2.4 Antikörper	14
2.5 Zelllinien, Medien und Zusätze.....	14
2.6 Primer	15
2.7 Kits	16
2.8 Zubehör für Virusversuche.....	16
2.9 Reagenzien und Chemikalien.....	17
2.10 Geräte	18
2.11 Software	19
3 Methoden.....	20
3.1 Versuchstiere und Tierhaltung	20
3.2 Induktion einer akuten Exazerbation von experimentellem Asthma mittels Virus beziehungsweise poly(I:C).....	20
3.2.1 Protokoll zur Auslösung einer akuten Exazerbation von experimentellem Asthma mittels poly(I:C).....	21
3.2.2 Protokoll zur Auslösung einer akuten Exazerbation von experimentellem Asthma mittels Influenza A-Virus.....	21

3.2.3	Protokoll zur Auslösung einer akuten Exazerbation von experimentellem Asthma mittels Respiratorisches Syncytialvirus	22
3.3	Messung der Lungenfunktion.....	23
3.3.1	Aufbau und Prinzip der Messapparatur.....	23
3.3.2	Messablauf	25
3.4	Probengewinnung.....	25
3.4.1	Serumproben	25
3.4.2	Broncho-alveoläre Lavage	26
3.4.3	Nasale Lavage	26
3.4.4	Lungenproben zur Generierung von Lungenpulver oder Lungenhomogenat	27
3.5	Zytospins und Zelldifferenzierung	27
3.6	Histologie der Lunge	27
3.6.1	Lungenpräparation unter standardisierten Bedingungen für die Histologie	27
3.6.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	28
3.6.3	Periodsäure-Schiff-Färbung	28
3.7	Quantifizierung von Mukus in Atemwegen	29
3.8	Herstellung von Lungenpulver und Lungenhomogenat.....	30
3.8.1	Herstellung von Lungenpulver für die Isolation von RNA.....	30
3.8.2	Herstellung von Lungenhomogenat für die Isolation von RNA	30
3.8.3	Herstellung von Lungenhomogenat für die Bestimmung des Virustiters	31
3.8.3.1	Influenza A-Virus.....	31
3.8.3.2	Respiratorisches Syncytialvirus	31
3.9	RNA-Isolierung aus Lungengewebe	31
3.10	reverse Transkription.....	32
3.11	Real-Time quantitative Polymerase Kettenreaktion	32
3.12	Protein-Konzentrationsbestimmung.....	33
3.12.1	Cytometric Bead Array	33
3.12.2	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	34
3.13	Virustiterbestimmung mittels Plaque-Test.....	35
3.13.1	Influenza A-Virus.....	35
3.13.2	Respiratorisches Syncytialvirus	36
3.14	Kultivierung von Zelllinien.....	37
3.14.1	Auftauen der Zellen.....	37
3.14.2	Kultivierung der Zellen	37

3.14.3	Einfrieren der Zellen	37
3.15	Statistik.....	38
4	Ergebnisse	39
4.1	Untersuchung der frühen Exazerbation von experimentellem Asthma.....	39
4.2	Mausmodell für die Influenza-Virus-induzierte Exazerbation experimentellen Asthmas	53
4.3	Mausmodell für die Respiratorisches Syncytialvirus-induzierte Exazerbation experimentellen Asthmas	75
5	Diskussion	109
6	Literatur.....	129
7	Anhang	144
7.1	Abkürzungsverzeichnis	144
7.2	Abbildungsverzeichnis	148
8	Eidesstattliche Erklärung.....	151
9	Danksagung	152

Abstract

300 million people suffer from asthma worldwide with increasing incidences. Asthma is a non-curable disease, in which treatment only controls symptoms. Albeit, patients encounter so-called exacerbations, acute worsening of disease symptoms, which require urgent medical advice or even hospitalisation and lead to a subsequent change in medication. Hence, exacerbations are not only a major burden for health care systems because of treatment costs but also for the patient because of the disease progression and loss of life quality initiated by exacerbations.

Exacerbations are triggered by various stimuli, such as air pollution, allergens, bacterial infections, cigarette smoke, pregnancy, stress, and viral infections. The most prevalent stimuli are respiratory viruses. However, the initiating mechanisms of virus-induced still remain incompletely understood.

Therefore, the pathogenesis of virus-induced asthma exacerbation was examined in a mouse model.

In the first part, an established mouse model of poly(I:C)-induced asthma exacerbation was used to investigate the early virus-induced immune responses. Lung infiltrating cells as well as various mediators of the allergic and anti-viral immune responses were examined and depicted in time responses. It was shown that an early increased combined asthmatic and anti-viral immune response trigger acute asthma exacerbation. On the basis of the time responses of the mediators they could be ranked regarding their concentration, time point of appearance and discrepancy of the concentrations between stable disease and exacerbation. With the help of the rankings IL-6, KC/CXCL1, TNF- α in combination with IL-5 and IFN- λ could be suggested as a marker profile for the prediction or early detection of developing exacerbations.

In the second part, virus-induced exacerbation of experimental asthma in mice should be established. Therefore, two different respiratory viruses, a 2009 pandemic H1N1 influenza A virus and RSV, were used in order to induce exacerbation of an Ovalbumin-mediated allergic airway inflammation. Unfortunately, with both viruses not all of the characteristics (namely increased airway hyperreactivity, increased mucus production, increased T_H2-mediated inflammation with increased eosinophils and involvement of neutrophils and increased cytokine and chemokine production) of a virus-induced asthma exacerbation in patients could be reflected.

Zusammenfassung

Weltweit leiden ca. 300 Millionen Menschen an Asthma, Tendenz steigend. Zugleich ist Asthma nicht heilbar und eine Behandlung erfolgt lediglich auf der Basis einer Symptomkontrolle. Dennoch kommt es bei vielen Patienten zu einer sogenannten Exazerbation, die eine akute Verschlimmerung der Asthmasymptome darstellt. Diese sorgt dafür, dass die Patienten ärztliche Behandlung oder sogar einen Krankenhausaufenthalt und eine nachfolgende Anpassung ihrer Grundmedikation benötigen. Daher stellen Exazerbationen die größte Belastung nicht nur für das Gesundheitssystem durch eine Erhöhung der Behandlungskosten, sondern auch für den Patienten durch die ausgelöste Progression und die Beeinträchtigung ihrer Lebensqualität dar.

Exazerbationen sind mit unterschiedlichen Auslösern assoziiert. Darunter finden sich Allergene, Bakterien, Schwangerschaft, Stress, Umweltverschmutzung, Viren und Zigarettenrauch. Dabei stellen respiratorische Viren die häufigsten Auslöser dar. Die genauen Mechanismen der Initiation der Exazerbation durch die respiratorischen Viren sind jedoch noch nicht verstanden.

Daher wurde in dieser Arbeit die virusbedingte Exazerbation von experimentellem Asthma im Mausmodell untersucht.

In einem ersten Teil wurde in einem bereits etablierten Ovalbumin- und poly(I:C)-basierten Modell die frühen Immunantworten nach der Applikation von poly(I:C) untersucht. Dabei wurde eine zeitliche Kinetik der infiltrierenden Zellen und verschiedener Mediatoren erstellt. Es wurden dabei sowohl Mediatoren der allergischen Entzündung als auch der anti-viralen Immunantwort betrachtet. Hier hat sich gezeigt, dass die Exazerbation durch ein Zusammenspiel von frühen allergischen und anti-viralen Immunantworten initiiert wird. Anschließend wurden die gemessenen Mediatoren anhand der Höhe ihrer gemessenen Konzentration, dem Zeitpunkt ihres Auftretens und der Diskrepanz der Konzentrationen zwischen der Asthmagruppe und der Exazerbationsgruppe sortiert. Anhand dessen lässt sich ein Markerprofil aus IL-6, KC/CXCL1, TNF- α in Verbindung mit IL-5 und IFN- λ 3 für eine Voraussage beziehungsweise frühen Erkennung einer anstehenden Exazerbation vorschlagen. Um zusätzlich auch Auswirkungen der viralen Replikation betrachten zu können, sollte in einem zweiten Teil ein durch Viren induziertes Asthma-Exazerbationsmodell etabliert werden. Hierfür wurden zwei verschiedene respiratorische Viren, ein pandemischer Influenza A-Virus des Subtyps H1N1 von 2009 und ein RSV, verwendet. Zuerst wurde eine allergische

Atemwegsentzündung mittels Sensibilisierung und Provokation mit OVA etabliert und anschließend mit dem jeweiligen Virus infiziert. In beiden Modellen konnten jeweils nicht alle Aspekte der virusvermittelten Asthma-Exazerbation von Patienten (nämlich erhöhte Atemwegshyperreagibilität, erhöhte Mukusproduktion, erhöhte T_H2-vermittelte Entzündung der Atemwege mit erhöhten Eosinophilen und Beteiligung von Neutrophilen und erhöhter Zytokin- und Chemokinproduktion) erreicht werden.

1 Einleitung

1.1 Asthma bronchiale

Das Asthma bronchiale, oder auch nur Asthma genannt, ist eine der häufigsten chronischen Erkrankungen. 2015 war sie die am häufigsten auftretende chronische respiratorische Erkrankung, noch vor der chronisch-obstruktiven pulmonalen Erkrankung (*chronic-obstructive pulmonary disease*, COPD)¹. Sie betrifft alle Altersgruppen von der frühen Kindheit bis zum älteren Erwachsenen, sowie Personen verschiedener ethnologischer Herkunft^{2,3}.

Weltweit leiden ca. 300 Millionen Menschen an Asthma und schätzungsweise wird die Zahl noch um weitere 100 Millionen Menschen bis 2025 ansteigen³. Dabei variieren die Prävalenzen zwischen einzelnen Ländern sehr stark. Vor allem Länder mit einem hohen Einkommen, beziehungsweise einem sogenannten westlichen Lebensstil, haben Prävalenzen von über 15 %, wohingegen Länder mit geringen oder mittleren Einkommen geringere Prävalenzen aufweisen^{2,3}. Allerdings, steigen die Prävalenzen auch in Ländern mit niedrigen oder mittleren Einkommen vermehrt an^{3,4}, gleichzeitig wurde eine Urbanisierung in diesen Ländern beobachtet. Der genaue Zusammenhang ist aber noch nicht abschließend geklärt³.

Die Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, WHO) geht von 417918 Todesfällen aufgrund von Asthma weltweit im Jahr 2016 aus⁵. Hierbei handelt es sich vor allem um Patienten in einkommensschwachen Ländern, in denen die Versorgung mit Medikamenten schwierig ist, oder um generell ältere Patienten. Auch wenn die Todeszahl weltweit vergleichsweise gering erscheint, liegt die eigentliche und größere Bürde des Asthmas in der Verursachung von hohen Kosten. Diese lassen sich in direkte und indirekte Kosten unterteilen. Unter den direkten Kosten lassen sich alle Kosten, die im direkten Zusammenhang mit einer Behandlung stehen, zusammenfassen. Dazu zählen unter anderem Medikamente, Arztbesuche, Untersuchungen und Krankenhausaufenthalte. Die indirekten Kosten hingegen entstehen durch von der Krankheit verursachte Fehlzeiten in der Schule oder im Erwerbsleben, beziehungsweise der verminderten Produktivität trotz Anwesenheit oder durch Berufsunfähigkeit. Allein in Deutschland gehen 370000 Arbeitstage pro Jahr verloren⁶. Die Gesamtkosten von direkten und indirekten Kosten belaufen sich schätzungsweise auf 72,2 Milliarden Euro pro Jahr alleine in Europa⁷. In den USA werden diese Kosten auf 56 Milliarden US Dollar pro Jahr geschätzt⁸.

Epidemiologische Daten werden zumeist über das Auftreten von Asthmasymptomen in einem bestimmten Zeitraum erhoben. Auch die Globale Initiative für Asthma (*Global Initiative for Asthma*, GINA) definiert Asthma über seine Symptome. Dabei handelt es sich um respiratorische Symptome, wie Giemen, Atemnot, Engegefühl in der Brust und Husten, die über

die Zeit in ihrer Häufigkeit und in Intensität stark variieren können. Diese kommen zusammen mit einer Verminderung des expiratorischen Atemflusses, also einer Schwierigkeit beim Ausatmen, vor.^{9,10}

1.1.1 Pathophysiologie

Die bereits genannten Symptome entstehen häufig durch eine chronische Entzündung der Atemwege, die wiederum zu einer Hyperreagibilität und zu deren Umbau führt. Dabei wird auf äußere Reize mit einer erhöhten Obstruktion, also einer Verengung der Atemwege reagiert.^{9,11} Des Weiteren können sich Form und Anzahl verschiedener Zelltypen oder deren Zusammensetzung innerhalb der Atemwege verändern, hierbei handelt es sich vor allen Dingen um die Hyperplasie der mukusproduzierenden Becherzellen und die Hyperplasie und Hypertrophie der glatten bronchialen Muskelzellen.^{11,12}

Lange Zeit galt Asthma als einheitliche Erkrankung. Man unterschied lediglich hinsichtlich der Ursachen, das allergische extrinsische Asthma, ausgelöst durch äußere Faktoren wie Allergene, Luftverschmutzung und Zigarettenrauch, von dem nicht-allergischen intrinsischen Asthma, mit unklarer Ätiologie.¹³⁻¹⁵

Allerdings stellte sich im Laufe der Zeit heraus, dass es sich beim Asthma vielmehr um eine sehr heterogene Erkrankung im Hinblick auf den Schweregrad, die Entstehung, den Verlauf und die beteiligten Pathomechanismen, sowie das Ansprechen auf die Behandlung handelt.¹⁵ Daher wird Asthma heute auch häufig als Syndrom bezeichnet.^{16,17} Eine Klassifizierung dieser Heterogenität erfolgt heute zumeist entweder anhand von klinischen Charakteristika in sogenannte Asthma-Phänotypen¹⁷⁻²⁰ beziehungsweise anhand von den beteiligten Pathomechanismen in Asthma-Endotypen^{16,21,22}. Beide Typformen lassen sich auch vereinfacht als Subtypen bezeichnen. Abbildung 1.1 zeigt exemplarisch eine Einordnung verschiedenster Subtypen anhand des Zeitpunkts ihres Auftretens (klinisches Charakteristikum) und eines Vorhandenseins einer Eosinophilie (zugrundeliegender Pathomechanismus). Hierbei wird deutlich, dass eine klar abgegrenzte Einteilung der einzelnen Subtypen bis heute schwierig ist.²³

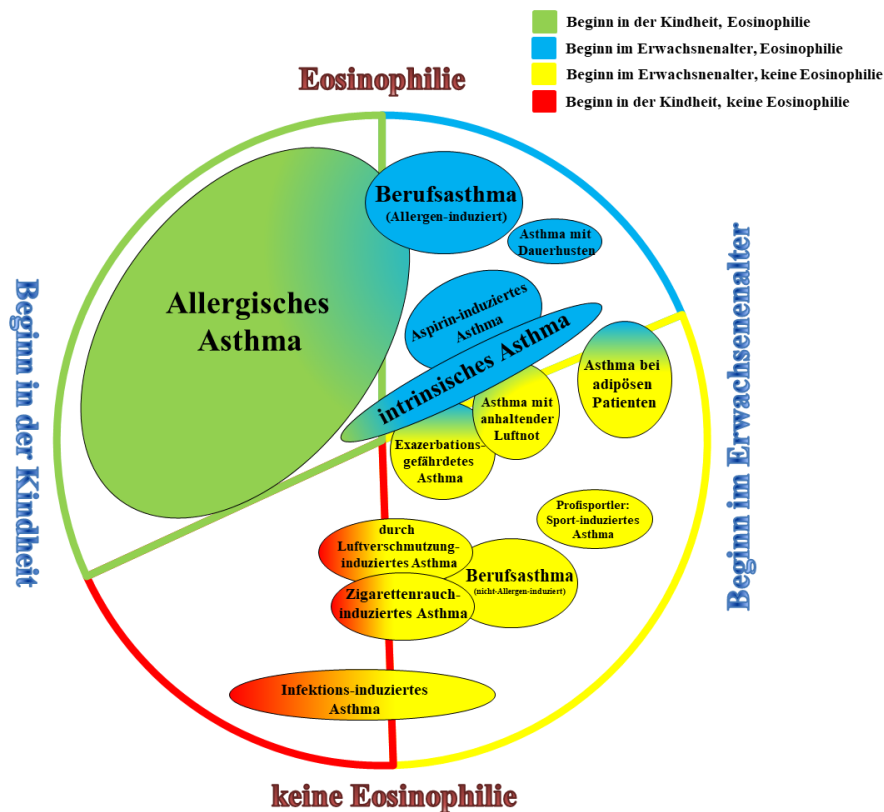


Abb. 1.1: Einordnung verschiedener Subtypen des Asthmas anhand des Zeitpunkts des Auftretens und dem Vorhandensein einer Eosinophilie nach Hekking und Bel²³

1.1.2 Immunpathogenese

Das allergische Asthma, welches für mehr als 80 Prozent der Fälle von Asthma bei Kindern²⁴ und einer Mehrheit der Asthma-Fälle bei Erwachsenen^{19,20,22,25} verantwortlich ist, stellt somit den häufigsten Subtyp dieser heterogenen Erkrankung dar.

Diese Form des Asthmas etabliert sich nach einer Sensibilisierung gegenüber Umwelt-Antigenen zumeist im Kindesalter²⁶ und geht mit anderen atopischen Erkrankungen, wie der atopischen Dermatitis, allergischen Rhinitis oder einer Lebensmittelallergie einher^{13,24,27,28}. Bei den Antigenen handelt es sich zum Beispiel um Hausstaubmilben, Pollen, Schimmelpilze oder Tierhaare, die durch die Luft übertragen werden.²⁹⁻³¹

Prinzipiell lässt sich das allergische Asthma in verschiedene Phasen der Entstehung einteilen. Die erste Phase stellt die Sensibilisierung dar, bei der das Antigen erstmals in die Atemwege eintritt. Dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs) nehmen die Antigene im Atemwegslumen oder nach dem Durchtritt der Antigene durch die Epithelzellschicht im Lungengewebe auf. Dabei können unter Umständen die Antigene das Epithel mithilfe einer Protease-Aktivität (zum

Beispiel das Allergen *Der p1* der Hausstaubmilbe) selbstständig überwinden³²⁻³⁶ oder sie sind mit anderen immunstimulierenden Agenzien (zum Beispiel Toll-ähnlichen Rezeptor (*toll-like receptor*, TLR)-Liganden wie das Endotoxin) assoziiert^{37,38}, die den Durchtritt erlauben. Des Weiteren wurden in Asthma-Patienten und Patienten mit atopischer Dermatitis Mutationen beziehungsweise Polymorphismen nachgewiesen, die zu einer gestörten Barrierefunktion der Epithelzellen führen, wodurch Antigene erleichtert durch die Epithelzellschicht treten können³⁸⁻⁴⁰. Gleichzeitig können die Epithelzellen ebenfalls durch die Antigene aktiviert werden. Durch die Aktivierung setzen sie verschiedene lösliche Immunmediatoren, wie *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP)⁴¹⁻⁴⁴, Stammzellfaktor (*stem cell factor*, SCF)^{45,46}, Eotaxin-1/CC-Chemokin-Ligand 11 (CCL11)^{47,48}, Interleukin (IL)-25^{44,49}, IL-33^{44,50-52} und Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF)^{53,54}, frei. Diese wiederum sorgen unter anderem für die Rekrutierung, Aktivierung, Reifung und Erhaltung verschiedener Zelltypen, darunter auch die DCs. Nach der Aufnahme der Antigene von den DCs werden diese prozessiert und auf den Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse II (*major histocompatibility complex class II*, MHCII) geladen. Zudem wandern die aktivierten DCs in die drainierenden Lymphknoten und präsentieren die prozessierten Antigene naiven T Helferzellen (T_H0 Zellen).²⁴ Durch zusätzliche ko-stimulierende Signale und frühes IL-4 wird der Transkriptionsfaktor *Signal transducers and Activators of Transcription 6* (STAT6) in den T_H0 Zellen aktiviert.⁵² Dieser wiederum aktiviert GATA-bindendes Protein 3 (GATA3) und zusammen fördern sie die Entwicklung der T_H0 Zellen zu T Helferzellen des Typs 2 (T_H2-Zellen).^{55,56} Diese wiederum sorgen durch die Sekretion von IL-4 für die weitere Vermehrung und Differenzierung der T_H2-Zellen und ebenfalls von IL-4 zusammen mit IL-13 für den Immunglobulin-Klassenwechsel und die Produktion von antigenspezifischem Immunglobulin (Ig) E durch B-Zellen. Sezerniertes IL-5 sorgt für die Rekrutierung und das Überleben von eosinophilen Granulozyten (Eosinophile) und IL-9 für die Rekrutierung und Differenzierung von Mastzellen.^{24,57} Dabei binden die antigenspezifischen IgE an die hochaffinen IgE Rezeptoren (FcεRI) auf den Mastzellen.^{38,58} Damit sind die Atemwege gegenüber diesem Umwelt-Antigen sensibilisiert. Diese Umwelt-Antigene werden auch als Allergene bezeichnet.

Die erneute Exposition gegenüber den sensibilisierenden Allergenen führt nun innerhalb weniger Minuten zu der sogenannten frühe Phase-Reaktion gefolgt von der späte Phase-Reaktion. Bei sich wiederholendem Allergenkontakt kommt es in der Folge zu einer Chronifizierung der Entzündung.^{24,38}

Die frühe Phase-Reaktion ist vor allem durch die Ausschüttung von Mediatoren durch die mit den allergenspezifischen IgEs besetzten Mastzellen gekennzeichnet.³⁸ Die Allergene binden an das IgE auf den Mastzellen, wodurch eine Kreuzvernetzung der FcεRI erreicht wird, und aktivieren somit eine Signalkaskade, die zu der Ausschüttung von drei unterschiedlichen Klassen an biologisch aktiven Mediatoren führen. Dabei handelt es sich um bereits vorgefertigte und in zytoplasmatischen Granula gespeicherte Mediatoren, von Lipiden abgeleitete Mediatoren, sowie neu produzierte Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren. Letztere spielen vorwiegend für die späte Phase-Reaktion eine Rolle.⁵⁹ In den Granula befinden sich vor allem biogene Amine, wie Histamin oder Serotonin, Glykosaminoglykane, wie Heparin und Chondroitinsulfat, Serinproteasen, wie Tryptasen, Chymasen und Carboxypeptidasen und verschiedene weitere Proteasen, sowie mit den Granula assoziierte Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A (*vascular endothelial growth factor A*, VEGFa). Bei den Lipid-abgeleiteten Mediatoren handelt es sich um Prostaglandine, vor allem Prostaglandin D₂ (PGD₂), Leukotrien B₄ (LTB₄) und Cysteinyl-Leukotriene (cys-LTs), vor allem LTC₄, die durch den Cyclooxygenase- beziehungsweise Lipoxygenase-Weg aus der Arachidonsäure metabolisiert werden. Zusätzlich sezernieren aktivierte Mastzellen Plättchen-aktivierenden Faktor (*platelet activating factor*, PAF).³⁸ Zusammen sorgen diese für die typischen Anzeichen beziehungsweise Symptome der frühen Phase-Reaktion. Hierzu zählen die Vasodilatation, eine erhöhte vaskuläre Durchlässigkeit, die Kontraktion der glatten Bronchialmuskulatur, die zu einer Bronchokonstriktion führt, und eine erhöhte Sekretion von Mukus.³⁸

Dem fügt sich die späte Phase-Reaktion an. In dieser Phase sind neben den Mastzellen auch andere aus dem Blutkreislauf rekrutierte Zellen, vor allem T_H2-Zellen und Eosinophile, von zentraler Bedeutung.³⁸ So werden Eosinophile durch das von den T_H2-Zellen, Makrophagen und Epithelzellen sezernierte *Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted* (RANTES/CCL5) und Eotaxin-1/CCL11 rekrutiert.⁶⁰ Das ebenfalls von T_H2-Zellen und Mastzellen sezernierte IL-5 wird für die terminale Differenzierung, Reifung und Überleben der Eosinophile benötigt.⁶¹ Des Weiteren sezernieren T_H2-Zellen IL-9, welches für das Überleben und die Aktivierung von Mastzellen zuständig ist. Auch durch die Sekretion von TNF- α und IL-13 sorgen Mastzellen und T_H2-Zellen für die weitere Bronchokonstriktion und erhöhte Mukusproduktion.³⁸ Die Eosinophile hingegen schütten zytotoxische Proteine, wie das *major basic protein* (MBP) und das *eosinophil basic protein* (EBP)⁶², aus und sind damit für die Schädigung des Epithels verantwortlich und tragen somit zur Entstehung der Atemwegshyperreagibilität (AHR) bei.⁶³

Bei nachfolgendem und häufigerem Allergenkontakt kommt es schließlich zur Chronifizierung dieser entzündlichen Prozesse. Zudem werden Reparaturmechanismen angeschaltet, die zu einer strukturellen Veränderung, dem Atemwegsumbau (*airway remodeling*), beitragen. Dabei handelt es sich vor allem um die Hyperplasie der Becherzellen, sowie der Hyperplasie der glatten Bronchialmuskelzellen und der Verdickung der Basallamina. Zusammengenommen sorgen diese Prozesse für die für Asthma typische Verengung der Atemwege.³⁸

1.1.3 Therapie

Asthma ist bis heute nicht heilbar. Eine Behandlung der Symptome dient vorwiegend der klinischen Kontrolle der Erkrankung.⁶⁴ Für das Management und die Prävention von Asthma gibt die GINA jedes Jahr einen überarbeiteten Leitfaden, auch für die Behandlung von Asthma, heraus.⁹ Dieser wird oftmals in die nationalen Leitfäden integriert⁶⁵, beziehungsweise dieser Leitfaden wird sogar in verschiedenen Sprachen, auch auf Deutsch¹⁰, zur Verfügung gestellt. Die prinzipielle Standardbehandlung lässt sich in zwei Medikationskategorien unterteilen. Hierbei handelt es sich um die regelmäßig angewendete Dauermedikation (*controllers*) und die kurzzeitige Einnahme von Bedarfs- beziehungsweise Entlastungsmedikamenten (*relievers*).⁹ Bei der Dauermedikation handelt es sich je nach Schweregrad der Grunderkrankung um eine geringe bis hohe Dosis an inhalierten Kortikosteroiden teilweise in Verbindung mit langwirkenden β 2-Antagonisten.^{9,66} Diese wird in Stufen unterteilt und muss regelmäßig kontrolliert und bei Bedarf angepasst werden.⁹

Weiterhin können eine allergenspezifische Immuntherapie^{9,67} beziehungsweise die Verabreichung von sogenannten Biologicals, wie dem anti-IL-13 Antikörper (AK) Omalizumab^{9,65,68,69}, zusätzlich bei allergischen Asthmatikern erfolgen. Ebenfalls kann eine Behandlung mit dem anti-IL-5 Antikörper Mepolizumab bei schwerem Asthma erfolgen, um die Eosinophilie zu reduzieren.^{9,68,69}

Dennoch treten bei einer Vielzahl an Patienten immer wieder akute Verschlimmerungen der chronischen Erkrankung auf, sogenannte Exazerbationen.⁷⁰

1.2 Asthma-Exazerbation

Wie bereits in 1.1.3 erwähnt, stellen Asthma-Exazerbationen die akute Verschlimmerung der chronischen Asthmasymptome dar. Für eben diese Verschlechterungen stehen in erster Linie

die sogenannten Entlastungsmedikamente zur Verfügung, durch die eine solche Verschlimmerung selbstständig von den Patienten abgemildert werden soll. Oftmals reichen diese ersten abmildernden Medikamente jedoch nicht aus und die Patienten sind gezwungen sich in ärztliche Behandlung zu begeben, oder es ist sogar ein Aufenthalt im Krankenhaus von Nöten. Des Weiteren muss ihre Medikation erhöht oder umgestellt werden und im Anschluss ebenfalls angepasst werden.⁹ Exazerbationen stellen somit die größte Belastung nicht nur für das Gesundheitswesen durch eine Erhöhung der Behandlungskosten^{71,72}, sondern auch für den Patienten durch die dadurch ausgelöste Progression der Erkrankung und die damit verbundene Beeinträchtigung ihrer Lebensqualität bis zu der Möglichkeit eines vorzeitigen Todes selbst dar.⁷³

Exazerbationen werden eben auch über die Verschlimmerung der Symptome definiert. Die GINA definiert „Exazerbationen von Asthma als Episoden, die durch eine progressive Zunahme der Symptome Kurzatmigkeit, Husten, Keuchen oder Brustenge und eine progressive Abnahme der Lungenfunktion charakterisiert sind, das heißt sie repräsentieren eine Veränderung des normalen Zustandes des Patienten, welcher ausreicht um eine Änderung der Medikation zu benötigen“.^{9,74}

Studien lassen vermuten, dass Patienten mit kontrollierter Erkrankung lediglich durchschnittlich alle drei Jahre eine Exazerbation erleiden.⁷⁰ Dies ist jedoch eine sehr idealisierte Annahme, da in den zugrundeliegenden Studien Patienten mit häufigen Exazerbationen, sowie mit unkontrollierter beziehungsweise schlecht kontrollierter Erkrankung ausgeschlossen wurden.⁷⁰ Somit ist davon auszugehen, dass eine Mehrheit an Patienten häufiger eine Exazerbation erleiden^{75,76} und somit einem dementsprechend höheren Leidensdruck ausgesetzt sind.

1.2.1 Pathogenese von Asthma-Exazerbationen

Exazerbationen sind mit verschiedenen Auslösern assoziiert. So wurden Allergene, Bakterien, Umweltverschmutzung, Viren, Zigarettenrauch⁷⁷⁻⁷⁹, Schwangerschaft⁸⁰⁻⁸² und Stress^{83,84} als Auslöser nachgewiesen. Dabei stellen Viren die häufigsten Auslöser von Exazerbationen dar.^{70,85,86} Neben den drei am häufigsten auftretenden Viren humanes Rhinovirus (HRV), Respiratorisches Syncytialvirus (RSV) und Influenza A-Virus (IAV)⁸⁷ konnten auch Coronavirus, Parainfluenzavirus, Metapneumovirus, Adenovirus und Bocavirus nachgewiesen werden.^{88,89} Bei allen Viren handelt es sich um respiratorische Viren, die die oberen und unteren Atemwege infizieren können.⁹⁰ Dabei zählt die Mehrheit der Viren zu den Ribonukleinsäure

(*ribonucleic acid*, RNA)-Viren, bei denen doppelsträngige RNA (*double stranded RNA*, dsRNA)-Motive in der Tertiärstruktur oder dsRNA als Intermediate während ihrer Replikation vorkommen.⁹¹⁻⁹⁶ Diese werden durch TLR3, *retinoic acid inducible gene 1* (RIG-I) und *melanoma-differentiation-associated gene* (MDA)-5 vom Immunsystem erkannt.^{97,98} Es zeigen sich unterschiedliche Verteilungsmuster in der Häufigkeit der ausgelösten Exazerbationen der Viren in verschiedenen Altersgruppen der Patienten.⁸⁸

Unterschiedliche Auslöser von Asthma-Exazerbationen können unterschiedliche Entzündungsprofile hervorrufen, so wird in Allergen-vermittelten Exazerbationen die bereits bestehende T_H2-vermittelte, eosinophile Entzündung verstärkt.⁷⁸ Viren und Bakterien hingegen erzeugen zusätzlich zur Verschlimmerung der bereits bestehenden T_H2-vermittelten, eosinophilen Entzündung eine neutrophile Entzündung.^{78,99} Die Mechanismen, die zu dieser neutrophilen Entzündung führen, können jedoch bei den verschiedenen Viren unterschiedlich sein.

So wird bei den HRV davon ausgegangen, dass die Entzündung durch die Freisetzung von Zytokinen und Mediatoren, nach der Etablierung der Infektion in den Epithelzellen der oberen Atemwege, ausgelöst wird. Dabei sind vor allem IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-16, G-CSF, Interferon (IFN)- γ , RANTES/CCL5^{77,100,101} und auch IL-4 und IL-13¹⁰² erhöht. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass bei bronchialen Epithelzellen von Asthmatikern die Induktion der IFN- β -Produktion durch eine HRV-Infektion gestört ist. Dadurch ist die Apoptose der Epithelzellen erniedrigt und die virale Replikation erhöht.¹⁰³

RSV hingegen kann durch zwei unterschiedliche Proteine sowohl eine T_H1-gerichtete als auch eine T_H2-gerichtete Immunantwort auslösen. Das Fusionsprotein (*fusion protein*, F) sorgt für eine T_H1-vermittelte Immunantwort und das Anhangsprotein (*attachment protein*, G) für eine T_H2-vermittelte Immunantwort. Dadurch können verschiedene Zytokinprofile erzeugt werden.⁷⁷ RSV infiziert zudem direkt die Epithelzellen der unteren Atemwege, zerstört diese und sorgt damit für eine Veränderung des Epithelverbands und dessen Barriere.⁷⁷ Es konnte zudem gezeigt werden, dass die IFN- γ -Produktion während einer RSV-Infektion beeinträchtigt sein kann, was wiederum eine Verschiebung zugunsten der T_H2-vermittelten Immunantwort hervorrufen könnte.¹⁰⁴

Influenza-Viren wiederum infizieren und schädigen das Epithel der unteren Atemwege durch ihren zytopathischen Effekt.⁷⁷ Dadurch wird eine Entzündung hervorgerufen, die für die Ausschüttung großer Mengen an IFN- γ sorgt.¹⁰⁵ Zusätzlich konnte in asthmatischen Kindern mit Influenza-Infektion gezeigt werden, dass MBP und RANTES/CCL5 erhöht sind und die Konzentration von RANTES/CCL5 auch mit den klinischen Symptomen korreliert.¹⁰⁶ Bei einer

Infektion von respiratorischen Epithelzellen konnte erhöhte *messenger RNA* (mRNA) und auch Protein von Eotaxin-1/CCL11 nachgewiesen werden.¹⁰⁷ Somit könnten auch Eosinophile an der Pathogenese der Atemwegsentzündung in der Influenza-Virus-ausgelösten Asthma-Exazerbation eine Rolle spielen.

Die genauen Pathomechanismen der Entstehung der virusvermittelten Exazerbation aber sind immer noch nicht verstanden.

1.2.2 Modelle zur Untersuchung von Asthma-Exazerbationen

Auch wenn sich die gänzliche Komplexität des Asthmas nicht modellieren lässt, so gibt es dennoch einige Modelle, die gewisse Teilaspekte der Erkrankung darstellen können. Dazu zählen vielfältige *in-vitro* sowie auch *in-vivo* Modelle.

So gibt es das *air-liquid-interface* (ALI) Modell von humanen oder murinen Bronchialepithelzellen, in dem ein pseudostratifiziertes Epithelium erzeugt wird und anhand dessen die Beteiligung des Epithels an der Pathogenese untersucht werden kann.¹⁰⁸ Nachteilig zeigt sich hier jedoch, dass die Interaktion mit den anderen beteiligten Immunzellen fehlt. Daher ist es als alleiniges Untersuchungsmodell der komplexen Erkrankung nicht ausreichend.

In-vivo Modelle können im Gegensatz dazu die Interaktionen verschiedener Zelltypen und auch Mediatoren aufzeigen. Hier kommen zumeist Mausmodelle zum Tragen. Jedoch zeigen sich auch hier Einschränkungen. Hierbei wird das Asthma als eine Erkrankung vom Menschen als allergische Atemwegsentzündung in der Maus durch systemische Sensibilisierung und anschließende lokale Applikation von Allergenen modelliert.^{109,110}

Hier werden zumeist das Modellallergen Ovalbumin (OVA) in Verbindung mit Aluminiumhydroxid zur Sensibilisierung verwendet, um die für das allergische Asthma typische T_H2 -vermittelte Entzündung zu erreichen oder das klinisch relevantere Hausstaubmilben-Extrakt (*house dust mite*, HDM).^{110,111} Um nun eine Exazerbation zu modellieren, müssen diese Asthma-Modelle mit zusätzlichen Stimuli, den Exazerbationsauslösern, kombiniert werden. Dabei sollte der Zeitpunkt der Behandlung mit den Exazerbationsauslösern gut überlegt sein.

Für die Modellierung einer virusvermittelten Exazerbation von experimentellem Asthma in Mäusen gibt es zusätzlich weitere Möglichkeiten. So kann man ebenfalls die Virusinfektion mithilfe synthetischer Analoga von dsRNA, wie *polyinosinic:polycytidylic acid* (poly(I:C), pIC), modellieren oder einen Virus verabreichen.

Dabei zeigen sich sowohl für poly(I:C) und Viren eigene Vorteile und Nachteile. So ist poly(I:C) im Gegensatz zu Viren nicht infektiös, benötigt somit keine besonderen Sicherheitsvorkehrungen und sie ist nicht auf einen Wirt spezialisiert, kann somit in verschiedenen Tierarten, die die entsprechenden Rezeptoren TLR-3, RIG-I und MDA-5 exprimieren, verwendet werden. Poly(I:C) bildet einen abgegrenzten Teil der Viruspathogenese ab und ist daher in verschiedenen Wirtsspezies gut vergleichbar. Dies jedoch kann auch zum Nachteil werden, da direkte Effekte der Viruspathogenese, wie zum Beispiel eine aktive Schädigung des Epithels durch das Virus, nicht abgebildet und somit deren Auswirkung auf die Immunantwort nicht dargestellt werden kann.

Auch bei den mit Asthma-Exazerbationen assoziierten Viren in humanen Patienten zeigen sich Hürden für die Verwendung in Tiermodellen. So können Rhinoviren der Hauptgruppe in einem Mausmodell nur dann verwendet werden, wenn die Mäuse das humane Interzelluläre Zelladhäsionsmolekül 1 (*intercellular adhesion molecule 1*, ICAM-1) exprimieren, da die Viren ausschließlich an humanes ICAM-1 binden und somit die Zellen infizieren können.¹¹² RSV infiziert Mäuse, zeigt jedoch eine erniedrigte Replikationsrate in Mäusen gegenüber dem Menschen.^{113,114} Influenza-Viren hingegen infizieren, replizieren und erzeugen eine Pneumonie in Mäusen.¹¹⁵

Durch diese vielen Möglichkeiten sollte man sich bewusst machen, welche Teilaspekte der komplexen Erkrankung des Menschen nachgestellt, also modelliert, werden sollen. Somit gibt es viele Entscheidungen zu treffen. Begonnen mit der Auswahl des Tierstammes, des Allergens in Verabreichung mit oder ohne Adjuvans, sowie die Wahl des Exazerbationstriggers, also poly(I:C) oder Virus. Nach all diesen Entscheidungen benötigt man nun noch ein Behandlungsprotokoll in dem die Induktion der Grunderkrankung und die Auslösung der Exazerbation bestimmt werden. Hier gibt es in bereits veröffentlichten Modellen unterschiedliche Ansätze. So gibt es Modelle, die eine Infektion vor die Sensibilisierung und lokale Applikation mit dem Allergen stellen, was jedoch mehr der Fragestellung der Auswirkung einer Viruserkrankung auf die nachfolgende Entstehung von Asthma entspricht und daher nicht als Exazerbation bezeichnet werden kann.¹¹⁶ Des Weiteren gibt es Modelle, die die Infektion mit dem entsprechenden Virus zwischen die Sensibilisierung und Challenge mit dem Allergen setzen.^{117,118} Auch hier besteht das Problem, dass noch keine Entzündung in den Atemwegen herrscht und somit die Mäuse zwar als atopisch bezeichnet werden können, aber noch nicht die für das Asthma kennzeichnende Atemwegsentzündung aufweisen. Auch hier handelt es sich somit nicht um eine Exazerbation einer bereits bestehenden Erkrankung. Die meisten Modelle hingegen setzen die Infektion nach der Sensibilisierung und Challenge

beziehungsweise gegen Ende einer längeren Exposition gegenüber dem Allergen.^{112,119–123} Hierbei ist die Atemwegsentzündung bereits in den Mäusen etabliert. Die Virusinfektion verschlimmert somit eine bereits bestehende Atemwegsentzündung, dadurch kann in diesem Fall von einer Exazerbation laut Definition der GINA gesprochen werden.

In dieser Arbeit soll die virusbedingte Exazerbation von experimentellem allergischem Asthma untersucht werden. Dazu wurde ein bereits in der Arbeitsgruppe etabliertes poly(I:C)-basiertes Modell verwendet.¹²⁴ Zusätzlich sollten OVA-basierte virusvermittelte Exazerbationsmodelle etabliert werden. Es wurden ein Influenza A-Virus aus der Pandemie von 2009¹²⁵ und ein RSV verwendet. Dazu wurden die nachfolgend beschriebenen Fragestellungen (Kapitel 1.3 Zielsetzung) zugrunde gelegt.

1.3 Zielsetzung

Die hier vorliegende Arbeit teilt sich in zwei Teile.

In einem ersten Teil soll ein bereits etabliertes Tiermodell einer poly(I:C)-induzierten Exazerbation experimentellen Asthmas¹²⁴ im Hinblick auf die Entstehung der Exazerbation untersucht werden.

Hierbei wurden vor allem die folgenden Fragestellungen betrachtet:

1. In welchem Zeitraum nach einer „Infektion“ etabliert sich eine Exazerbation?
2. Welche Zellen sind zu welchen Zeitpunkten an der Exazerbation beziehungsweise deren Entstehung beteiligt?
3. Welche löslichen Immunmediatoren spielen bei der Entstehung einer Exazerbation eine Rolle?
4. Lässt sich aus den Ergebnissen ein Markerprofil erstellen, mit dem eine Voraussage beziehungsweise frühzeitige Erkennung einer virusinduzierten Exazerbation möglich ist?

In einem zweiten Teil sollen zwei Tiermodelle für eine virusinduzierte Exazerbation experimentellen Asthmas etabliert und charakterisiert werden. Dafür wurden zwei unterschiedliche respiratorische Viren für die Induktion der Exazerbation verwendet, ein

pandemischer Influenza A-Virus von 2009 und das Respiratorische Syncytialvirus des Stammes A2.

Hierbei wurden jeweils folgende Fragestellungen zugrunde gelegt:

1. Führt eine Virusinfektion mit den oben genannten Viren zu einer weiteren Erhöhung der bereits bestehenden Atemwegsentszündung, welche einhergeht mit einer weiteren Erhöhung der Mukusproduktion, Ausschüttung verschiedenster entzündungsfördernder Mediatoren und Hyperreagibilität der Atemwege?
2. Welche Zellen und löslichen Immunmediatoren spielen für die Entwicklung der Exazerbation eine Rolle?

2 Material

2.1 Applikationen im Tierversuch

Aluminiumhydroxid (Al(OH) ₃) (Imject Alum)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ketamin 100 mg/ml	Richter Pharma, Wels, Österreich
Acetyl-β-methylcholine chloride (Methacholin)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
NaCl 0,9 %	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Ovalbumin (OVA) grade V (Aerosol)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
OVA grade VI (Sensibilisierung)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>polyinosinic-polycytidylic acid</i> (poly(I:C), pIC)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Sevofluran	Ecuphar GmbH, Greifswald, Deutschland
Xylazin 20 mg/ml	cp-pharma, Burgdorf, Deutschland
Trachealkanüle (1 mm)	Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, Deutschland

2.2 Viren

Influenza A-Virus	A/Hamburg/NY1580/09 pH1N1 ¹²⁵	Prof. G. Gabriel, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg, Deutschland
Respiratorisches Syncytialvirus	RSV A2	Prof. S. Ehl, Universitätsklinikum Freiburg, Freiburg, Deutschland
Respiratorisches Syncytialvirus	RSV A2	Virapur LLC, San Diego, CA, USA

2.3 Puffer

Diethylpyrocarbonat (DEPC)-H ₂ O	0,1% DEPC in H ₂ O, autoklaviert
Phosphat-gepufferte Saline (PBS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS+cOmplete	PBS + Protease-Inhibitor cOmplete
Tris-EDTA (TE)-Puffer	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.4 Antikörper

Goat anti Respiratory Syncytial Virus:HRP	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Mouse monoclonal anti-NP	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Rabbit anti-mouse IgG-HRP	Southern Biotech, Birmingham, AL, USA

2.5 Zelllinien, Medien und Zusätze

Hep2 Zellen (Hep2 (HeLa derivative) Cell Line human)	Sigma-Aldrich (ECACC), Steinheim, Deutschland
MDCK (Madin-Darby canine kidney) II Zellen	Prof. G. Gabriel, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg
2x Modified Eagle Medium (+)-L-Glutamine (2x MEM)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Minimum Essential Medium Eagle (MEM)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Avicel RC581	FMC, Philadelphia, PA, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Fetales Bovines Serum (FBS)	PAA Laboratories, Paschingen, Österreich
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Nicht-essentielle Aminosäuren	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin, Streptomycin	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Trypsin-EDTA	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Trypsin-TPCK	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.6 Primer

Zielgen		Primersequenz (5' - 3')	Hersteller
Eotaxin-1/ CCL11	for rev	GAGCTCCACAGCGCTTCTAT GAAGTTGGGATGGAGCCTGG	Eurofins, Luxemburg
FoxP3	for rev	CATGCATCAGCTCTCCACTG TGATCATGGCTGGGTTGTCC	Eurofins, Luxemburg
GATA3	for rev	CCATTACCACCTATCCGCCC CACACTCCCTGCCTTCTGTG	Eurofins, Luxemburg
IFN- β	for rev	GTCCGAGCAGAGATCTTCAGG GAGTCCGCCTCTGATGCTTA	Eurofins, Luxemburg
IFN- γ	for rev	AGGTCAACAACCCACAGGTC GAATCAGCAGCGACTCCTTT	Eurofins, Luxemburg
IL-1 α	for rev	CGCTTGAGTCGGCAAAGAAAT TGGCAGAACTGTAGTCTTCGT	Eurofins, Luxemburg
IL-1 β	for rev	GAGCCCATCCTCTGTGACTC AGTCATATGGGTCCGACAG	Eurofins, Luxemburg
IL-4	for rev	ATGGATGTGCCAAACGTCCT AGCTTATCGATGAATCCAGGCA	Eurofins, Luxemburg
IL-5	for rev	CAAGCAATGAGACGATGAGGC ATTCCACAGTACCCCCACG	Eurofins, Luxemburg
IL-6	for rev	CTCCCAACAGACCTGTCTATAC GTGCATCATCGTTGTTTCATAC	Eurofins, Luxemburg
IL-10	for rev	TGCTATGCTGCCTGCTCTTA ATGTTGTCCAGCTGGTCCTT	Eurofins, Luxemburg
IL-13		Quantitect	Qiagen, Hilden, Deutschland
IL-15		Quantitect	Qiagen, Hilden, Deutschland
IL-17A	for rev	TGTGAAGGTCAACCTCAAAGTCT GAGGGATATCTATCAGGGTCTTCAT	Eurofins, Luxemburg
IL-33	for rev	ACCAAGAGCAAGACCAGGTG CGAGACGTCACCCCTTTGAA	Eurofins, Luxemburg
IP-10/ CXCL10	for rev	CCACGTGTTGAGATCATTGCC TCCACTGGGTAAAGGGGAGT	Eurofins, Luxemburg
IRF7	for rev	CCAGCTCTCACCGAGCG GTTCTTACTGCTGGGGCCAT	Eurofins, Luxemburg
KC/CXCL1	for rev	CAGACCATGGCTGGGATTC GAACCAAGGGAGCTTCAG	Eurofins, Luxemburg
RPL-32	for rev	AAAATTAAGCGAAACTGGCG ATTGTGGACCAGGAACTTGC	Eurofins, Luxemburg
TARC/ CCL17	for rev	AATGTAGGCCGAGAGTGCTG TGGCCTTCTTCACATGTTTG	Eurofins, Luxemburg
T-bet	for rev	CACTAAGCAAGGACGGCGAA TAATGGCTTGTGGGCTCCAG	Eurofins, Luxemburg
TGF- β	for rev	ATTCAGCGCTCACTGCTCTT TCTCTGTGGAGCTGAAGCAA	Eurofins, Luxemburg
TNF- α	for rev	TCGTAGCAAACCACCAAGTG AGATAGCAAATCGGCTGACG	Eurofins, Luxemburg
VEGF α	for rev	GGCCTCCGAAACCATGAACCT CTGGGACCACTTGGCATGG	Eurofins, Luxemburg

2.7 Kits

CBA Mouse Enhanced Sensitivity Flex Sets	Becton Dickinson (BD), Franklin Lakes, NJ, USA
CBA Mouse Flex Sets	Becton Dickinson (BD), Franklin Lakes, NJ, USA
Diff-Quik Schnellfärbekit	Medion Diagnostics, Düdingen, Schweiz
Eotaxin Mouse ELISA Kit	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
IFN- α Mouse ELISA	Affymetrix, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
IFN- β Mouse ELISA	BioLegend, San Diego, CA, USA
IFN- λ 3 Mouse ELISA	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
KC Mouse ELISA	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RNase free DNase I	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
VEGF Mouse ELISA	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

2.8 Zubehör für Virusversuche

Filter: VivaSpin 2, 300000 MWCO, PES-Membran	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Stahlkugeln: 5 mm Durchmesser	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.9 Reagenzien und Chemikalien

Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
cOmplete (Proteaseinhibitor)	Roche, Basel, Schweiz
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Entellan new	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (99 % rein)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Flüssigstickstoff (N ₂)	Westfalen AG, Münster, Deutschland
Histofix (phosphatgepufferte 4 % Paraformaldehyd (PFA)-Lösung)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hämalaun nach Mayer	Merck, Darmstadt, Deutschland
Periodsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Protease-Inhibitor, cOmplete	Roche, Basel, Schweiz
Schiffs Reagenz	Merck, Darmstadt, Deutschland
SuperBlock	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
SYBR Green I Master Mix	Roche, Basel, Schweiz
TriReagent	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Triton-X 100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
TrueBlue Peroxidase Substrate	Kirkegaard and Perry Laboratories Inc. (KPL), Gaithersburg, MD, USA
Trypan Blau 0,4 %	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol	VWR, Darmstadt, Deutschland

2.10 Geräte

Autotechnikon	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Brutschrank: Heracell VIOS 160i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Buxco ®FinePoint Non-Invasive Airway Mechanics (NAM)	Data Sciences International (DSI), New Brighton, MN, USA
Durchflusszytometer: BD Accuri C6	Becton Dickinson (BD), Franklin Lakes, NJ, USA
Färbeautomat	Medite, Burgdorf, Deutschland
LightCycler 480II	Roche, Basel, Schweiz
MACSQuant Analyzer 10	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikroskop: Olympus BX-51	Olympus, Tokio, Japan
Mikroskop: Olympus BX-61	Olympus, Tokio, Japan
Mikrotom HM355 S	Microm, Walldorf, Deutschland
Mikroplatten Reader: Sunrise	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Nanophotometer	Implen, München, Deutschland
PARI Generator: PARI ® Master	PARI, Starnberg, Deutschland
Sicherheitswerkbank: Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Sicherheitswerkbank: MSC-ADVANTAGE	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Sicherheitswerkbank: Mars Safety Class 2	Scanlaf Holding A/S, Lillerød, Dänemark
Thermocycler: Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
TissueLyser LT	Qiagen, Hilden, Deutschland
Wasserbad: VWB12	VWR, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge: Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Zentrifuge: Centrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge: Cytospin 4	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge: Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Zentrifuge: MegaStar 1.6R	VWR, Darmstadt, Deutschland

2.11 Software

cFlow sampler	Becton Dickinson (BD), Franklin Lakes, NJ, USA
<i>computer-assisted stereology tool box</i> (newCAST)	Visiopharm, Hoersholm, DK
FCAP Array™	Becton Dickinson (BD), Franklin Lakes, NJ, USA
FinePoint Software	Data Sciences International (DSI), New Brighton, MN, USA
GraphPad Prism 7	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
LightCycler® 480 Software	Roche, Basel, Schweiz
MACSQuantify Software	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Magellan 7	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
cell^A	Olympus, Tokio, Japan

3 Methoden

3.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Für alle Versuche wurden sechs bis acht Wochen alte weibliche C57BL/6 Mäuse verwendet. Da die Tiere käuflich (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) erworben wurden, starteten die Experimente nach einer einwöchigen Akklimatisierungsphase. Die Mäuse wurden in individuell ventilierten Käfigen (*individual ventilated cage*, IVC) unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten. Der Tag-Nacht-Zyklus wurde künstlich erzeugt und die Temperatur konstant bei 20 °C und die Luftfeuchtigkeit bei 50 Prozent gehalten. Zudem waren Futter und Wasser für die Mäuse *ad libitum* zugänglich.

Die *in vivo* Versuche wurden vom Land Schleswig-Holstein genehmigt und unter Berücksichtigung des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

3.2 Induktion einer akuten Exazerbation von experimentellem Asthma mittels Virus beziehungsweise poly(I:C)

Um Exazerbationen von experimentellem Asthma in Mäusen zu untersuchen, wurde ein etabliertes Mausmodell des experimentellen Asthmas¹²⁴ verwendet. Hierzu wurde eine allergische Entzündung in der Lunge durch systemische Sensibilisierung und anschließend lokale Exposition des artfremden Proteins OVA ausgelöst. Die Sensibilisierung fand durch dreimalige *intraperitoneale* (*i.p.*) Injektion von 10 µg OVA (grade VI) gelöst in 100 µl PBS adsorbiert an 100 µl Aluminiumhydroxid (Al(OH)₃; Alum) statt. Die Injektionen erfolgten an den Tagen eins, 14 und 21 des Versuchsprotokolls (siehe Abb. 3.1, 3.2 und 3.3). Für die Etablierung der lokalen allergischen Entzündung in der Lunge wurden die Mäuse an den Tagen 26 bis 28 für jeweils 20 Minuten in einer luftdichten Kammer einer OVA-Lösung (1 % OVA (grade V) in PBS), welche durch einen PARI®-Generator aerosoliert wurde, ausgesetzt. Analog zu den OVA-behandelten Tieren wurden Kontrolltiere mitgeführt, die lediglich eine Behandlung mit PBS anstelle des OVA erfuhren. Anschließend wurde die Exazerbation in den mit OVA behandelten Mäusen oder die Virusinfektion in den mit PBS behandelten Kontrolltieren entweder durch poly(I:C) (siehe 3.2.1), Influenza A-Virus (siehe 3.2.2) oder Respiratorisches Syncytialvirus (siehe 3.2.3) ausgelöst.

3.2.1 Protokoll zur Auslösung einer akuten Exazerbation von experimentellem Asthma mittels poly(I:C)

Dieses Protokoll erlaubt die Untersuchung der sehr frühen Immunantworten auf das Auslösen einer Exazerbation in asthmatischen Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren. Die Sensibilisierung und lokale Etablierung der Entzündung in der Lunge wurde wie unter 3.2 beschrieben durchgeführt. Im Anschluss an die letzte OVA-Aerosol-Behandlung wurde den Mäusen zur Auslösung der Exazerbation unter Sevofluran-Narkose 50 µl poly(I:C) (4 mg/ml) in PBS oder 50 µl PBS als Kontrolle *intranasal* (*i.n.*) appliziert. Poly(I:C) wird hierbei als Surrogat einer Virusinfektion verwendet. Es stellt ein synthetisches Analog zu doppelsträngiger RNA dar, welche sowohl als Motiv in der Tertiärstruktur als auch als Intermediat bei der Replikation eines Virus vorkommt, und somit eine Virusinfektion modelliert. DsRNA und somit auch poly(I:C) wird vom Immunsystem durch TLR-3, RIG-I und MDA-5 erkannt. Die Analyse der Tiere fand jeweils direkt (null), zwei, vier, acht, zwölf, 24, 48 oder 96 Stunden nach der poly(I:C)-Applikation statt. Daher ergeben sich die Behandlungsgruppen wie folgt: PBS als Gesundheitskontrollgruppe, OVA als Asthmagruppe, poly(I:C) (pIC) als „Virus“-Gruppe und OVA+poly(I:C) als Exazerbationsgruppe.

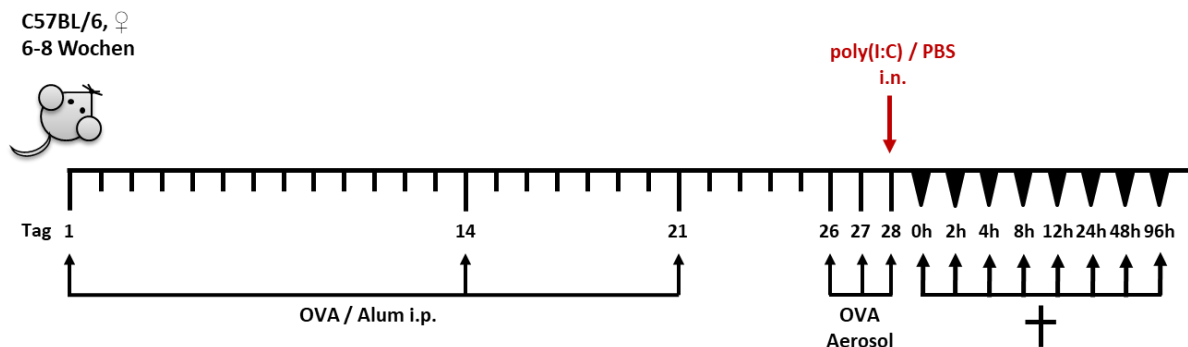


Abb. 3.1: Behandlungsschema zur Auslösung einer akuten Exazerbation von experimentellem Asthma mittels poly(I:C)

3.2.2 Protokoll zur Auslösung einer akuten Exazerbation von experimentellem Asthma mittels Influenza A-Virus

In dem hier beschriebenen Protokoll soll die Pathogenese der durch Influenza A-Virus ausgelösten Exazerbation untersucht werden, hierzu wurde wie bereits unter 3.2 beschrieben in den Mäusen das experimentelle Asthma durch Auslösen einer allergischen Entzündung in der Lunge der Mäuse etabliert. Anschließend wurden die Tiere unter einer *i.p.* injizierten

Ketamin/Xylazin-Narkose durch *i.n.* Applikation mit verschiedenen Dosen eines Influenza A-Virus (A/Hamburg/NY1580/09 pH1N1¹²⁵) infiziert. Die verabreichten Virusdosen reichten über eine geringe Dosis von 1×10^3 Plaque-bildende Einheiten (*plaque-forming units*; pfu) über eine mittlere Dosis von 1×10^4 pfu bis zu einer hohen Dosis von 1×10^5 pfu. Die Analyse der Mäuse fand an Tag 38 des Versuches beziehungsweise neun Tage nach der Infektion statt. Die entsprechenden Kontrollmäuse wurden jeweils mit PBS anstelle des OVA beziehungsweise Virus behandelt. Somit ergeben sich folgende Behandlungsgruppen: PBS als Gesundheitskontrollgruppe, OVA als Asthmagruppe, Influenza A-Virus (H1N1) als Virusinfektionsgruppe und OVA+H1N1 als Exazerbationsgruppe.

Um den transienten Phänotyp der OVA-induzierten Entzündung in der Maus nicht außer Acht zu lassen, wurde das Protokoll in zwei Varianten durchgeführt. Zum einen wurden die Mäuse an den Tagen 35 bis 37 erneut einer Exposition gegenüber einem OVA-Aerosol ausgesetzt bevor sie an Tag 38 analysiert wurden. Zum anderen wurden die Mäuse ohne eine weitere Exposition gegenüber dem OVA-Aerosol nach der Infektion bis zur Analyse an Tag 38 beobachtet.

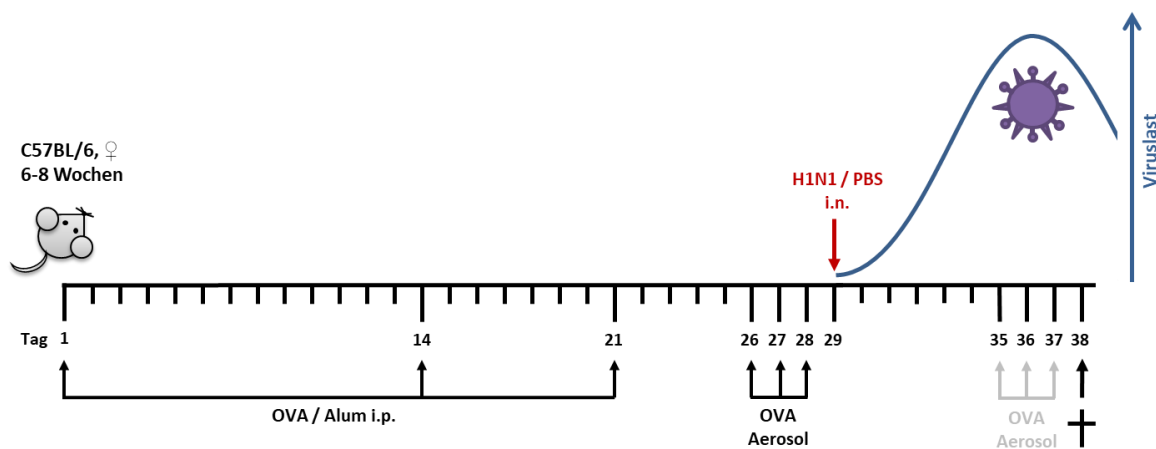


Abb. 3.2: Behandlungsschema zur Auslösung einer akuten Exazerbation von experimentellem Asthma mittels Influenza A-Virus (H1N1)

3.2.3 Protokoll zur Auslösung einer akuten Exazerbation von experimentellem Asthma mittels Respiratorisches Syncytialvirus

Zur Untersuchung der Pathogenese der durch Respiratorisches Syncytialvirus ausgelösten Exazerbation wurde das hier beschriebene Protokoll verwendet. Die allergische Entzündung in der Lunge wurde, wie bereits unter 3.2 beschrieben, in den Mäusen ausgelöst, bevor die Mäuse

an Tag 29 unter einer *i.p.* injizierten Ketamin/Xylazin-Narkose mit zwei verschiedenen Dosen an RSV infiziert wurden. Bei den beiden Virusdosen handelte es sich um eine geringe Dosis von 5×10^3 Infektiösen Einheiten (*infectious units*; IU) und eine hohe Dosis von 5×10^5 IU. Die Analyse der Mäuse fand an drei unterschiedlichen Tagen nach der Infektion statt. Hierbei handelt es sich um den Tag 30 beziehungsweise Tag eins post Infektion, Tag 33 beziehungsweise Tag vier post Infektion und Tag 37 beziehungsweise Tag acht post Infektion. Die Analysetage stellen wichtige Tage innerhalb des Verlaufs der Virusinfektion dar und könnten somit auch wichtige Anhaltspunkte in der Exazerbationsentwicklung sein. Tag eins post Infektion zeigt die erste Erkennung des Pathogens und die erste Immunantwort des Wirtsorganismus gegen den Erreger. An Tag vier post Infektion wird das Replikationsmaximum des Virus in den Mäusen erreicht und an Tag acht sollten die Viren wiederum aus dem Körper des Wirtsorganismus beseitigt sein. Entsprechende Kontrollmäuse wurden mit PBS anstelle des OVA beziehungsweise des Virus behandelt. Es ergeben sich folgende Behandlungsgruppen: PBS als Gesundheitskontrollgruppe, OVA als Asthmagruppe, Respiratorisches Syncytialvirus (RSV) als Virusinfektionsgruppe und OVA+RSV als Exazerbationsgruppe.

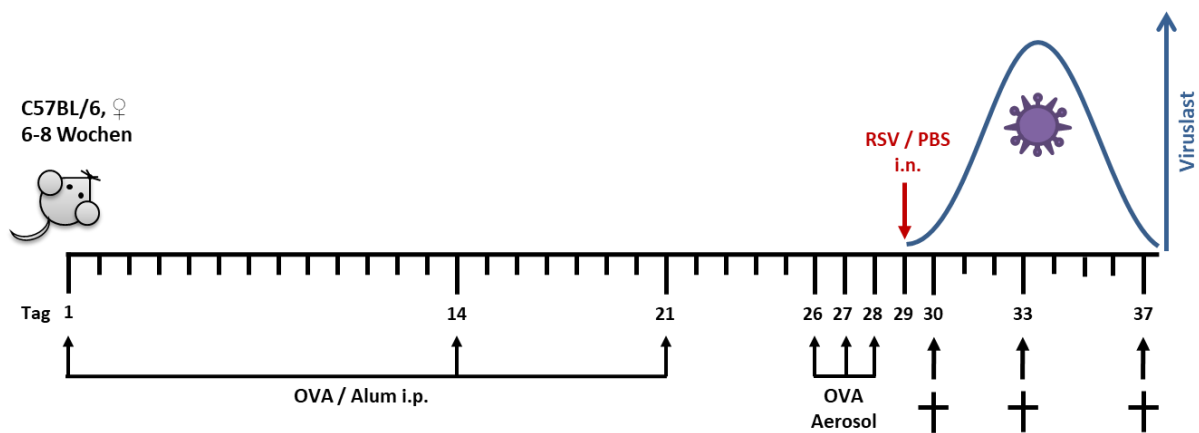


Abb. 3.3: Behandlungsschema zur Auslösung einer akuten Exazerbation von experimentellem Asthma mittels Respiratorisches Syncytialvirus

3.3 Messung der Lungenfunktion

3.3.1 Aufbau und Prinzip der Messapparatur

Die Lungenfunktion spielt bei der Erkennung und Diagnose von Asthma eine wichtige, wenn nicht sogar die wichtigste, Rolle. Da es sich hierbei also um einen klinisch sehr relevanten Parameter zur Erkennung einer asthmatischen Erkrankung handelt, ist er auch in der

Überprüfung eines *in vivo* Mausmodell zur Erkennung einer gestörten Lungenfunktion der unterschiedlich behandelten Mäuse sinnvoll. Da sich bei Mäusen aber die gängigen klinischen Methoden der Spirometrie beziehungsweise der Peak-Flow-Messung aufgrund der benötigten Mitarbeit der Patienten nicht eignet, wurde hier das Prinzip der Body-Plethysmographie eingesetzt. Hierzu wurde ein Buxco FinePoint Non-Invasive Airway Mechanics (NAM) von DSI verwendet. Bei dem Gerät handelt es sich also um einen Ganzkörperplethysmographen, an dem bei nicht-anästhesierten Tieren infolge einer Methacholin-Provokation zur Induktion einer Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur der spezifische Atemwegswiderstand (*specific Resistance airways*; sRaw) und somit die Lungenfunktion bestimmt werden kann.

Der Plethysmograph setzt sich zusammen aus einer Restrainer-Röhre mit einer zusätzlichen Halsmanschette, einer „Endkappe“ mit einer Silikonmanschette zur Abdichtung und Trennung der nasalen von der thorakalen Kammer, und einer Außenröhre, sodass ein in sich geschlossenes System entsteht (Abb. 3.4). Über eine spezielle Verneblervorrichtung können Aerosole, wie das Methacholin, ausschließlich in die nasale Kammer geleitet werden.

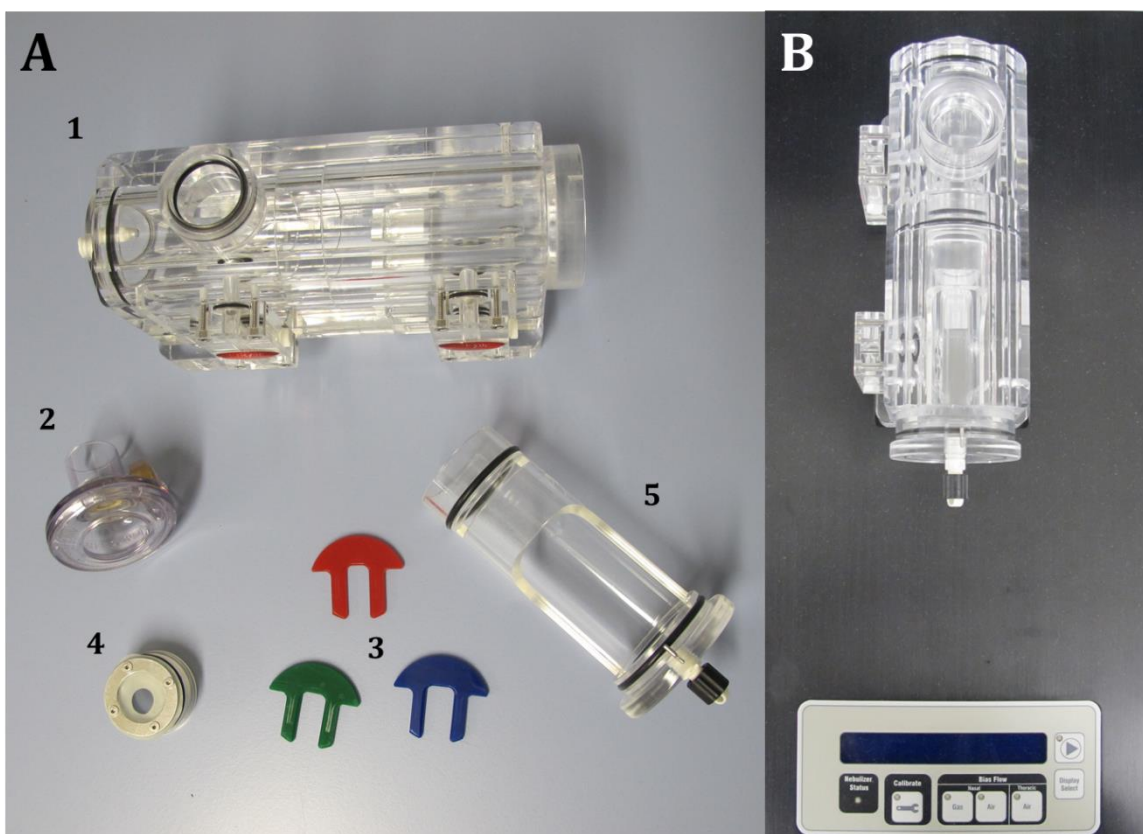


Abb. 3.4: Komponenten und Aufbau des Buxco FinePoint Non-Invasive Airway Mechanics (NAM) von DSI.

In Abbildung A sind die Einzelkomponenten des Plethysmographen dargestellt, wobei 1 die Außenröhre, 2 den Verneblerkopf, 3 die Halsmanschetten, 4 die „Endkappe“ und 5 die Restrainer-Röhre zeigt. Abbildung B zeigt das zusammengesetzte Röhrensystem des Plethysmographen auf der Messeinheit.

Durch den Zwei-Kammer-Aufbau können Druck- beziehungsweise Volumenänderungen durch den Atemfluss in den einzelnen Kammern unabhängig voneinander detektiert werden. Dadurch lassen sich verschiedene Atemparameter aufnehmen beziehungsweise berechnen. Der interessanteste Parameter für die Bestimmung einer Atemwegshyperreagibilität und somit der Lungenfunktion stellt in diesem Falle der spezifische Atemwegswiderstand dar. Der spezifische Atemwegswiderstand errechnet sich aus dem Verhältnis des thorakalen Kammerdrucks und der Atemflussrate in der nasalen Kammer.

3.3.2 Messablauf

Vor dem Start der Messung beziehungsweise der Beladung der Kammern mit den Mäusen wurde der Plethysmograph kalibriert. Nach erfolgreicher Kalibrierung, wurden die Mäuse in die Restrainer-Röhren gesetzt und mit der Halsmanschette fixiert. Anschließend wurde die Endkappe vorsichtig in die Restrainer-Röhre eingesetzt, und die Nase der Maus durch die Silikonmanschette der Endkappe platziert. Die Restrainer-Röhre wurde dann in die Plethysmograph-Kammer geschoben und fixiert. Das nun in sich geschlossene System wurde auf die Messstation gesetzt und eine fünfminütige Akklimatisierungsphase gestartet. Anschließend wurden in aufsteigender Reihenfolge PBS, 3,125 mg/ml, 6,25 mg/ml, 12,5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml und 100 mg/ml Methacholin vernebelt. Es wurden jeweils 20 µl PBS beziehungsweise Methacholin für jeweils 30 Sekunden vernebelt. Anschließend wurde die Reaktion für drei Minuten aufgenommen, gefolgt von einer einminütigen Erholungsphase.

Die Mäuse wurden während der Messung ständig überwacht und bei starken Unregelmäßigkeiten der Atemflüsse vorzeitig aus den Restrainer-Röhren und somit der Messung genommen. Im Anschluss wurden die Mäuse für die weitere Probenentnahme mittels *i.p.* injizierter hochdosierter Ketamin/Xylazin-Narkose getötet.

3.4 Probengewinnung

3.4.1 Serumproben

Die Entnahme des Blutes zur Gewinnung von Serumproben ermöglicht eine systemische Betrachtung der Pathologie der Exazerbation. Sollte sich die lokale Entzündung der Lunge auch

im Serum zeigen, wird die Diagnostik erleichtert, da Blut in Patienten zumeist leichter zugänglich ist, als die noch nachfolgend beschriebenen broncho-alveoläre (siehe 3.4.2) beziehungsweise nasale (siehe 3.4.3) Lavagen. Hierzu wurden die Mäuse mittels einer *i.p.* injizierten, hochdosierten Ketamin/Xylazin-Narkose getötet. Anschließend wurden die Mäuse durch einen Schnitt vom Abdomen bis zum Unterkiefer eröffnet. Mithilfe einer Schere wurde das Zwerchfell durchstoßen und geöffnet, sodass durch das Durchtrennen der Aorta thoracica eine sterile Blutabnahme im Thorax möglich ist. Das Blut wurde anschließend über Nacht bei 4 °C gelagert und am nächsten Tag nach Entfernung des Blutkuchens für 20 Minuten bei 4500 g zentrifugiert. Das Serum wurde abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

3.4.2 Broncho-alveoläre Lavage

Die broncho-alveoläre Lavage (BAL) ermöglicht die genaue Untersuchung der lokalen Entzündungsreaktionen im Hinblick auf infiltrierende Zellen und die Freisetzung löslicher Proteine und Mediatoren in der Lunge. Dazu wurde nach der Blutentnahme der Brustkorb durch Durchtrennen der Rippen auf beiden Seiten und der Halsbereich eröffnet und die Trachea freigelegt. Durch einen kleinen Einschnitt wurde eine Trachealkanüle gelegt und mit einem Faden fixiert. Durch die Trachealkanüle wurde die Lunge mit 1 ml eiskaltem PBS+cOmplete gespült. Anschließend wurde direkt die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt, Zytospins hergestellt und die Lavage für 5 Minuten bei 500 g und 4 °C zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde abgenommen und für die weitere Analyse bei -20 °C gelagert, die Zellen wurden in TriReagent aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

3.4.3 Nasale Lavage

Die nasale Lavage (NAL) ermöglicht die Untersuchung der Entzündungsreaktionen in den oberen Atemwegen. Diese sind vor allem interessant, da sie die natürliche Eintrittspforte der hier verwendeten Viren sind und in den angewandten Protokollen durch die *i.n.* Applikation simuliert wurde. Dafür wurde im Anschluss an die BAL, die Trachea oberhalb der Trachealkanüle mit einem Faden abgebunden. Oberhalb der abgebundenen Trachea wurde eine Spritzenkanüle in die Trachea cranial eingeführt und langsam 0,5 ml eiskaltes PBS+cOmplete mit Hilfe einer Spritze injiziert. Das PBS+cOmplete wurde an der Nase aufgefangen und für die weitere Analyse bei -20 °C aufbewahrt.

3.4.4 Lungenproben zur Generierung von Lungenpulver oder Lungenhomogenat

Die Entnahme des Lungengewebes für weitere Untersuchungen zeichnet ein vollständigeres Bild der Immunreaktionen in der Lunge. Deshalb wurde nach der Blutentnahme und den Lavagen die Lunge herauspräpariert. Die Lungenlappen der entnommenen Lunge wurden in kleine Stücke geschnitten, in Schraubdeckelröhren gegeben und in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

3.5 Zytospins und Zelldifferenzierung

Die an den Entzündungsreaktionen in der Lunge beteiligten Immunzellen können durch die BAL aus dem Lungenlumen, in das sie eingewandert sind, ausgespült und somit analysiert werden. Dazu wurden 50 µl der BAL verdünnt mit PBS (1:4) für 5 Minuten bei 320 g auf einen Objektträger zentrifugiert und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur (RT) trocknen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Zytospins mit einem Schnellfärbekit (Diff-Quik) nach Herstellerangaben fixiert, gefärbt und im Anschluss mit Entellan new und Deckgläschen eingedeckt. Es handelt sich hierbei um eine Färbung nach Pappenheim, in der Färbungen mit Eosin Y (saurer Farbstoff) und einem Thiazin-Farbstoff (basischer Farbstoff) kombiniert wird. Somit konnte eine Differenzierung der Zellen anhand morphologischer Kriterien am Mikroskop erfolgen.

3.6 Histologie der Lunge

3.6.1 Lungenpräparation unter standardisierten Bedingungen für die Histologie

Um eventuelle Gewebsveränderungen der Lunge vergleichend zwischen den Behandlungsgruppen betrachten zu können, müssen die Lungen unter standardisierten Bedingungen für die Histologie entnommen und entfaltet werden. Hierzu wurden die Lungen nach den bereits zuvor beschriebenen Probenentnahmen aus der Maus herauspräpariert. Anschließend wurden die Lungen durch die Trachealkanüle an einem Trichter frei hängend mit Histofix für 20 Minuten bei einem Druck von einer 20 cm-Wassersäule entfaltet. Nach Ablauf der 20 Minuten wurde die Trachea unterhalb der Trachealkanüle abgebunden, damit das

Histofix nicht wieder herauslaufen konnte und in ein mit Histofix gefülltes Gläschen gegeben. Die Lungen wurden über Nacht bei 4 °C fixiert. Nachfolgend wurden die Lungen in zweiprozentigem Agar-Agar eingebettet und aufgrund ihrer anisotropen Orientierung mittels Orientator-Prinzip¹²⁶ in randomisierter Orientierung¹²⁷ in 2 mm dicke Scheiben geschnitten. Diese Lungenscheiben wurden über Nacht in einem Autotechnikon entwässert und anschließend in Paraffin gegossen. Von den Paraffinblöcken wurden 3 µm dicke Schnitte für verschiedene Färbungen und die histologische Betrachtung geschnitten.

3.6.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung dient hier als Übersichtsfärbung um einen ersten Eindruck über die Strukturen des Lungengewebes zu erhalten. Durch ihre zwei zugrundeliegenden Farbstoffe, Hämatoxylin und Eosin, werden demnach unterschiedliche Strukturen mit unterschiedlichen Farben angefärbt und somit unterscheidbar gemacht. Bei Hämatoxylin handelt es sich um einen basischen Farbstoff, der saure beziehungsweise basophile Strukturen, wie den Zellkern und das raue Endoplasmatische Retikulum blau färbt. Eosin ist ein saurer Farbstoff, der wiederum basische beziehungsweise azidophile Strukturen, wie Zellplasmaproteine, Mitochondrien, das glatte Endoplasmatische Retikulum, Keratin und Kollagen, rot färbt. Die HE-Färbungen in dieser Arbeit wurden in dem Färbeautomat der Pathologie des Forschungszentrums Borstel durchgeführt.

3.6.3 Periodsäure-Schiff-Färbung

Bei der Periodsäure-Schiff (PAS)-Färbung hingegen handelt es sich bereits um eine spezifischere Färbung. Hierbei können die kohlenhydrathaltigen Komponenten, wie die Glykoproteine, Muzine oder Glykolipide, des Mukus in Becherzellen angefärbt und nachgewiesen werden. Dazu werden die in den Bestandteilen des Mukus befindlichen Glykole durch die Periodsäure zu Aldehydgruppen oxidiert. Die in dem Schiffschens Reagenz befindliche Fuchsin-schweflige Säure reagiert anschließend mit den zuvor gebildeten Aldehydgruppen und bildet eine pink-rote Färbung. Die oben beschriebene Hämatoxylin-Färbung wird als Gegenfärbung eingesetzt.

Die Schnitte der Tiere mit Exazerbationen, die durch poly(I:C) und durch Influenza A-Virus ausgelöst wurden, wurden im Färbeautomat der Pathologie des Forschungszentrum Borstel gefärbt.

Die Schnitte der Tiere mit RSV-induzierter Exazerbation wurden in Färbeküvetten in den Laboren der Arbeitsgruppe durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte zuerst in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Dazu wurden die Schnitte zweimal für 12 Minuten in Xylol, zweimal für 5 Minuten in hundertprozentigen Ethanol, einmal für 5 Minuten in 96-prozentigen Ethanol und zweimal für 5 Minuten in 70-prozentigen Ethanol gegeben. Danach wurden die Schnitte gefärbt. Dafür wurden die Schnitte zweimal mit Leitungswasser gespült und anschließend für 10 Minuten in einer einprozentigen Periodsäure-Lösung gefärbt. Anschließend wurde wieder mit Leitungswasser gespült und mit Schiff's-Reagenz für 15 Minuten gefärbt. Danach erfolgte eine erneute Spülung mit Leitungswasser und eine Färbung mit Hämalaun-nach-Mayer-Lösung für 2 Minuten. Die Schnitte wurden durch fünfminütiges Spülen mit warmem Leitungswasser gebläut. Im Anschluss wurden die Schnitte wieder mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Dazu wurden die Schnitte jeweils zweimal für 5 Minuten in 70-prozentigen Ethanol, einmal für 5 Minuten in 96-prozentigen Ethanol, zweimal für 5 Minuten in hundertprozentigen Ethanol und zweimal für 5 Minuten in Xylol gegeben. Zum Abschluss wurden die gefärbten Schnitte mit Entellan new und Deckgläschen eingedeckt.

3.7 Quantifizierung von Mukus in Atemwegen

Eine Quantifizierung von Mukus erfolgte an PAS-gefärbten Lungenschnitten (siehe 2.2.6.3). Dafür wurde die Software *new Computer Assisted Stereology Toolbox (newCAST)* verwendet. Das Programm bietet verschiedene Werkzeuge für eine stereologische Auswertung. Zuerst wurde festgelegt, wie viel Prozent des gesamten Präparats analysiert werden sollen, damit nicht das gesamte Präparat analysiert werden muss. Anschließend wurden von dem Programm Bildausschnitte nach dem Prinzip des Systematic Uniform Random Sampling (SURS) definiert. Des Weiteren wurde ein Raster aus Linien und Punkten über die Bildausschnitte gelegt, die eine stereologisch valide Quantifizierung des Mukus ermöglicht. Die so ermittelten Werte wurden zur Berechnung verschiedener Parameter verwendet. Um den prozentualen Anteil der Fläche der Basallamina, die von Becherzellen besetzt ist, zu ermitteln, wurden die Oberflächenbereiche der Becherzellen (S_{gc}) und der Basallamina (S_{ep}) in Verhältnis gesetzt (Formel 1). Zusätzlich

wurde das Volumen des Mukus (V_{mucin}) auf den Oberflächenbereich der Basallamina (S_{ep}) normiert (Formel 2).

Formel 1:
$$\frac{S_{gc}}{S_{ep}} = \frac{\sum I_{gc}}{\sum I_{ep}}$$

Formel 2:
$$\frac{V_{mucin}}{S_{ep}} = LP \times \frac{\sum P_{mucin}}{2} \times \sum I_{ep}$$

$\sum I_{gc}$ ist die Summe aller Linien, die eine Becherzelle schneidet. $\sum I_{ep}$ ist die Summe aller Linien, die die Basallamina schneiden. LP ist die Länge einer Rasterlinie bei der Vergrößerung, bei der die Auswertung erfolgt. Und $\sum P_{mucin}$ ist die Summe aller Punkte, die auf Mukus liegen.

3.8 Herstellung von Lungenpulver und Lungenhomogenat

3.8.1 Herstellung von Lungenpulver für die Isolation von RNA

Für die Herstellung von Lungenpulver wurden die zuvor eingefrorenen kompletten, aber in Stücke geschnittene, Lungen wieder in flüssigen Stickstoff gegeben. Des Weiteren wurden Mörser, Pistill, Spatel und frische Schraubdeckelröhrchen mithilfe von flüssigem Stickstoff gekühlt. Die Lungen wurden zusammen mit flüssigem Stickstoff in den Mörser gegeben und zu feinem Pulver zerrieben, dabei wurde das Auftauen der Proben durch Zugabe von weiterem flüssigem Stickstoff verhindert. Für die anschließende RNA-Isolierung wurden ca. 30 mg Lungenpulver in ein Schraubdeckelröhrchen abgewogen und das restliche Lungenpulver in ein weiteres Schraubdeckelröhrchen gegeben. Das Lungenpulver wurde bei -80 °C gelagert.

3.8.2 Herstellung von Lungenhomogenat für die Isolation von RNA

Von den gefrorenen Lungenstücken wurde das Gewicht ermittelt. Danach wurden 350 µl RLT-Puffer mit 3,5 µl β-Mercaptoethanol versetzt, eine 5 mm Stahlkugel zugefügt und im

TissueLyser LT für 3 Minuten mit einer Frequenz von 50 Hz homogenisiert. Nachfolgend wurden die Proben für 3 Minuten bei 16100 g zentrifugiert und der gewebefreie Überstand für die RNA-Isolierung weiterverwendet beziehungsweise in ein neues sauberes Reaktionsgefäß übertragen und bei -80 °C aufbewahrt.

3.8.3 Herstellung von Lungenhomogenat für die Bestimmung des Virustiters

3.8.3.1 Influenza A-Virus

Von den gefrorenen Lungenstücken wurde das Gewicht ermittelt. Danach wurden 1 ml PBS und eine 5 mm Stahlkugel zugefügt und im TissueLyser LT für 10 Minuten mit einer Frequenz von 50 Hz homogenisiert. Nachfolgend wurden die Proben bei 6000 g und 4 °C für 7 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues sauberes Reaktionsgefäß übertragen und für die Virustiterbestimmung verwendet. Der restliche Überstand wurde bei -80 °C aufbewahrt.

3.8.3.2 Respiratorisches Syncytialvirus

Von den gefrorenen Lungenstücken wurde das Gewicht ermittelt. Danach wurden 1 ml PBS und eine 5 mm Stahlkugel zugefügt und im TissueLyser LT für 5 Minuten mit einer Frequenz von 50 Hz homogenisiert. Nachfolgend wurden die Proben für die Virustiterbestimmung weiterverwendet, beziehungsweise in ein neues sauberes Reaktionsgefäß übertragen und bei -80 °C aufbewahrt.

3.9 RNA-Isolierung aus Lungengewebe

Die RNA für Expressionsanalysen wurde mithilfe des RNeasy MiniKits von Qiagen nach Herstellerangaben isoliert. Dabei wurde pro Säule RNA aus circa 30 mg Gewebe isoliert. Um eine Kontamination mit Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA) zu verringern beziehungsweise zu beseitigen wurde eine zusätzliche Inkubation der RNA auf der Isolationssäule mit DNase I für 15 Minuten durchgeführt. Anschließend wurde die RNA-Konzentration mit einem Nanophotometer bestimmt und die RNA bei -80 °C gelagert.

3.10 reverse Transkription

Da eine quantitative Expressionsanalyse der mRNA nicht direkt möglich ist, muss zuvor die mRNA in cDNA umgeschrieben werden. Dies erfolgte mithilfe des Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurden jeweils 1 µg mRNA mithilfe eines Thermocyclers in cDNA umgeschrieben. Der Reaktionsansatz wurde zuerst für 10 Minuten bei 25 °C und anschließend für 15 Minuten bei 50 °C inkubiert. Die Reaktion wurde nachfolgend bei 85 °C für 5 Minuten abgestoppt. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

3.11 Real-Time quantitative Polymerase Kettenreaktion

Die real-time quantitative Polymerase Kettenreaktion (*real-time quantitative polymerase chain reaction*, RT-qPCR) dient der relativen Quantifizierung der zuvor generierten cDNA. Die cDNA wurde vor der Einsetzung als Matrize in der RT-qPCR 1:20 mit DEPC-Wasser verdünnt. Es wurden 2,5 µl verdünnte cDNA mit 5 µl SYBR Green I Master Mix, 1,5 µl DEPC-Wasser, sowie je 0,5 µl der entsprechenden forward beziehungsweise reverse Primern des Zielgens oder 1 µl eines Quantitect-Primers versetzt. Bei der Negativkontrolle wurden 2,5 µl DEPC-Wasser anstelle der cDNA eingesetzt. Die PCR erfolgte anschließend in einem LightCycler 480II. Bevor die PCR mit ihren 45 Amplifikationszyklen startet, wurde die cDNA für 10 Minuten bei 94 °C denaturiert. Da in den ersten Amplifikationszyklen eine erhöhte Spezifität der Primerbindung an die cDNA erreicht werden soll, wurde ein sogenanntes „Touchdown“-Protokoll verwendet, bei dem der erste Zyklus mit einer Annealingtemperatur von 63 °C startete. Anschließend wurde bei jedem Zyklus die Temperatur um 0,5 °C bis auf eine Endtemperatur von 58 °C erniedrigt, was zu einer erhöhten Amplifikationsrate führte. Jeder Zyklus endete zusätzlich mit einer Elongationsphase bei einer Temperatur von 72 °C. In der Auswertung wurde jeweils das Verhältnis des gewünschten Gens zu einem Referenzgen, in dieser Arbeit „*ribosomal protein L32*“ (RPL-32), bestimmt. Die verwendeten Primer dieser Arbeit sind unter 2.6 aufgelistet.

3.12 Protein-Konzentrationsbestimmung

Neben den Zellen und den Gewebsveränderungen geben auch lösliche Botenstoffe, wie Cytokine, Chemokine und andere immunmodulierende Mediatoren, wichtige Informationen über die Entzündungsprozesse. Daher wurde in der hier vorliegenden Arbeit die Konzentration ebensolcher Stoffe in der BAL, NAL und im Serum durch zwei Methoden bestimmt.

3.12.1 Cytometric Bead Array

Ein Vorteil des Cytometric Bead Array (CBA) besteht darin, dass man in einem geringen Probenvolumen von nur 50 µl mehrere Zytokine und Chemokine zeitgleich messen kann. Dieser Vorteil ergibt sich aus dem „Bead“-Prinzip (siehe auch Abb. 3.5). Hierbei handelt es sich um Partikel mit spezifischer Größe und Eigenfluoreszenz, die mit spezifischen Antikörpern für ein bestimmtes Protein beschichtet sind. Nach der Zugabe der Proben wurde ein zweiter Phycoerythrin (PE)-markierter Detektionsantikörper zugegeben. Über die Fluoreszenzintensität des PE an dem Detektionsantikörper kann nachfolgend die Konzentration bestimmt werden. Dazu wurde zusätzlich eine Standardkurve mit den jeweiligen Proteinen erstellt.

In dieser Arbeit wurden für die folgenden Cytokine IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A, IFN- γ und TNF der enhanced sensitivity CBA verwendet, der einen Detektionsbereich von 0 fg/ml bis 200000 fg/ml aufweist. Für die nachfolgenden Cytokine und Chemokine IL-1 α , IL-5, IL-10, IFN- γ , KC/CXCL1 (funktionelles Homolog zu IL-8) und RANTES/CCL5 wurde der CBA verwendet, der einen Detektionsbereich von 0 pg/ml bis 2500 pg/ml aufweist. Bei Cytokinen, die in beiden CBAs aufgezählt wurden, wurde nach Verfügbarkeit der enhanced sensitivity CBA vornehmlich verwendet.

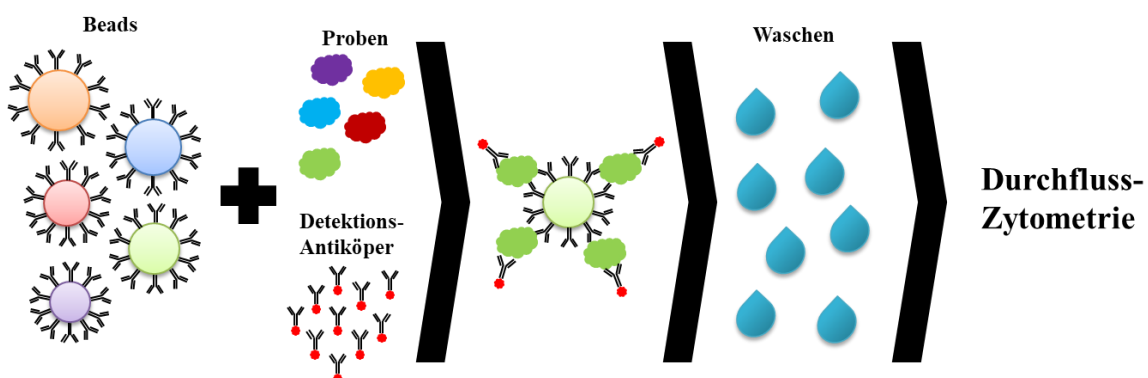


Abb. 3.5: Funktionsprinzip des Cytometric Bead Arrays

3.12.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Eine zweite Methode zur Konzentrationsbestimmung löslicher Proteine ist der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Nachteilig bei dieser Methode ist, dass sich lediglich ein Protein in einem relativ großen Probenvolumen ermitteln lässt. In dieser Arbeit wurden für die Bestimmung der nachfolgenden Proteine Eotaxin-1/CCL11, IFN- α , IFN- β , IFN- λ 3, KC/CXCL1 (funktionelles Homolog zu IL-8) und VEGF ELISA Kits verschiedener Hersteller verwendet. Die Assays wurden jeweils nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Prinzip für die verschiedenen Assays ist jedoch immer gleich (siehe auch Abb. 3.6). Ein immobilisierter Primärantikörper bindet das in der Probe befindliche Protein, welches wiederum von einem Biotin-gekoppelten Detektionsantikörper gebunden wird. Das an dem Detektionsantikörper gekoppelte Biotin wiederum bindet an Streptavidin, welches mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden Waschschriffe durchgeführt. Die Meerrettich-Peroxidase kann nun im letzten Schritt das farblose Substrat TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin) in ein blaues Substrat umsetzen. Durch Zufügen einer Stop-Lösung (zum Beispiel Salzsäure (HCl) oder Schwefelsäure (H₂SO₄)) schlägt die blaue Färbung in eine gelbe Färbung um. Die Konzentration wurde anschließend anhand der Absorption einer bestimmten Wellenlänge (450 nm) und einer Standardkurve mit bekannten Konzentrationen mithilfe eines Absorptionsphotometers (Mikroplatten Reader) ermittelt. Die Auswertung erfolgte mit der Magellan 7 Software.

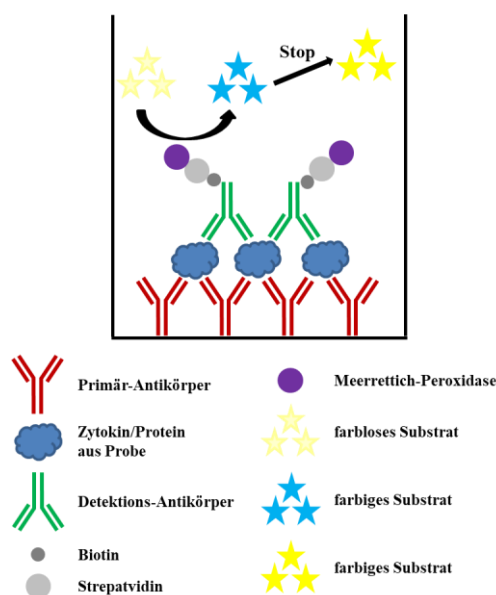


Abb. 3.6: Funktionsprinzip eines Sandwich-ELISA

3.13 Virustiterbestimmung mittels Plaque-Test

Eine Bestimmung des Virustiters erlaubt Rückschlüsse über den Verlauf, beziehungsweise die Bekämpfung der Virusinfektion durch den Wirtsorganismus. Daher wurden jeweils die Virustiter in den Lungen der infizierten Tiere bestimmt.

3.13.1 Influenza A-Virus

Zur Vorbereitung des Plaque-Tests wurden zwei Tage vor der Inokulation mit dem Virus, die MDCKII-Zellen in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Am Tag der Inokulation mit dem Virus waren die Zellen 100 Prozent konfluent in einem Monolayer.

Nach der Herstellung des Lungenhomogenats und der Zentrifugation (siehe 3.8.3.1) wurde von den gewebefreien Überständen serielle 1:10-Verdünnungen in PBS von 10^{-1} bis 10^{-6} hergestellt. Dazu wurden 360 μ l PBS in 24-Well-Platten vorgelegt und 40 μ l des Überstandes in das Well für die 10^{-1} -Verdünnung gegeben und seriell weiterverdünnt. Das Kulturmedium (MEM + 10 % FBS + 1 % Penicillin/Streptomycin + 2 mM L-Glutamin) der MDCKII-Zellen wurde abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Für die Inokulation der Zellen wurden jeweils 333 μ l der Verdünnungen zu den Zellen gegeben und für 30 Minuten bei 37 °C im Zellkultur-Inkubator inkubiert. Nach Ablauf der 30 Minuten wurden 3 ml Overlay-Medium (MEM + 0,2 % BSA + 1 % Penicillin/Streptomycin + 2 mM L-Glutamin + 1,25 % Avicel RC581 + 1 μ g/ml Trypsin-TPCK) pro Well zugefügt und weiterhin ohne Bewegung bei 37 °C und 5 % CO₂ im Zellkultur-Inkubator für 72 Stunden inkubiert.

Nach Ablauf der 72 Stunden wurden die Plaques mittels immunhistochemischer Färbung nachgewiesen. Dazu wurden das Overlay-Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen und mit 1 ml Histofix für 30 Minuten bei 4 °C fixiert. Danach wurden die Zellen mit 1 ml 0,3 % Triton-X 100 in PBS für 30 Minuten bei RT unter Schütteln permeabilisiert. Nun wurden die Zellen mit 500 μ l Primärantikörper (Mouse monoclonal anti-NP, 1:1000 in SuperBlock) pro Well unter Schütteln für 1 Stunde bei RT inkubiert und anschließend dreimal mit je 1 ml Waschpuffer (0,05 % Tween-20 in PBS) gewaschen. 500 μ l des Sekundärantikörpers (Rabbit anti-mouse IgG-HRP) wurden pro Well zugegeben und für 1 Stunde unter Schütteln bei RT inkubiert und erneut dreimal mit je 1 ml Waschpuffer gewaschen. Die Zellen wurden nun mit 400 μ l TrueBlue™ Peroxidase Substrat für 15 Minuten bei RT und Schütteln gefärbt. Abschließend wurde die Färbung mit kaltem Leitungswasser

abgestoppt und die Zellen an einem dunklen Ort trocknen gelassen. Die Anzahl der Plaques wurde ausgezählt.

3.13.2 Respiratorisches Syncytialvirus

Zwei Tage vor der Inokulation der Hep2-Zellen mit dem Virus wurden 5×10^4 Zellen pro Well in 24-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Am Tag der Inokulation mit dem Virus waren die Zellen ca. 80 Prozent konfluent.

Von dem Lungenhomogenat (siehe 3.8.3.2) wurden serielle 1:10-Verdünnungen mit Adsorptionsmedium (MEM ohne Zusätze) von 10^{-1} bis 10^{-6} hergestellt. Dazu wurden 180 μ l Adsorptionsmedium in 96-Well-Platten vorgelegt und 20 μ l des Lungenhomogenats in das Well für die 10^{-1} -Verdünnung gegeben und seriell weiterverdünnt. Das Kulturmedium (MEM + 10 % FBS + 1 % Penicillin/Streptomycin + 1 % Nicht-essentielle Aminosäuren + 2 mM L-Glutamin) der Hep2-Zellen wurde abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Für die Inokulation der Zellen wurden jeweils 100 μ l der Verdünnungen zu den Zellen gegeben und für 2 Stunden bei 37 °C im Zellkultur-Inkubator inkubiert. Nach Ablauf der 2 Stunden wurde das Inokulum wieder entfernt und je 1 ml Overlay-Medium (MEM + 2 % FBS + 1 % Penicillin/Streptomycin + 1 % Nicht-essenzielle Aminosäuren + 2 mM L-Glutamin + 1 % Avicel RC581) pro Well zugefügt und weiterhin ohne Bewegung bei 37 °C und 5 % CO₂ im Zellkultur-Inkubator für 72 Stunden inkubiert.

Nach Ablauf der 72 Stunden wurden die Plaques mittels immunhistochemischer Färbung nachgewiesen. Dazu wurden das Overlay-Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen und mit 500 μ l Histofix für 30 Minuten bei 4 °C fixiert. Danach wurden die Zellen mit 500 μ l 0,3 % Triton-X 100 in PBS für 30 Minuten bei RT unter Schütteln permeabilisiert. Nun wurden die Zellen mit 300 μ l Antikörper (Goat anti Respiratory Syncytial Virus:HRP, 1:1000 in SuperBlock) pro Well unter Schütteln für 1 Stunde bei RT inkubiert und anschließend dreimal mit je 1 ml Waschpuffer (0,05 % Tween-20 in PBS) gewaschen. Die Zellen wurden nun mit 200 μ l TrueBlue™ Peroxidase Substrat für 15 Minuten bei RT und Schütteln gefärbt. Abschließend wurde die Färbung mit kaltem Leitungswasser abgestoppt und die Zellen an einem dunklen Ort getrocknet. Die Anzahl der Plaques wurde ausgezählt.

3.14 Kultivierung von Zelllinien

3.14.1 Auftauen der Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurde das Kulturmedium (MDCKII-Zellen: MEM + 10 % FBS + 1 % Penicillin/Streptomycin + 2 mM L-Glutamin; Hep2-Zellen: MEM + 10 % FBS + 1 % Penicillin/Streptomycin + 1 % Nicht-essenzielle Aminosäuren + 2 mM L-Glutamin) auf 37 °C erwärmt. Von dem erwärmten Medium wurden 9 ml in ein 15 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Die Zellen wurden für 2 Minuten in einem 37 °C-warmen Wasserbad aufgetaut und direkt zu den 9 ml Kulturmedium gegeben und für 5 Minuten bei 100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt und ca. $7,5 \times 10^5$ Zellen in 20 ml Kulturmedium in T-75 Zellkulturflaschen ausgesät und im Zellkultur-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ weiterkultiviert.

3.14.2 Kultivierung der Zellen

Für die Kultivierung wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von ca. 90 Prozent wachsen gelassen. Dann wurden die Zellen gesplittet, um ihnen neuen Raum für das weitere Wachstum zu geben. Da es sich bei beiden Zelllinien um adhärente Zellen handelt, müssen die Zellen dazu speziell von der Zellkulturflasche abgelöst werden. Dies geschieht in diesem Fall über das Enzym Trypsin. Hierzu wurde das Kulturmedium (MDCKII-Zellen: MEM + 10 % FBS + 1 % Penicillin/Streptomycin + 2 mM L-Glutamin; Hep2-Zellen: MEM + 10 % FBS + 1 % Penicillin/Streptomycin + 1 % Nicht-essentielle Aminosäuren + 2 mM L-Glutamin) entfernt, die Zellen zweimal mit je 5 ml PBS gewaschen, 1 ml Trypsin-EDTA zugefügt und für 10 Minuten im Zellkultur-Inkubator inkubiert. Anschließend wurden 9 ml Kulturmedium für das Abstoppen der Trypsinreaktion und die Resuspendierung der Zellen zugegeben. Ein Teil der resuspendierten Zellen wurde in neue T-75 Zellkulturflaschen überführt und somit weiterkultiviert und der restliche Teil wurde verworfen.

3.14.3 Einfrieren der Zellen

Für das Einfrieren der Zellen wurde eine Konfluenz von 90 Prozent benötigt. Die 90 Prozent konfluenten Zellen wurden geerntet. Dazu wurde das Kulturmedium (MDCKII-Zellen: MEM

+ 10 % FBS + 1 % Penicillin/Streptomycin + 2 mM L-Glutamin; Hep2-Zellen: MEM + 10 % FBS + 1 % Penicillin/Streptomycin + 1 % Nicht-essentielle Aminosäuren + 2 mM L-Glutamin) abgenommen und verworfen. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit je 5 ml PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin-EDTA für 10 Minuten bei 37 °C im Zellkultur-Inkubator inkubiert und die Trypsinreaktion mit 9 ml Kulturmedium abgestoppt. Die Zellen wurden gut resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden die Zellen bei 100 g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in Einfriermedium (MDCKII-Zellen: MEM + 10 % FBS + 5 % DMSO; Hep2-Zellen: FBS + 10 % DMSO) so aufgenommen, dass eine Konzentration von 2×10^6 Zellen pro ml erreicht wurde. Pro Cryovial wurde 1 ml der Zellen aliquotiert und in einem Gefrierbehälter zum graduellen Einfrieren (Mr. Frosty) bei -80 °C eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff zur Aufbewahrung überführt.

3.15 Statistik

Die Ergebnisgraphen und die Statistik wurden mit Graph Pad Prism 7 erstellt und durchgeführt. Für die Statistik der unterschiedlichen Gruppen wurde eine One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest durchgeführt. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Sofern nicht anders angegeben, sind die Signifikanzniveaus der Vergleiche zwischen der jeweiligen Asthmagruppe (OVA) und Exazerbationsgruppe (OVA+pIC, OVA+H1N1 oder OVA+RSV) dargestellt. Bei Einzelgruppen-Vergleichen (siehe Ergebnisse der Virustiterbestimmung mittels Plaque-Test) wurde der Student's t-Test verwendet. Die Signifikanzniveaus wurden hier ebenfalls wie folgt festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der frühen Exazerbation von experimentellem Asthma

Um ein Markerprofil für die Voraussage beziehungsweise die frühe Erkennung einer sich entwickelnden Exazerbation zu finden, wurde in einem Tiermodell einer poly(I:C)-induzierten Exazerbation experimentellen Asthmas die frühen Immunantworten, die zu der Entstehung der Exazerbation beitragen, näher untersucht. Dazu wurde eine Kinetik für die frühen Immunantworten nach einer Infektion im Hinblick auf infiltrierende Zellen und lösliche Mediatoren und ihre Beteiligung an der Entstehung an der Exazerbation erstellt. Es wurden verschiedene Zelltypen sowie Mediatoren betrachtet, die zu einer erhöhten Mukusproduktion, erhöhten AHR und vermehrten Entzündung beitragen können. Ebenfalls wurden Zellen und Mediatoren betrachtet, die eine Rolle in der Immunantwort gegenüber Infektionserregern, vor allem Viren, besitzen.

In der Gesundgruppe (PBS) wurden nur geringe Zellzahlen von infiltrierenden Zellen über die gesamten untersuchten Zeitpunkte ermittelt. Und auch die Infektionsmodellgruppe (pIC) zeigte nur geringe infiltrierende Zellzahlen über die Zeit. Bei den beiden OVA-behandelten Gruppen, also der Asthmagruppe (OVA) und der Exazerbationsgruppe (OVA+pIC) sind deutlich erhöhte Zellzahlen infiltrierender Zellen zu sehen. Die maximale Zellinfiltration der beiden OVA-behandelten Gruppen zeigte sich jeweils zwölf Stunden nach der poly(I:C)-Applikation (siehe Abb. 4.1).

Bei der Betrachtung der morphologischen Differenzierung der infiltrierenden Zellen zeigt sich, dass es keine Unterschiede zwischen den Zellzahlen der Makrophagen in den vier verschiedenen Behandlungsgruppen gibt. Auch die Anzahl der Makrophagen bleibt über den gesamten Untersuchungszeitraum stabil. Eosinophile finden sich ausschließlich bei OVA und OVA+pIC, die zu Beginn bereits erhöht sind, jedoch bis vier Stunden nach der Infektion abnehmen und anschließend bis zwölf Stunden ansteigen und dann in ihrer Anzahl stabil bleiben bis 96 Stunden nach der poly(I:C)-Applikation. Jedoch gibt es keinen Unterschied in der Anzahl zwischen Ova und OVA+pIC.

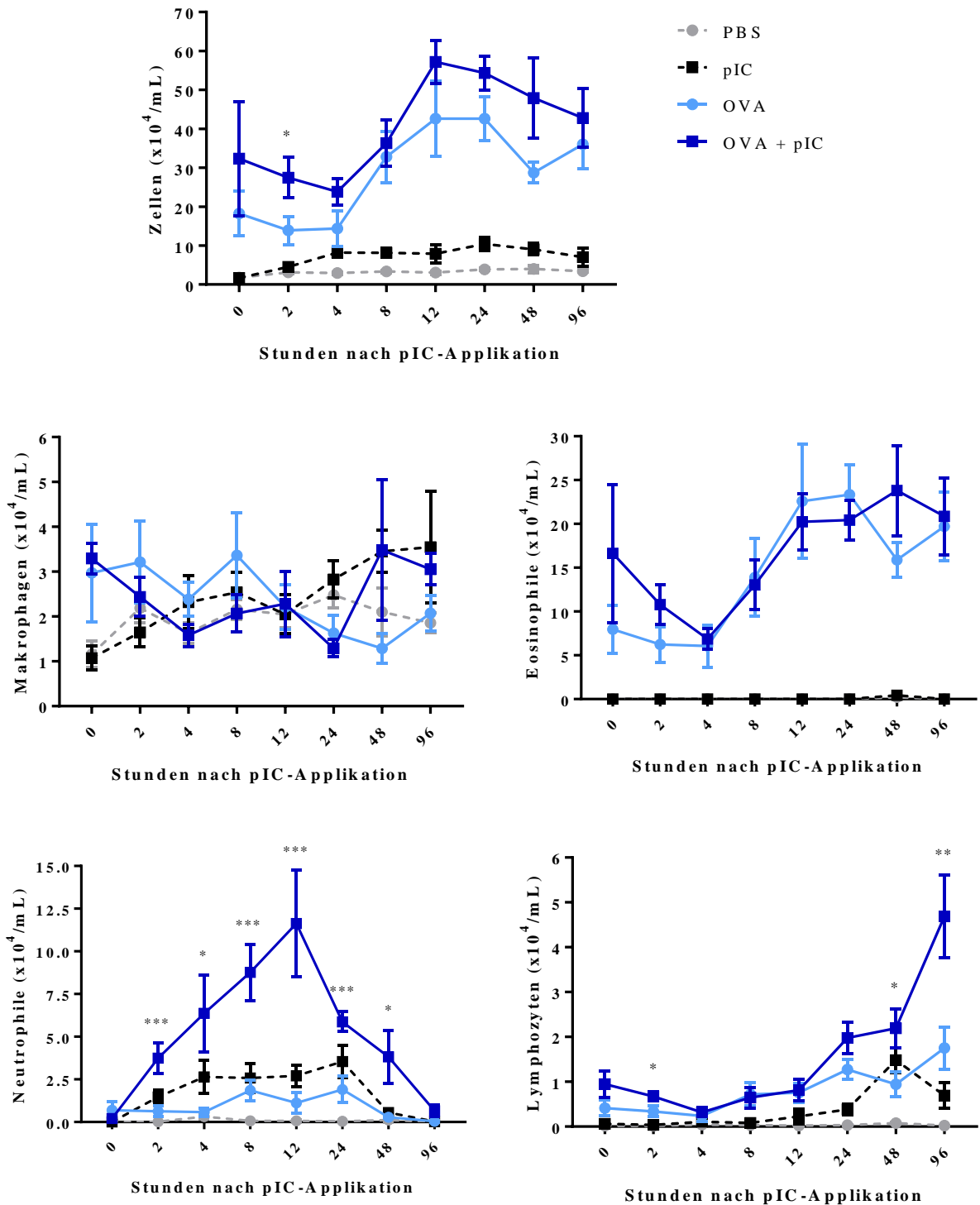


Abb. 4.1: Untersuchung von infiltrierenden Immunzellen in das Lungenlumen.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.1 beschrieben behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde eine Broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt und anschließend die Gesamtzellanzahl darin ermittelt. Zusätzlich wurden für die morphologische Differenzierung dieser Zellen Zytospins (siehe 3.5) angefertigt, gefärbt und anschließend mikroskopisch ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=3-11). Die Gruppen wurden statistisch innerhalb eines Zeitpunktes mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+pIC sind dargestellt.

Neutrophile wandern in geringer Zahl sowohl bei pIC als auch bei OVA bis 24 Stunden nach der poly(I:C)-Applikation ein. Es zeigt sich jedoch eine starke Einwanderung von Neutrophilen in die Lunge bei OVA+pIC bis zu zwölf Stunden nach der poly(I:C)-Applikation und das anschließend starke Abfallen der Zahl bis 96 Stunden. Als letztes wurden die Lymphozyten betrachtet, wobei keine weitere Unterteilung hinsichtlich B-Zellen oder T-Zellen untersucht wurde. Hierbei zeigt sich, dass diese Zellgruppe erst nach zwölf bis 24 Stunden in das Lungenlumen einwandert. Dies geschieht bei allen Behandlungsgruppen, außer PBS. Eine moderate Einwanderung von Lymphozyten in das Lungenlumen zeigt sich bei pIC und OVA. Die stärkste Einwanderung von Lymphozyten findet sich bei OVA+pIC.

Neben den infiltrierenden Zellen sind auch die löslichen Immunmediatoren, die in der Lunge vorkommen von Bedeutung. Um ihre Beteiligung zu untersuchen, wurden verschiedenste Zytokine, Chemokine und andere lösliche Mediatoren zuerst anhand ihrer Expression, als Kurzeitaufnahme, im Lungengewebe und anschließend ebenfalls auch anhand ihrer Proteinkonzentration im Lungenlumen analysiert. Hierbei wurden sowohl Mediatoren der T_H2-vermittelten Asthmaantworten, als auch die der typischen Virusinfektionsantworten betrachtet.

Die Expressionsanalysen der Immunmediatoren im Lungengewebe zeigen, dass die Expression der Interferone wie IFN- β , IFN- γ und Typ I Interferone (IFN- α , hier dargestellt durch Interferon-regulierender Faktor (*interferon regulatory factor 7*, IRF7)) durch die Applikation von poly(I:C) in gesunden sowie asthmatischen Mäusen induziert wird. Hierbei sind auch die Expressionslevel vergleichbar (siehe Abb. 4.2 Interferone). Eine Induktion der Expression der Interferone findet nicht bei PBS und OVA statt. Die Expressionslevel der T_H2-Zytokine zeigen erhöhte Expressionslevel für IL-4 und IL-13 bei OVA+pIC gegenüber OVA. Bei IL-5 sind die Expressionslevel nur zu Beginn bei OVA+pIC im Vergleich zu OVA erhöht und gleichen sich sehr schnell aneinander an. Die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 α und TNF- α werden vor allen Dingen bei pIC exprimiert. IL-1 β und IL-6 werden sowohl bei pIC als auch bei OVA+pIC exprimiert. Für IL-1 β zeigen sich tendenziell höhere Expressionslevel bei OVA+pIC wohingegen sich bei IL-6 tendenziell höhere Expressionslevel bei pIC finden. Bei der betrachteten Gruppe von Chemokinen zeigt sich bei Eotaxin-1/CCL11 die höchste Expression bei OVA+pIC im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen. Bei dem Vergleich von OVA und OVA+pIC sind diese Unterschiede zudem statistisch signifikant.

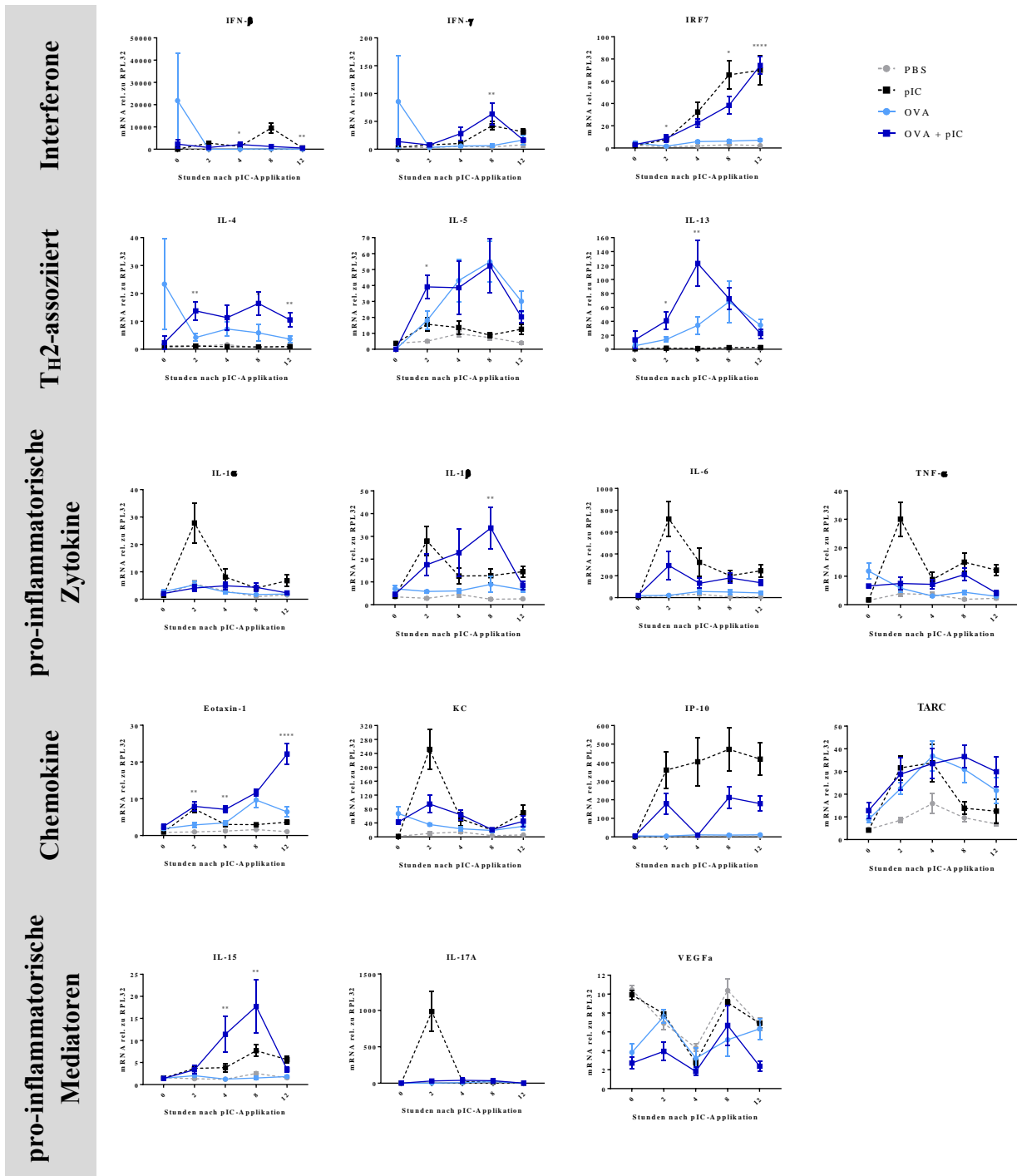


Abb. 4.2: Untersuchung der Expression von Immunmediatoren im Lungengewebe.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.1 beschrieben behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Lungen entnommen (siehe 3.4.4), anschließend zu Lungenpulver verarbeitet (siehe 3.8.1), die RNA isoliert (siehe 3.9), eine reverse Transkription (siehe 3.10) und eine RT-qPCR (siehe 3.11) durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=3-9). Die Gruppen wurden statistisch innerhalb eines Zeitpunktes mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+pIC sind dargestellt.

Bei *keratinocyte chemoattractant* (KC)/CXCL1 zeigen sich ähnliche Expressionslevel bei OVA, pIC und OVA+pIC. Lediglich bei zwei Stunden nach der poly(I:C)-Applikation zeigt sich eine tendenziell erhöhte Expression bei OVA+pIC und die höchste Expression bei pIC. Keine Expression von *interferon γ -induced protein 10* (IP-10)/CXCL10 konnte bei PBS und OVA nachgewiesen werden. Die höchste Expression von IP-10/CXCL10 wurde bei pIC gegenüber OVA+pIC nachgewiesen. Die Expressionslevel von *thymus- and activation-regulated chemokine* (TARC)/CCL17 unterscheiden sich nicht zwischen OVA, pIC und OVA+pIC. Nur eine tendenziell erniedrigte Expression lässt sich für PBS zeigen. IL-15 zeigt eine erhöhte Expression bei OVA+pIC gegenüber pIC. Die Expression bei OVA und PBS liegen gemeinsam auf dem niedrigsten Expressionsniveau. IL-17A zeigt lediglich bei zwei Stunden nach der poly(I:C)-Applikation bei pIC eine Expression. Zu allen sonstigen Zeitpunkten und in den restlichen Gruppen kann keine Expression nachgewiesen werden. Ebenfalls können keine Unterschiede in der Expression von VEGFa zwischen den vier Behandlungsgruppen festgestellt werden.

Neben der Genexpression, die jeweils eine kurze Momentaufnahme des Entzündungsgeschehens darstellt, wurden auch die Konzentrationen der Proteine im Lungenlumen untersucht. Hierbei lässt sich das Bild der Expression nicht unbedingt übertragen. Bei der Proteinkonzentration der Interferone lässt sich für alle untersuchten Interferone (siehe Abb. 4.3) die jeweils höchste Konzentration bei OVA+pIC nachweisen. Eine nur geringe Konzentration lässt sich zusätzlich für pIC für die Interferone IFN- α und IFN- β nachweisen. Keine Interferone konnten bei PBS und OVA nachgewiesen werden. Im Verlauf der untersuchten Zeitpunkte zeigt sich zudem, dass die Interferone zu Beginn der Messungen gering ausfallen und bis zum Zeitpunkt zwölf Stunden nach poly(I:C)-Applikation ansteigen, um anschließend wieder abzufallen.

Die T_H2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 werden ausschließlich in den beiden OVA-behandelten Gruppen gebildet (siehe Abb. 4.4). Wobei IL-4 und IL-5 über den Zeitverlauf in höheren Konzentrationen bei OVA+pIC nachgewiesen werden können. IL-13 weist die höhere Konzentration bei OVA gegenüber OVA+pIC auf. Im Verlauf der untersuchten Zeitpunkte, zeigen die Verläufe von IL-4 und IL-5 einen starken Anstieg von null bis zwei Stunden mit einem anschließenden Plateau-Verlauf bis zu acht beziehungsweise zwölf Stunden nach der poly(I:C)-Applikation. Darauf folgend sinken die Konzentrationen ab. Bei IL-13 zeigt sich ein etwas anderes Verlaufsmuster. Die Konzentrationen sind zu Beginn niedrig und steigen stetig

bis zu acht Stunden bei OVA und bis zwölf Stunden bei OVA+pIC und fallen danach wieder ab.

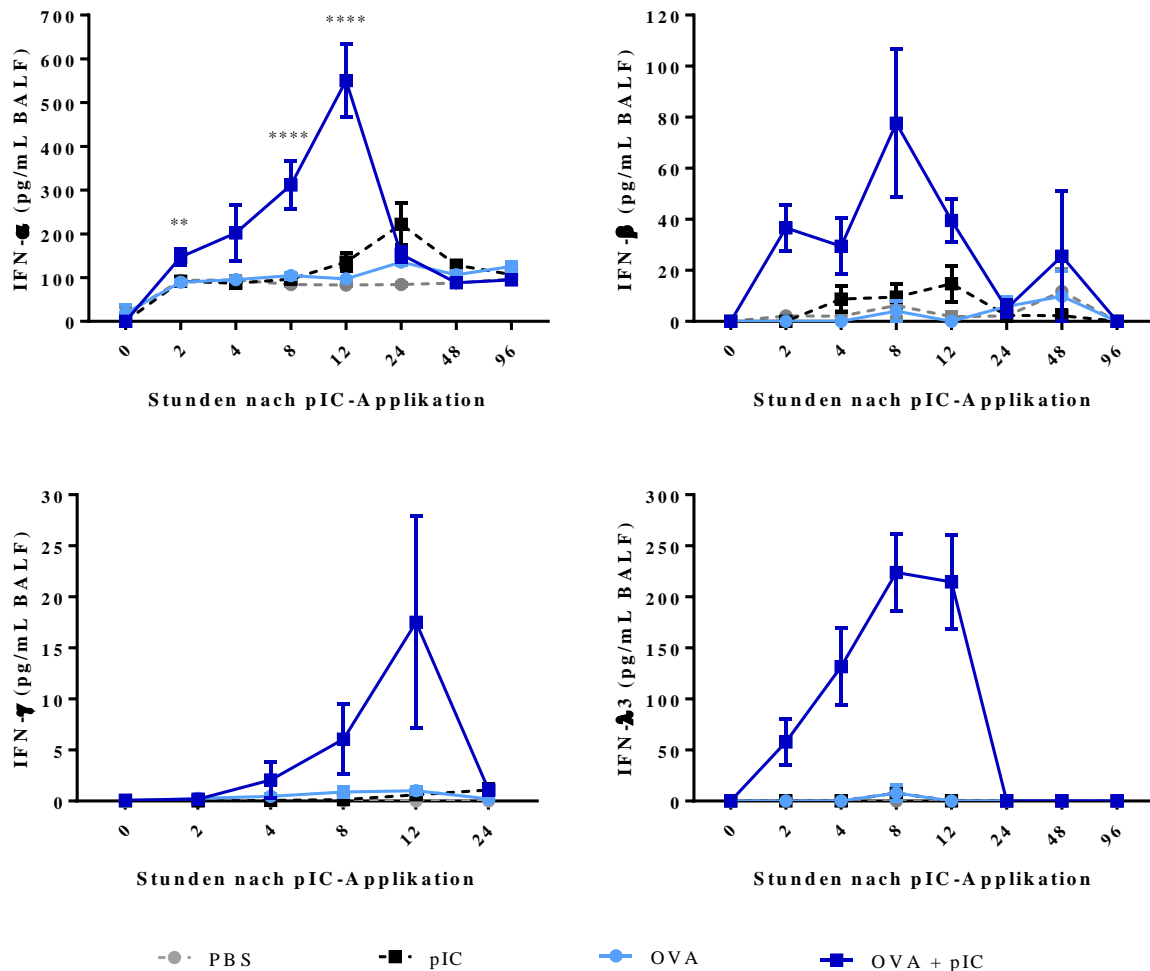


Abb. 4.3: Proteinkonzentrationen von Interferonen im Lungenlumen.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.1 beschrieben behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde eine Broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels ELISA (siehe 3.12.2) oder CBA (siehe 3.12.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=3-11). Die Gruppen wurden statistisch innerhalb eines Zeitpunktes mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+pIC sind dargestellt.

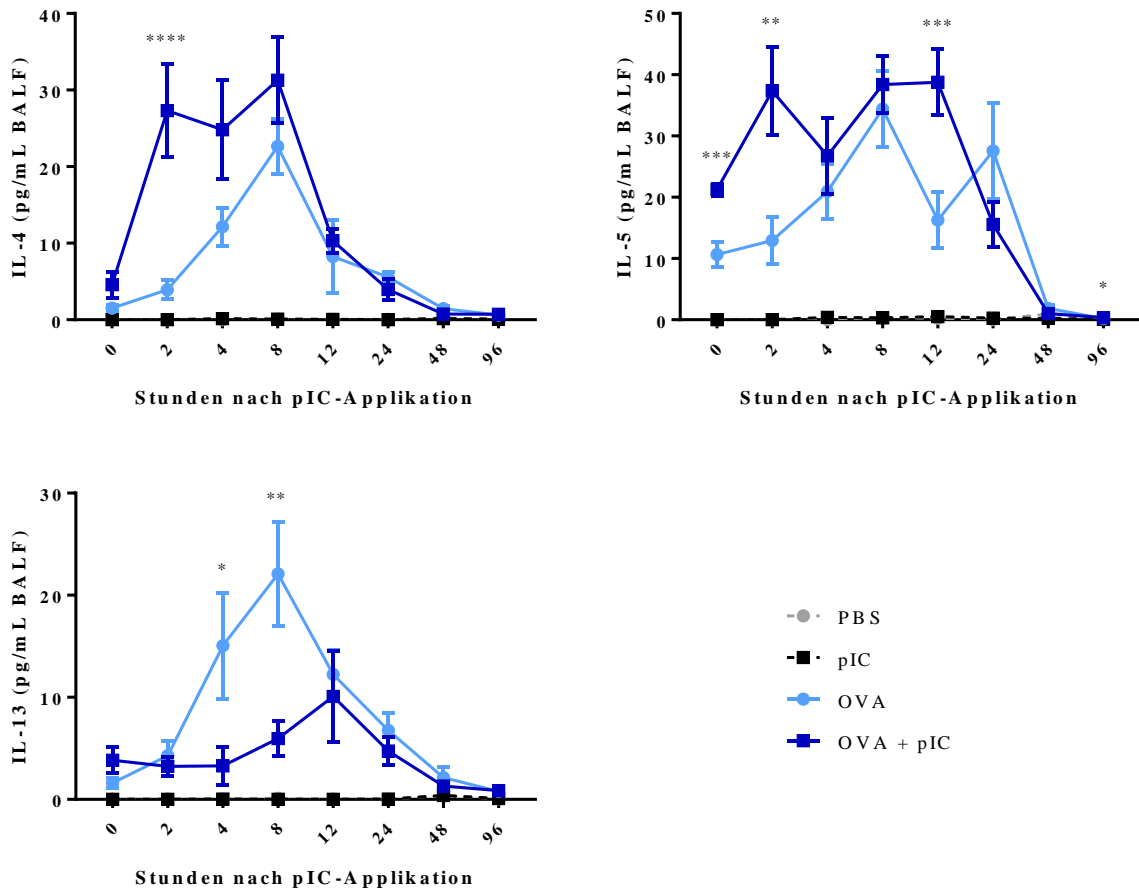


Abb. 4.4: Proteinkonzentrationen von T_H2-Zytokinen im Lungenlumen.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.1 beschrieben behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde eine Broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels CBA (siehe 3.12.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=3-11). Die Gruppen wurden statistisch innerhalb eines Zeitpunktes mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001. Die Signifikanz zwischen den Gruppen OVA und OVA+pIC sind dargestellt.

Bei den pro-inflammatorischen Zytokinen IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α (siehe Abb. 4.5) zeigt sich ebenfalls die höchste Produktion der Proteine jeweils bei OVA+pIC im Vergleich zu OVA und pIC. Keine pro-inflammatorischen Zytokine konnten jeweils bei PBS nachgewiesen werden. Für IL-6 konnte sogar eine höhere Konzentration bei OVA+pIC nachgewiesen werden, als additive Effekte von OVA und pIC ergeben hätten. Es finden sich für die vier pro-inflammatorischen Zytokine drei verschiedene Zeitverlaufsarten. Bei IL-1 α und IL-1 β zeigt sich ein stetiger Anstieg der Konzentrationen von null bis zwölf Stunden nach der poly(I:C)-Applikation und nachfolgendem Konzentrationsabfall. Für IL-6 zeigt sich ein Plateau-Verlauf, bei dem nach einem starken Anstieg zwischen null und zwei Stunden, sich die Konzentrationen für mehrere Zeitpunkte bis zwölf Stunden nach der poly(I:C)-Applikation auf einem weitgehend konstanten Niveau hält und danach absinkt. Die dritte Form findet sich bei

TNF- α . Hier zeigt sich ein starker kurzzeitiger Konzentrationsanstieg innerhalb von zwei Stunden und anschließendem stetigen Absinken der Konzentration.

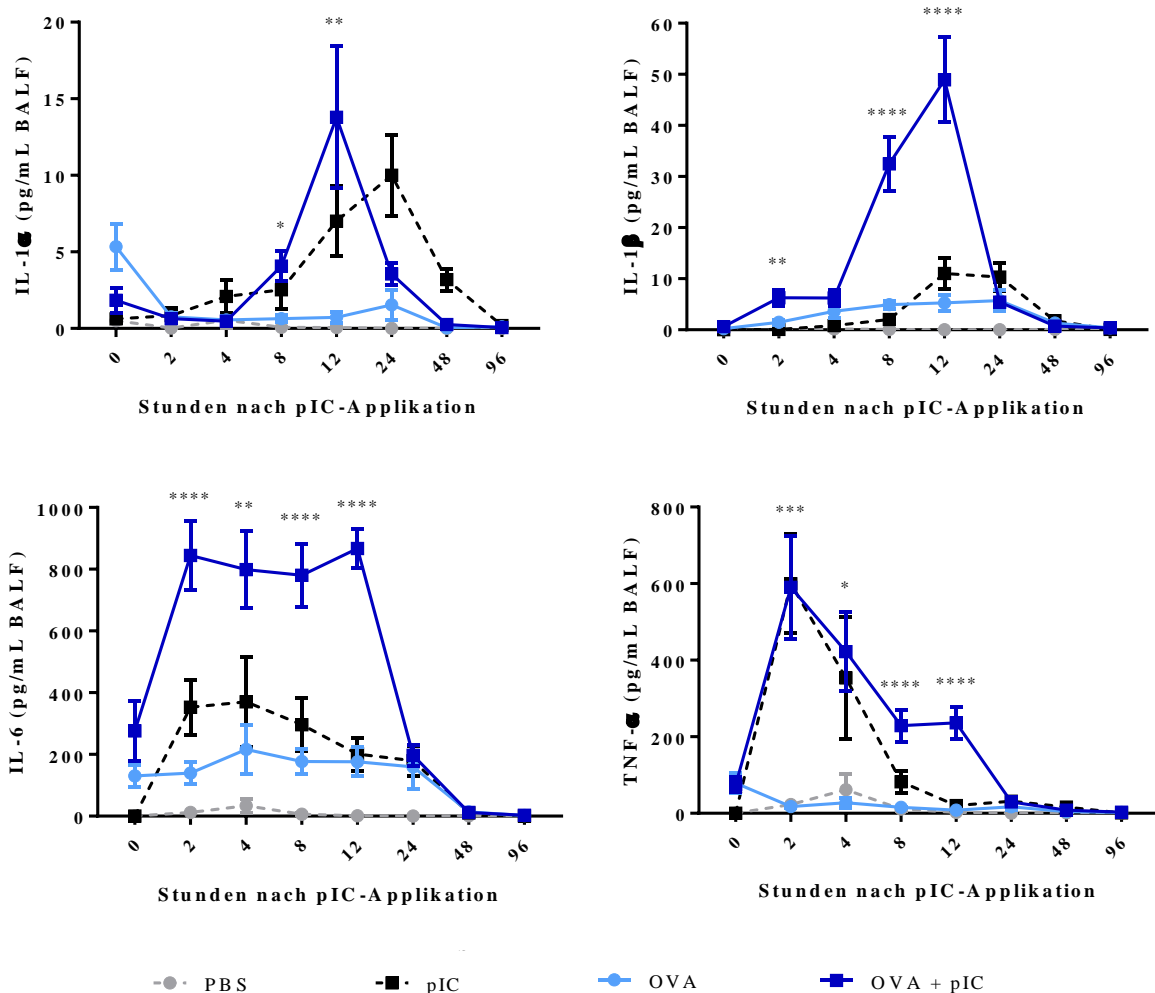


Abb. 4.5: Proteinkonzentrationen von pro-inflammatorischen Zytokinen im Lungenlumen.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.1 beschrieben behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde eine Broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels CBA (siehe 3.12.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=3-11). Die Gruppen wurden statistisch innerhalb eines Zeitpunktes mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+pIC sind dargestellt.

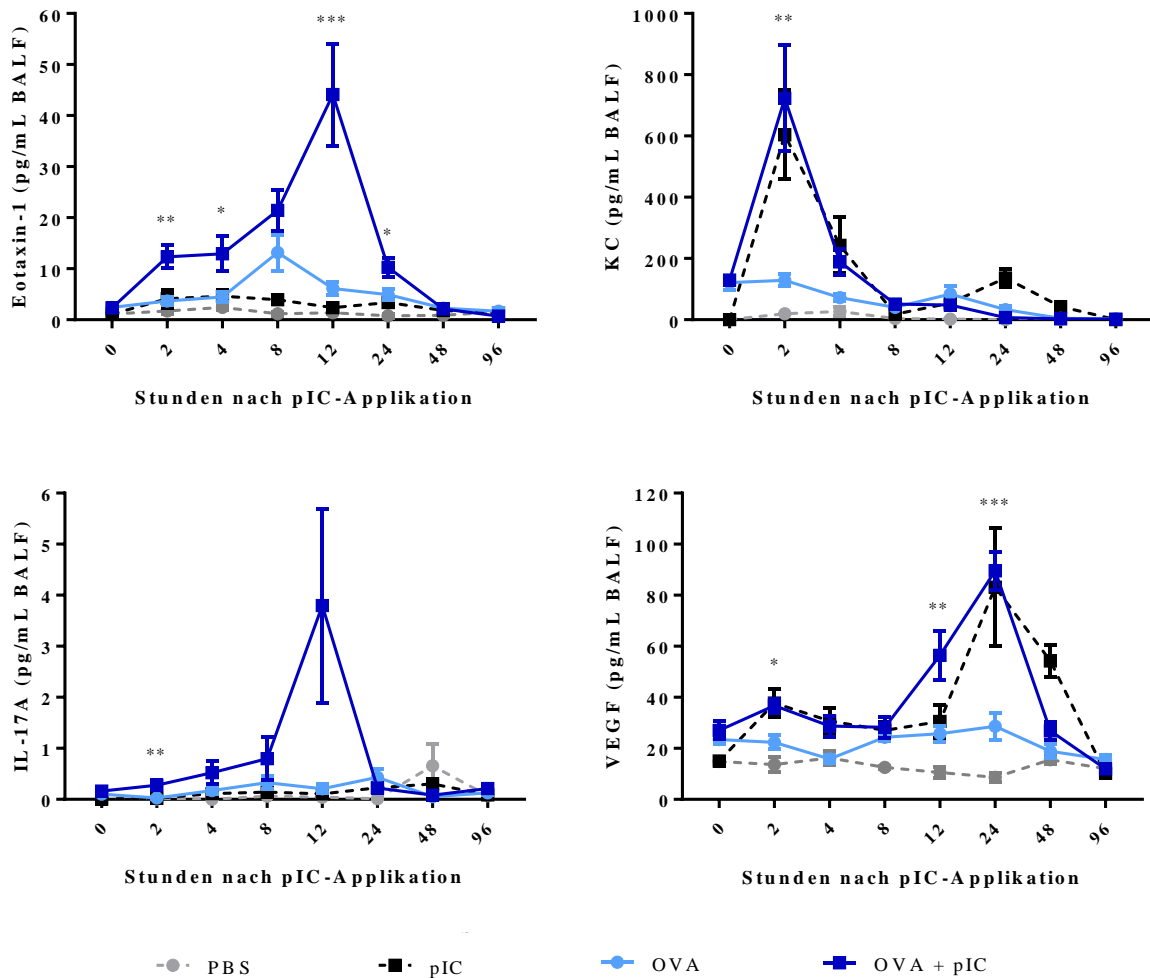


Abb. 4.6: Proteinkonzentrationen von Chemokinen und pro-inflammatorischen Mediatoren im Lungenlumen.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.1 beschrieben behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde eine Broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels ELISA (siehe 3.12.2) oder CBA (siehe 3.12.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=3-11$). Die Gruppen wurden statistisch innerhalb eines Zeitpunktes mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+pIC sind dargestellt.

Das Chemokin Eotaxin-1/CCL11 und das Zytokin IL-17A zeigen ebenfalls jeweils bei OVA+pIC die höchsten Proteinkonzentrationen (siehe Abb. 4.6). Bei Eotaxin-1/CCL11 kann ebenfalls eine Bildung des Proteins in einer mittleren Konzentration für OVA nachgewiesen werden, wobei bei IL-17A in keiner der drei verbleibenden Gruppen eine Produktion des Zytokins nachgewiesen werden konnte. Bei dem Chemokin KC/CXCL1 und dem pro-angiogenetischen Faktor VEGF (siehe Abb. 4.6) sind tendenziell ebenfalls die höchsten Konzentrationen bei OVA+pIC nachweisbar. Jedoch folgt hier sehr dicht jeweils pIC. Bei OVA und PBS sind für beide Mediatoren nur geringe Konzentrationen nachweisbar. Auch hier sind

prinzipiell zwei Zeitverlaufsformen vertreten. Bei Eotaxin-1/CCL11 und IL-17A steigen die Konzentrationen bis zwölf Stunden nach der poly(I:C)-Applikation an und fallen anschließend wieder ab. Für VEGF ergibt sich ein ähnliches Verlaufsbild wie bei Eotaxin-1/CCL11 und IL-17A, jedoch ist hier der Anstieg der Konzentration bis 24 Stunden nach der poly(I:C)-Applikation zu beobachten und danach erst der Abfall. Im letzten Fall, dem KC/CXCL1, steigt die Konzentration sprunghaft innerhalb von zwei Stunden an und sinkt nachträglich stetig wieder.

Durch die Fülle der Informationen, kam die Überlegung auf, ob solche Mediatorenprofile nicht auch eine Anwendung in der Diagnostik zur Erkennung einer Exazerbation beziehungsweise deren Entstehung verwendet werden können. Allerdings stößt man hier sehr schnell auf das Problem, dass eine broncho-alveoläre Lavage nicht routinemäßig zur Diagnostik durchgeführt werden kann. Daher wurde nach Alternativen gesucht, wobei sich erneut die Frage stellt, ob sich das Geschehen in der Lunge eventuell in anderen Kompartimenten nachweisen lässt. Somit wurde von den drei höchstkonzentriertesten Mediatoren, den Zytokinen IL-6 und TNF- α und dem Chemokin KC/CXCL1, die Profile im Serum, also einer Blutprobe und in der nasalen Lavage, also einer Probe der oberen Atemwege untersucht. Bei Patienten könnte die nasale Lavage entweder ebenfalls durch eine Nasenspülung oder vielleicht noch einfacher einer Speichelprobe ersetzt werden.

Um also die Frage zu beantworten, ob sich das Geschehen in der Lunge eventuell in anderen Kompartimenten nachweisen lässt, wurden Serumproben auf die Konzentration von IL-6, KC/CXCL1 und TNF- α untersucht (siehe Abb. 4.7). Hierbei zeigt sich, dass sich für das Zytokin IL-6 ein ähnliches Profil im Serum nachweisen lässt, wie es auch in der Lunge auftritt. Die Konzentration im Gesamten ist zwar etwas mehr als halbiert, dennoch findet sich der plateauförmige Verlauf von zwei bis zwölf Stunden mit vorangegangenem sprunghaftem Anstieg und anschließendem Abfall. Auch hier liegen die höchsten Konzentrationen bei OVA+pIC gefolgt von pIC. Bei OVA liegt das Konzentrationsniveau in etwa mit dem von PBS gleichauf. Ebenfalls ein ähnliches Profil zeigt sich für KC/CXCL1 im Serum und in der Lunge. Hier konnten sogar höhere Konzentrationen im Serum gegenüber den Konzentrationen in der Lunge gemessen werden. Die höchsten Konzentrationen wurden bei OVA+pIC, gefolgt von pIC nachgewiesen. Auch das Profil mit einem sprunghaftem Anstieg der Konzentration innerhalb von zwei Stunden und anschließendem stetigem Abfall sind sowohl im Serum, als auch in der Lunge nachzuweisen. Im Gegensatz zu den beiden ersten genannten Mediatoren,

deren Profilverläufe sich im Serum aus der Lunge wiedergeben, zeigt sich für TNF- α ein anderes Bild. Zum einen sind die Konzentrationen im Serum um ein Vielfaches erniedrigt und auch der charakteristische Profilverlauf des sprunghaften Anstiegs der Konzentration zu Beginn mit nachfolgendem stetigem Abfall nicht zu sehen. Die Konzentrationen aller vier Gruppen liegen dicht beieinander, sodass eine Konzentrationsabgrenzung zwischen den Gruppen nur tendenziell möglich ist. Hier liegt zwar die höchste Konzentration auch tendenziell bei OVA+pIC gefolgt von OVA und pIC, wobei diese beiden tendenziell gleichauf liegen. Die geringste Konzentration ist auch hier bei PBS. Hier zeigen jedoch die vier Behandlungsgruppen unterschiedliche Konzentrationsverläufe. Während sich bei OVA+pIC ein stetiger Anstieg bis zwölf Stunden nach der poly(I:C)-Applikation mit anschließendem Abfall zeigt, so ist bei OVA ein stetiger Abfall der Konzentration von null bis 24 Stunden und nachfolgendem minimalem erneuten Anstieg zu beobachten. Bei pIC zeigt sich als einziger Gruppe die Verlaufsform aus der Lunge mit dem sprunghaften Anstieg der Konzentration innerhalb von zwei Stunden und nachfolgendem stetigen Abfall. Bei PBS bleibt die Konzentration über die gesamte Zeit auf einem gleichbleibenden niedrigen Niveau.

Auch in den oberen Atemwegen lassen sich zwar alle Mediatoren nachweisen, jedoch sind auch hier Unterschiede in den Konzentrationen und Konzentrationsverläufen zu beobachten (siehe Abb. 4.8). So zeigt sich bei IL-6 kein plateauförmiger Verlauf der Konzentrationen über die Zeit, wenngleich die gemessenen Konzentrationen höher liegen als in der Lunge. Die höchste Konzentration wurde auch hier bei OVA+pIC gemessen, gefolgt von pIC. Hier steigen die Konzentrationen von null bis vier Stunden bei OVA+pIC, pIC und PBS und von null bis zwei Stunden bei OVA mit anschließendem Abfallen der Konzentrationen.

Die Konzentrationsverläufe und die Konzentrationshöhen von KC/CXCL1 in den oberen Atemwegen (siehe Abb. 4.8) sind denen in der Lunge am ähnlichsten (siehe Abb. 4.6). Die tendenziell höchste Konzentration konnte bei OVA+pIC gemessen werden, allerdings sehr dicht gefolgt von den Konzentrationen bei pIC. Mittlere Konzentrationen konnten bei OVA nachgewiesen werden, die niedrigsten Konzentrationen fanden sich demnach bei PBS. Auch der sprunghafte Anstieg der Konzentration zu Beginn der Messungen mit anschließendem stetigem Abfall findet sich in allen Behandlungsgruppen, wobei bei OVA+pIC dieser Anstieg auf bis vier Stunden nach der poly(I:C)-Applikation verlängert ist.

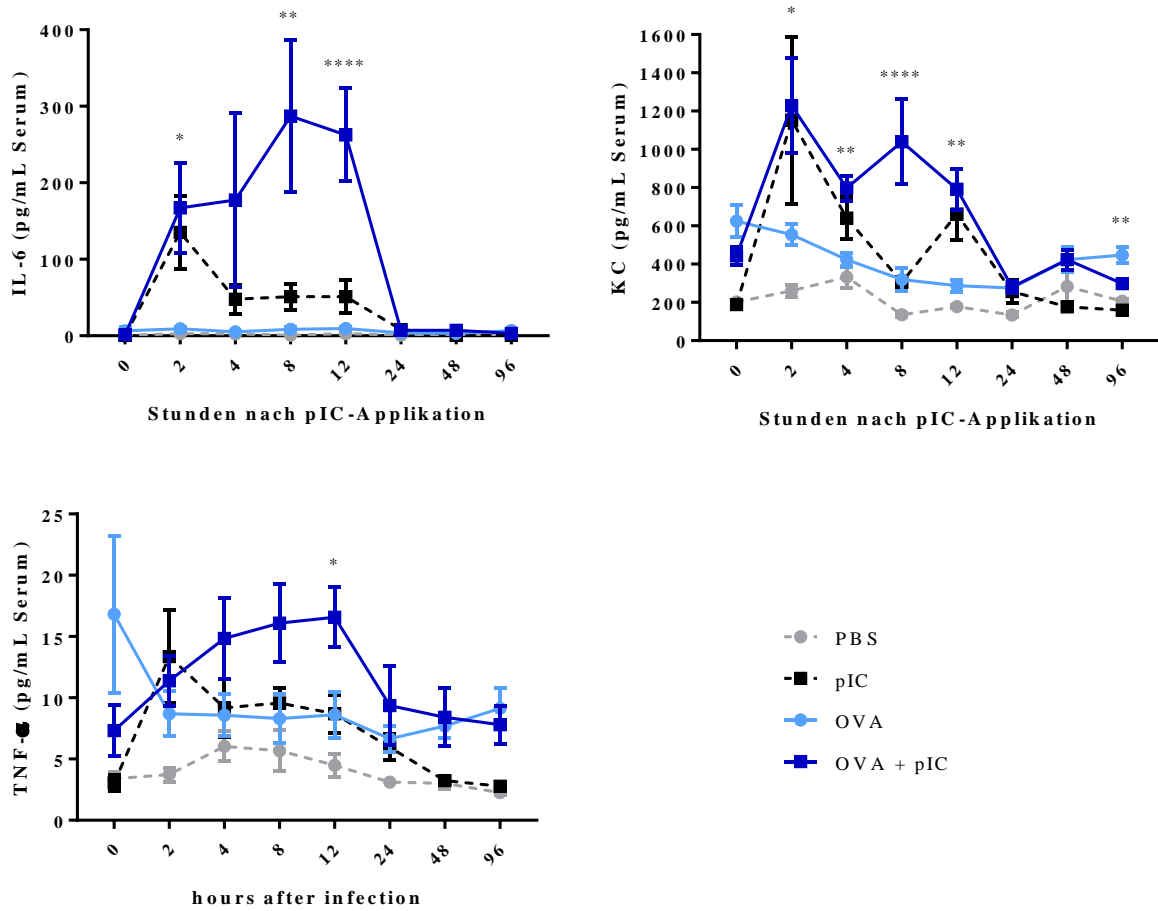


Abb. 4.7: systemische Proteinkonzentrationen von Zytokinen und Chemokinen.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.1 beschrieben behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Blut entnommen und zu Serumproben weiterverarbeitet (siehe 3.4.1). Die Proteinkonzentration wurde mittels ELISA (siehe 3.12.2) oder CBA (siehe 3.12.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=3-11). Die Gruppen wurden statistisch innerhalb eines Zeitpunktes mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+pIC sind dargestellt.

TNF- α zeigt in den oberen Atemwegen, ebenfalls wie im Serum, ein um ein Vielfaches niedrigeres Konzentrationsniveau als in der BAL. Dennoch ist die tendenziell höchste Konzentration bei OVA+pIC nachzuweisen, gefolgt von pIC. Eine geringe Konzentration findet sich bei OVA und die niedrigste Konzentration ist bei PBS zu finden. Bei OVA+pIC steigt die Konzentration von null bis vier Stunden nach der poly(I:C)-Applikation an und fällt danach wieder ab. Bei pIC steigt sie von null bis zwei Stunden und fällt danach ab, zeigt jedoch nochmals eine erhöhte Konzentration bei acht Stunden nach der poly(I:C)-Applikation. Für OVA zeigt sich bei null Stunden die höchste TNF- α -Konzentration, die anschließend stetig abfällt. Bei PBS hält sich ein sehr geringes Konzentrationsniveau über die gesamte untersuchte Zeit.

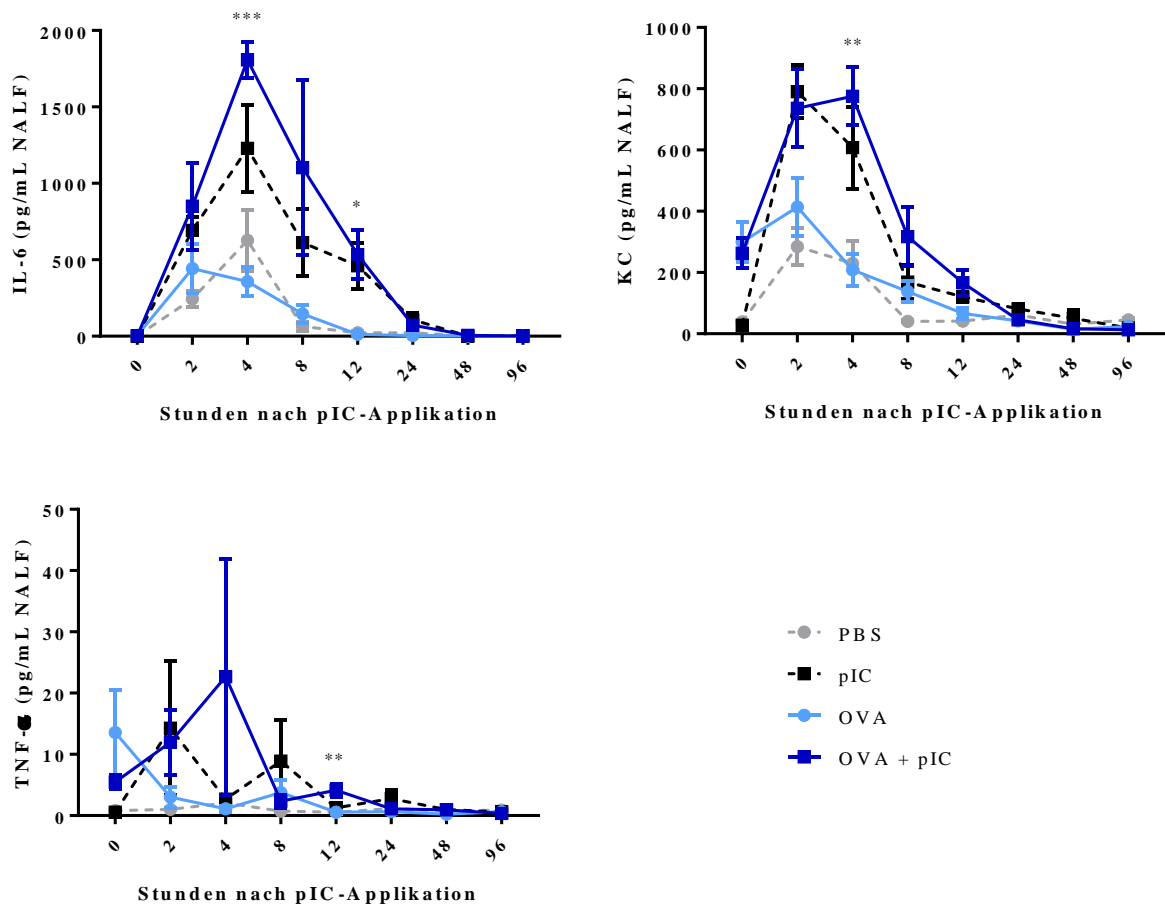


Abb. 4.8: Proteinkonzentrationen von Zytokinen und Chemokinen in den oberen Atemwegen.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.1 beschrieben behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde eine nasale Lavage (siehe 3.4.3) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels ELISA (siehe 3.12.2) oder CBA (siehe 3.12.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=3-11$). Die Gruppen wurden statistisch innerhalb eines Zeitpunktes mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+pIC sind dargestellt.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass sich eine erhöhte Entzündung in der Lunge der OVA+pIC-Mäuse im Vergleich mit OVA-Mäusen und pIC-Mäusen in der untersuchten Zeit aufbaut. Bei Betrachtung der infiltrierenden Zellen zeigt sich, dass dabei verschiedene Zelltypen nacheinander einwandern. Zwar sind zu Beginn bereits einige Eosinophile in der Lunge, doch die ersten Zellen, die bis zwölf Stunden nach der poly(I:C)-Applikation einwandern, stellen die Neutrophile dar. Anschließend wandern zusätzlich nochmals Eosinophile ein, deren Anzahl in der Lunge zwischenzeitlich (bis vier Stunden) gesunken war, und die letzten Zelltypen, die erst ab zwölf Stunden nach der poly(I:C)-Applikation einwandern sind die Lymphozyten. Makrophagen hingegen zeigen keinerlei Unterschiede in ihrer Anzahl in der Lunge aller Behandlungsgruppen über den gesamten untersuchten Zeitraum. Bei der

Betrachtung von verschiedenen sezernierten Mediatoren stellt man fest, dass eine erhöhte Expression beziehungsweise Produktion bei OVA+pIC im Vergleich mit OVA und pIC in den ersten zwölf beziehungsweise bei einer Ausnahme bis 24 Stunden nach der poly(I:C)-Applikation stattfindet. Die Expression der Chemokine IP-10/CXCL10 und TARC/CCL17 steigt in den ersten zwölf Stunden leicht an. Das pro-inflammatorische Zytokin IL-15 wird innerhalb der ersten acht Stunden ansteigend exprimiert. Die, für die Bekämpfung von viralen Infektionen wichtigen, Interferone werden ebenfalls in den ersten zwölf Stunden nach der poly(I:C)-Applikation ansteigend gebildet. Die Konzentrationen der T_H2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, sind erwartungsgemäß bereits zum Zeitpunkt der poly(I:C)-Applikation erhöht, steigen jedoch nochmals innerhalb der zwölf Stunden an, wobei IL-4 und IL-5 ein Konzentrationsplateau zwischen zwei und acht beziehungsweise zwölf Stunden aufweisen. Auch die Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 α , IL-1 β und IL-17A, sowie das Chemokin Eotaxin-1/CCL11 steigen in den ersten zwölf Stunden an. Im Gegensatz dazu zeigen TNF- α und KC/CXCL1 einen sprunghaften Anstieg in nur zwei Stunden und einen sich direkt anschließenden Abfall. Zusätzlich zeigt auch IL-6 einen sprunghaften Anstieg innerhalb von zwei Stunden, jedoch bleibt dieser Anstieg bis zwölf Stunden nach der poly(I:C)-Applikation erhalten. Die Konzentration von VEGF hingegen verzeichnet erst nach acht Stunden einen Anstieg bis nach 24 Stunden.

4.2 Mausmodell für die Influenza-Virus-induzierte Exazerbation experimentellen Asthmas

Für die Etablierung und Charakterisierung eines Mausmodells für die Influenza A-Virus-induzierte Exazerbation experimentellen Asthmas wurden die Protokolle aus Kapitel 3.2.2 verwendet. Der tendenziell späte Zeitpunkt (neun Tage nach der Infektion) der Analyse wurde für die Etablierung des Modells bewusst gewählt, um auch Effekte der Virusreplikation und Schädigung der Atemwege durch die Infektion als mögliche Auslöser der Exazerbation nicht auszuschließen, da dieser nach dem zu erwartenden Replikationsmaximum der Influenza-Viren liegt. Zusätzlich wurden ebenfalls aufeinanderfolgend zwei unterschiedliche Protokolle verwendet. Hierbei spielte der transiente Phänotyp der OVA-induzierten Entzündung in der Lunge der Maus eine Rolle. Deshalb wurde in der ersten Protokollvariante eine erneute Exposition der Mäuse gegenüber dem Allergen an den Tagen sechs bis acht nach der Infektion durchgeführt, um den Phänotyp der OVA-induzierten Entzündung in der Lunge aufrecht zu erhalten. In der zweiten Variante wurde jedoch auf diese erneute Exposition verzichtet, da sie in der Asthmagruppe zu einer extremen Steigerung der allergischen T_H2-vermittelten Entzündung der Lunge führte, wodurch die Vermutung aufkam, dass die allergische Entzündung zu diesem Zeitpunkt noch nicht wieder komplett abgebaut wurde.

Zuerst wird die Protokollversion mit der erneuten OVA-Aerosol-Exposition betrachtet. Eine erfolgreiche Infektion kann man durch das Überleben und die Gewichtsverläufe von infizierten Tieren nachverfolgen, da sie als Maß für die Schwere der Infektion dienen. Im Blick auf die Überlebensgraphen (Kaplan-Meier-Kurven) zeigt sich (siehe Abb. 4.9 obere Reihe), dass alle mit niedriger und mittlerer Dosis infizierten Mäuse überlebt haben. Bei den mit der hohen Dosis infizierten Mäusen haben in der Infektionsgruppe (H1N1_{hoch}) jeweils eine Maus an Tag sechs und sieben und in der Exazerbationsgruppe (OVA+H1N1_{hoch}), zwei Mäuse an Tag sieben nach der Infektion nicht überlebt. Dies lässt sich auch anhand der Gewichtsverluste über die Zeit in den Mäusen beobachten. Es gibt eine Gewichtsreduktion abhängig von der Infektionsdosis der infizierten Tiere. Dabei sind zwischen zehn Prozent Verlust des Ausgangsgewicht bei den Mäusen, die mit der geringsten Infektionsdosis infiziert wurden und bis zu um die 20 Prozent Gewichtsverlust des Ausgangsgewicht bei den mit der höchsten Infektionsdosis infizierten Mäusen zu beobachten. Es gibt zudem keine Unterschiede zwischen den Gewichtsverlusten H1N1 und OVA+H1N1 (siehe Abb. 4.9 untere Reihe).

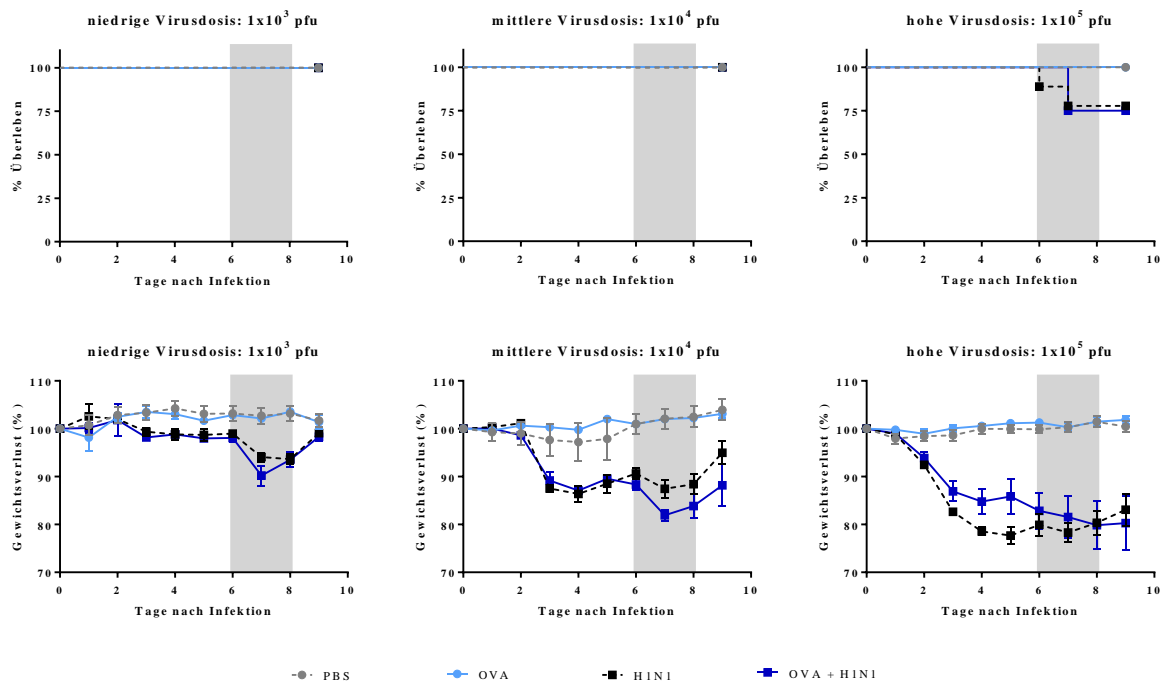


Abb. 4.9: Überleben und Gewichtsverlust.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.2 beschrieben behandelt. Die Mäuse wurden an den Tagen 35, 36 und 37 erneut gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert, hier angedeutet durch die graue Fläche an Tag 6 bis Tag 8 nach der Infektion. Täglich wurden das Gewicht und das Überleben der Mäuse kontrolliert und protokolliert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=8).

Betrachtet man nun die in das Lungenlumen infiltrierenden Zellen als Surrogat für die Entzündungsreaktion, so fällt auf, dass es zu einer verminderten Einwanderung von Immunzellen in das Lungenlumen bei OVA+H1N1 gegenüber der Asthmagruppe (OVA) kommt. Diese sind sogar bei OVA+H1N1_{niedrig} und OVA+H1N1_{mittel} jeweils signifikant niedriger. Eine tendenziell erhöhte Einwanderung der Immunzellen gibt es jedoch zwischen OVA+H1N1 verglichen mit jeweiliger H1N1. In der Gesundheitsgruppe (PBS) sind nur geringe Zellzahlen zu finden (siehe Abb. 4.10, oberste Graphik).

Bei der Differenzierung dieser Zellen (siehe Abb. 4.10) zeigt sich, dass es sich bei den wenigen Zellen bei PBS ausschließlich um Makrophagen handelt. Zusätzlich sind Makrophagen in ähnlicher Anzahl bei OVA, H1N1_{niedrig}, H1N1_{mittel}, OVA+H1N1_{niedrig} und OVA+H1N1_{mittel} zu finden. H1N1_{hoch} und OVA+H1N1_{hoch} zeigen jeweils eine höhere Anzahl an Makrophagen im Lungenlumen.

Eosinophile wandern sowohl bei OVA als auch OVA+H1N1_{niedrig}, OVA+H1N1_{mittel} und OVA+H1N1_{hoch} ein. Die Zahl der Eosinophilen bei OVA+H1N1_{niedrig}, OVA+H1N1_{mittel} und OVA+H1N1_{hoch} liegt jedoch signifikant unter derjenigen von OVA.

Neutrophile wandern abhängig von der Infektionsdosis bei H1N1 und OVA+H1N1 ein. Jedoch gibt es keine Unterschiede in der Anzahl jeweils zwischen H1N1 und OVA+H1N1.

Lymphozyten wandern in alle Gruppen außer PBS ein. Die geringste Anzahl an Lymphozyten findet sich bei OVA. H1N1_{niedrig}, H1N1_{mittel}, OVA+H1N1_{niedrig} und OVA+H1N1_{mittel} zeigen die Einwanderung einer vergleichbaren Anzahl an Lymphozyten. Eine erhöhte Anzahl an Lymphozyten findet sich in der BAL von H1N1_{hoch} und OVA+H1N1_{hoch}. Dabei zeigt sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Asthma geht mit Veränderungen der Strukturen der Atemwege und einer erhöhten Produktion von Mukus einher, daher wurde dies auch hier in histologischen Lungenschnitten untersucht. Dabei zeigt sich, dass Becherzellen bei PBS, H1N1_{niedrig}, H1N1_{mittel} und H1N1_{hoch} nur in geringer Ausprägung vorhanden sind (siehe Abb. 4.11, oben links). Die meisten Becherzellen in den Atemwegen finden sich bei OVA gefolgt von OVA+H1N1_{niedrig}, OVA+H1N1_{mittel} und OVA+H1N1_{hoch}.

Die Anzahl der Becherzellen bei OVA+H1N1_{niedrig}, OVA+H1N1_{mittel} und OVA+H1N1_{hoch} nehmen abhängig von der Infektionsdosis ab und sind alle gegenüber OVA signifikant erniedrigt.

Für den gebildeten Mukus zeigt sich ein gleiches Bild (siehe Abb. 4.11, oben rechts). Hier ist ebenfalls bei PBS, H1N1_{niedrig}, H1N1_{mittel} und H1N1_{hoch} nur eine geringe Mukusproduktion zu finden. Auch hier zeigt sich die meiste Mukusproduktion bei OVA, gefolgt von OVA+H1N1_{niedrig}, OVA+H1N1_{mittel} und OVA+H1N1_{hoch}. Die signifikant niedrigere Mukusproduktion bei OVA+H1N1_{niedrig}, OVA+H1N1_{mittel} und OVA+H1N1_{hoch} verglichen mit OVA nimmt ebenfalls abhängig von der Infektionsdosis ab.

Zusätzlich kann man die in der jeweiligen Becherzelle gespeicherte Mukusmenge bestimmen (siehe Abb. 4.11, unten links). Hier zeigt sich, dass bei PBS und H1N1_{niedrig} nur geringe Mengen an Mukus in den Becherzellen vorhanden sind. Während sich bei H1N1_{niedrig}, H1N1_{mittel} und H1N1_{hoch} ein Anstieg der gespeicherten Mukusmenge in den Becherzellen mit den Infektionsdosen zeigt, so findet sich bei OVA+H1N1_{niedrig}, OVA+H1N1_{mittel} und OVA+H1N1_{hoch} das genau gegenläufige Bild, dass die Mukusmenge in den Becherzellen mit der Infektionsdosis abnimmt. Die größte Mukusmenge, die jeweils in einer Becherzelle gespeichert ist, zeigt OVA. Die Unterschiede hier sind jedoch alle nicht signifikant.

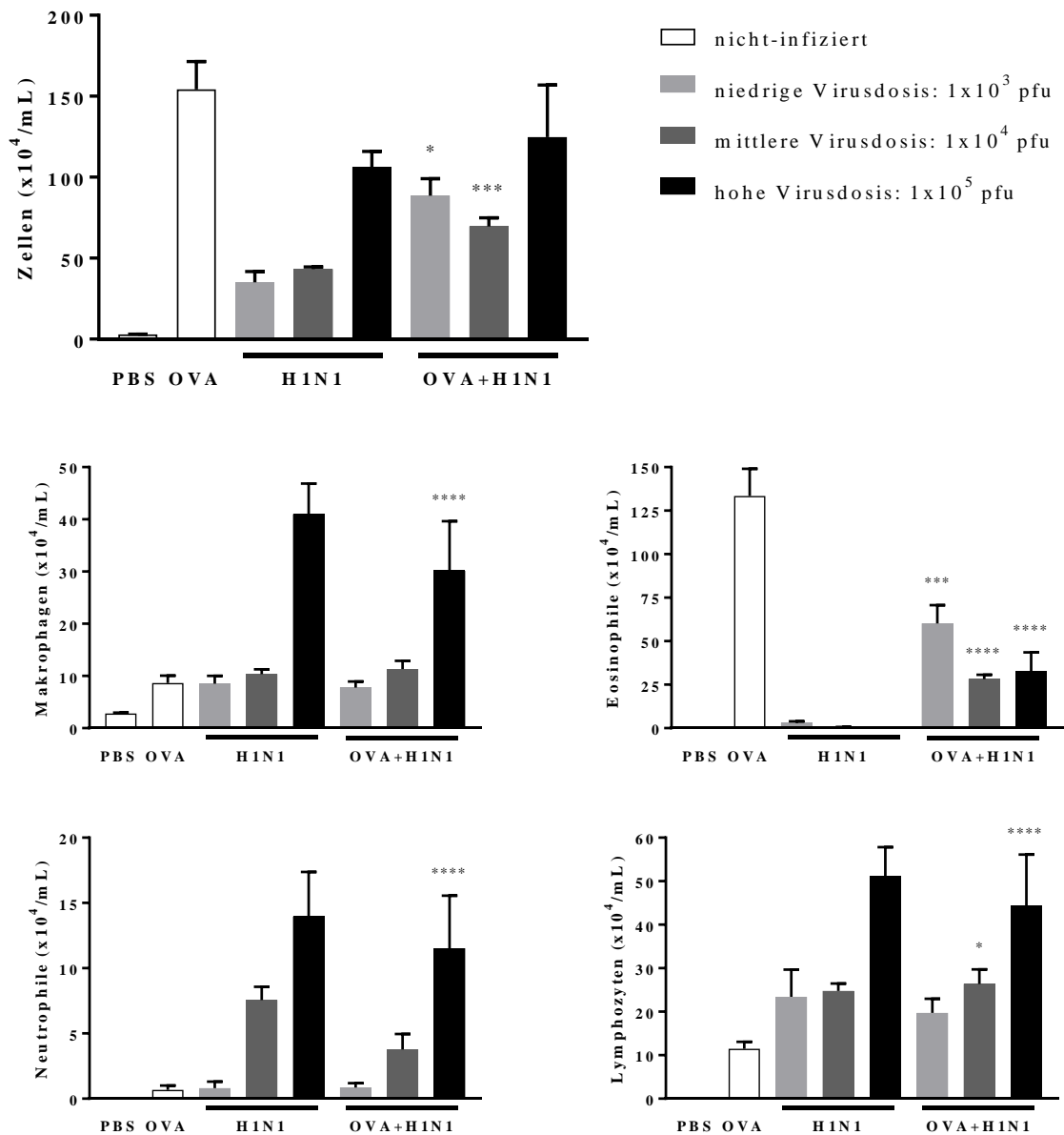


Abb. 4.10: Infiltrierende Immunzellen in das Lungenlumen.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.2 beschrieben behandelt. Die Mäuse wurden jeweils an den Tagen 35, 36 und 37 erneut gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert. An Tag 38 wurde eine broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt und anschließend die Gesamtzellanzahl darin ermittelt. Zusätzlich wurden für die morphologische Differenzierung dieser Zellen Zytospins (siehe 3.5) angefertigt, gefärbt und anschließend mikroskopisch ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (PBS, OVA n=20; H1N1, OVA+H1N1 jeweils n=5-8). Die Gruppen wurden statistisch innerhalb einer Infektionsdosis mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+H1N1 sind dargestellt.

Zusätzlich wurde zu den Zellzahlen im Lungenlumen die Einwanderung von Immunzellen in das Lungengewebe untersucht. Es zeigt sich, dass bei PBS nur wenige Immunzellen in das Lungengewebe einwandern. In den jeweils anderen Gruppen ist eine deutliche Einwanderung

von Immunzellen in das Lungengewebe zu sehen. Tendenziell scheinen mehr Immunzellen im Lungengewebe von OVA+H1N1_{niedrig}, OVA+H1N1_{mittel} und OVA+H1N1_{hoch} im Vergleich mit OVA beziehungsweise jeweils H1N1_{niedrig}, H1N1_{mittel} und H1N1_{hoch} zu infiltrieren. Dies steht eher im Gegensatz zu den Ergebnissen der infiltrierenden Immunzellen im Lungenlumen.

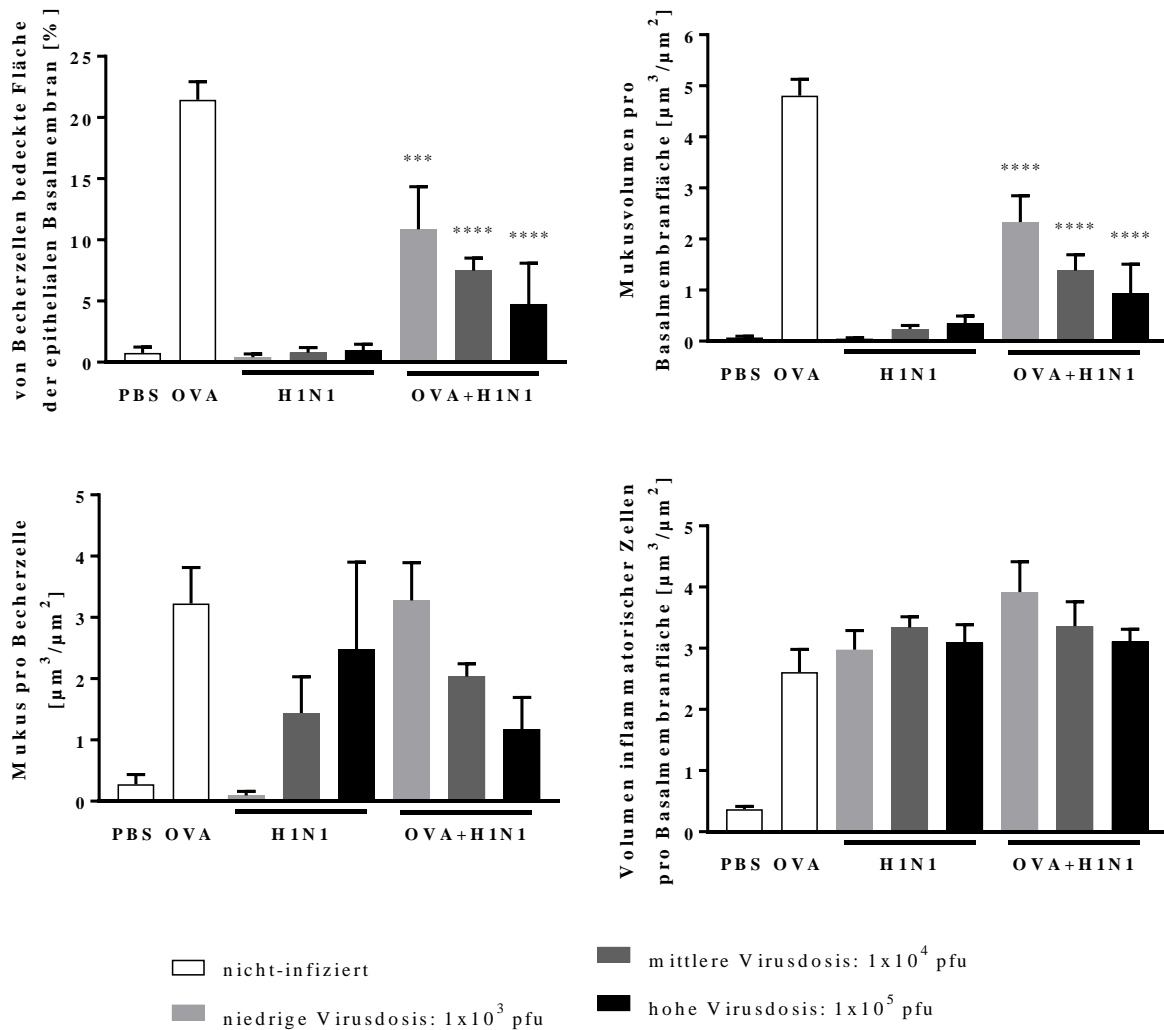


Abb. 4.11: Becherzellhyperplasie, Mukusproduktion und infiltrierende Immunzellen in den Atemwegen. Die Mäuse wurden wie in 3.2.2 beschrieben behandelt. Die Mäuse wurden an den Tagen 35, 36 und 37 erneut gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert. An Tag 38 wurden die Lungen für die Histologie entnommen und unter standardisierten Bedingungen präpariert (siehe 3.6.1). Die Schnitte wurden mit der PAS-Färbung gefärbt (siehe 3.6.3) und anschließend mikroskopisch ausgewertet (siehe 3.7). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (PBS, OVA n=19-20; H1N1, OVA+H1N1 n=5-8). Die Gruppen wurden statistisch innerhalb einer Infektionsdosis mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+H1N1 sind dargestellt.

Neben den Veränderungen auf zellulärer Ebene, spielen auch lösliche Mediatoren eine Rolle. Deshalb wurden verschiedene Mediatoren in allen Infektionsdosen auf Expressionsebene im

Lungengewebe und für die höchste Infektionsdosis auch auf Proteinebene im Lungenlumen untersucht. Es wurden die für die allergische Atemwegsentzündung des Asthmas typischen T_H2 -Zytokine, allgemein pro-inflammatorische Zytokine, die sowohl in allergischen, als auch anti-viralen Immunantworten eine Rolle spielen und Chemokine, die für die Rekrutierung verschiedener Zelltypen zum Entzündungsort verantwortlich sind, untersucht.

Auf Expressionsebene (siehe Abb. 4.12) zeigt sich für das T_H2 -Zytokin IL-4 abhängig von der Infektionsdosis eine Reduktion der Expression bei $H1N1_{\text{niedrig}}$, $H1N1_{\text{mittel}}$, und $H1N1_{\text{hoch}}$, $OVA+H1N1_{\text{niedrig}}$, $OVA+H1N1_{\text{mittel}}$ und $OVA+H1N1_{\text{hoch}}$. Dabei ist die Expression in der jeweiligen Exazerbationsgruppe tendenziell höher als die der Infektionsgruppen. Die Expression von IL-4 bei OVA ist niedriger als die in $OVA+H1N1_{\text{niedrig}}$ aber höher als in $OVA+H1N1_{\text{mittel}}$ beziehungsweise $OVA+H1N1_{\text{hoch}}$. Für IL-5 zeigt sich die höchste Expression bei OVA. Die Expression von IL-5 bei $H1N1_{\text{niedrig}}$, $H1N1_{\text{mittel}}$ und $H1N1_{\text{hoch}}$ befinden sich auf ähnlichem Niveau wie bei PBS. Bei $OVA+H1N1_{\text{niedrig}}$, $OVA+H1N1_{\text{mittel}}$ und $OVA+H1N1_{\text{hoch}}$ ist eine reduzierte Expression gegenüber OVA zu erkennen, die zusätzlich abhängig von der Infektionsdosis weiter reduziert wird. Für IL-13 ergibt sich ein ähnliches Bild wie für IL-5. Die stärkste Expression wird bei OVA erreicht, gefolgt von $OVA+H1N1_{\text{niedrig}}$, $OVA+H1N1_{\text{mittel}}$ und $OVA+H1N1_{\text{hoch}}$, deren Expression jedoch abhängig von der Infektionsdosis abnimmt. $H1N1_{\text{niedrig}}$, $H1N1_{\text{mittel}}$, $H1N1_{\text{hoch}}$ und PBS exprimieren nur sehr geringe Mengen von IL-13.

Das pro-inflammatorische Zytokin IL-1 β wird am stärksten in $OVA+H1N1_{\text{niedrig}}$ exprimiert. Diese nimmt jedoch auch abhängig von der Infektionsdosis ab. Die Expressionen bei PBS, OVA, $H1N1_{\text{niedrig}}$, $H1N1_{\text{mittel}}$ und $H1N1_{\text{hoch}}$ liegen auf ähnlichem Niveau. IL-6 wird in ansteigender Reihenfolge bei PBS, OVA, $H1N1_{\text{niedrig}}$, $H1N1_{\text{mittel}}$, $H1N1_{\text{hoch}}$, $OVA+H1N1_{\text{niedrig}}$, $OVA+H1N1_{\text{mittel}}$ und $OVA+H1N1_{\text{hoch}}$ exprimiert. Lediglich $OVA+H1N1_{\text{hoch}}$ zeigt nicht den Anstieg der Expression gegenüber $H1N1_{\text{hoch}}$. TNF- α wird in geringen Mengen bei PBS und $H1N1_{\text{niedrig}}$ exprimiert. Die Expression von TNF- α bei OVA, $H1N1_{\text{mittel}}$ und $H1N1_{\text{hoch}}$ befinden sich auf gleichem Niveau. Die höchste Expression zeigt $OVA+H1N1_{\text{niedrig}}$. Auch hier sinkt die Expression abhängig von der Infektionsdosis bei $OVA+H1N1_{\text{niedrig}}$, $OVA+H1N1_{\text{mittel}}$ und $OVA+H1N1_{\text{hoch}}$ ab.

Das von T_H17 -Zellen produzierte IL-17A wird nicht bei PBS, $H1N1_{\text{niedrig}}$ und $OVA+H1N1_{\text{niedrig}}$ exprimiert. Zusätzlich wird IL-17A nur sehr gering in $H1N1_{\text{hoch}}$ und $OVA+H1N1_{\text{hoch}}$ exprimiert. Die höchste Expression zeigt die $OVA+H1N1_{\text{mittel}}$, gefolgt von OVA und $H1N1_{\text{mittel}}$.

Die Chemokine Eotaxin-1/CCL11 und KC/CXCL1 zeigen jeweils die höchste Expression bei OVA. Für Eotaxin-1/CCL11 lässt sich nur sehr geringe Expression bei PBS, $H1N1_{\text{niedrig}}$,

H1N1_{mittel} und H1N1_{hoch} feststellen. OVA+H1N1_{niedrig}, OVA+H1N1_{mittel} und OVA+H1N1_{hoch} zeigen auch bei Eotaxin-1/CCL11 abhängig von der Infektionsdosis eine Reduktion der Expression. Die Expression von KC/CXCL1 zeigt sowohl bei H1N1 als auch OVA+H1N1 abhängig von der Infektionsdosis eine Reduktion.

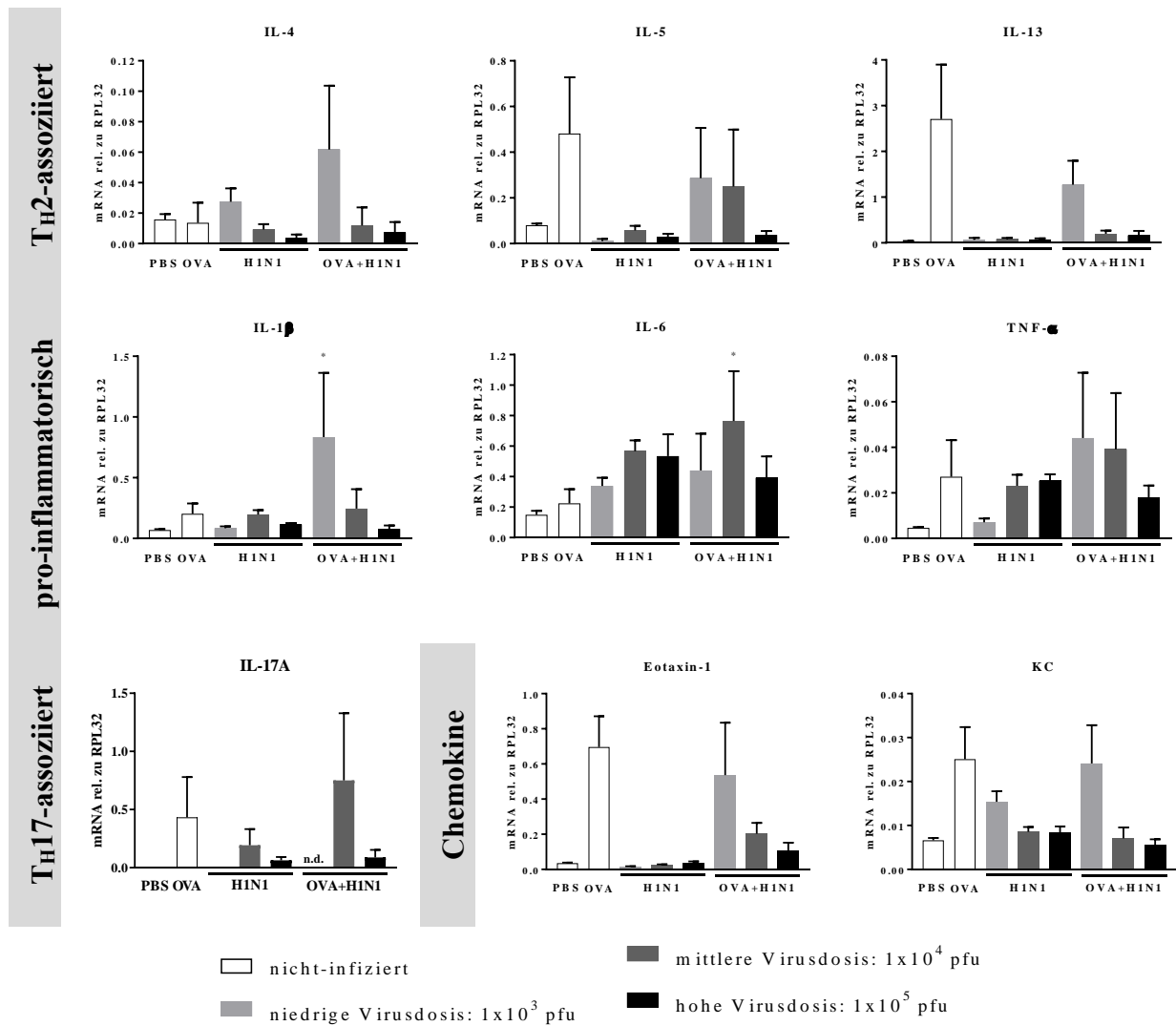


Abb. 4.12: Expression von Immunmediatoren im Lungengewebe.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.2 beschrieben behandelt. Die Mäuse wurden an den Tagen 35, 36 und 37 erneut gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert. An Tag 38 wurden die Lungen entnommen (siehe 3.4.4), anschließend zu Lungenhomogenat verarbeitet (siehe 3.8.2), die RNA isoliert (siehe 3.9), eine reverse Transkription (siehe 3.10) und eine RT-qPCR (siehe 3.11) durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (PBS, OVA n=20; H1N1, OVA+H1N1 n=5-8). Die Gruppen wurden statistisch innerhalb einer Infektionsdosis mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+H1N1 sind dargestellt. Abkürzung: n.d. – nicht detektierbar (alle Werte sind 0)

Betrachtet man nun die Konzentration der Mediatoren im Lungenlumen der Mäuse, die mit der höchsten Infektionsdosis infiziert wurden, so zeigt sich, dass sich sowohl für alle TH₂-Zytokine

(siehe Abb. 4.13) als auch pro-inflammatorischen Zytokine (siehe Abb. 4.14) die höchsten Konzentrationen jeweils bei OVA nachweisen lassen.

Bei den T_H2 -Zytokinen finden sich darüber hinaus keine beziehungsweise nur sehr geringe Konzentrationen in den anderen Gruppen.

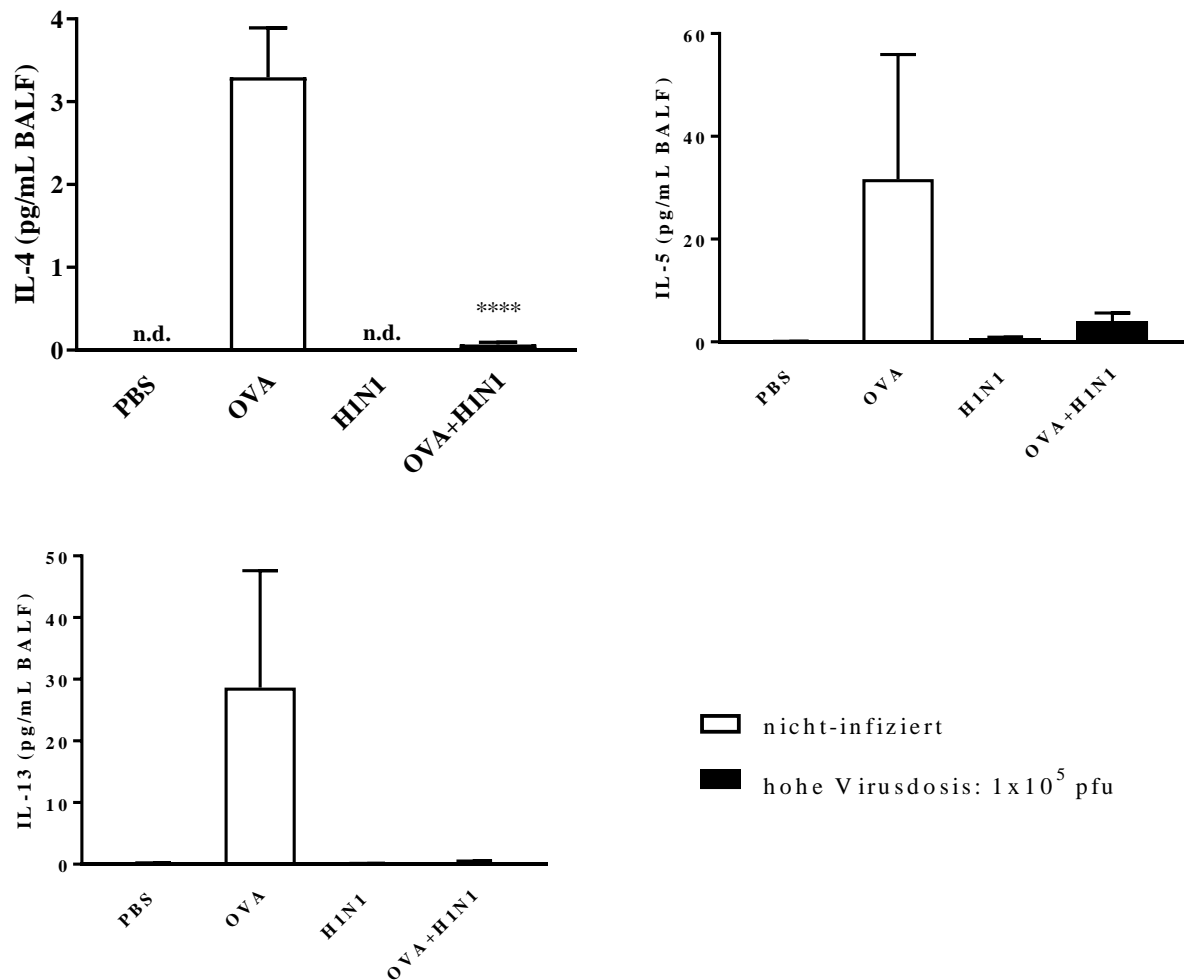


Abb. 4.13: Proteinkonzentrationen von T_H2 -Zytokinen im Lungenlumen.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.2 beschrieben behandelt. Die Mäuse wurden an den Tagen 35, 36 und 37 erneut gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert. An Tag 38 wurde eine broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt. Die Proben wurden vor der Ermittlung der Proteinkonzentration mithilfe eines VivaSpin2-Filters gefiltert. Die Proteinkonzentration wurde mittels CBA (siehe 3.12.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=5-8). Die Gruppen wurden statistisch mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+H1N1 sind dargestellt. Abkürzung: n.d. – nicht detektierbar (alle Werte sind 0)

Auch die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α finden sich nicht bei PBS und nur in geringen Konzentrationen bei H1N1 beziehungsweise OVA+H1N1 verglichen mit OVA.

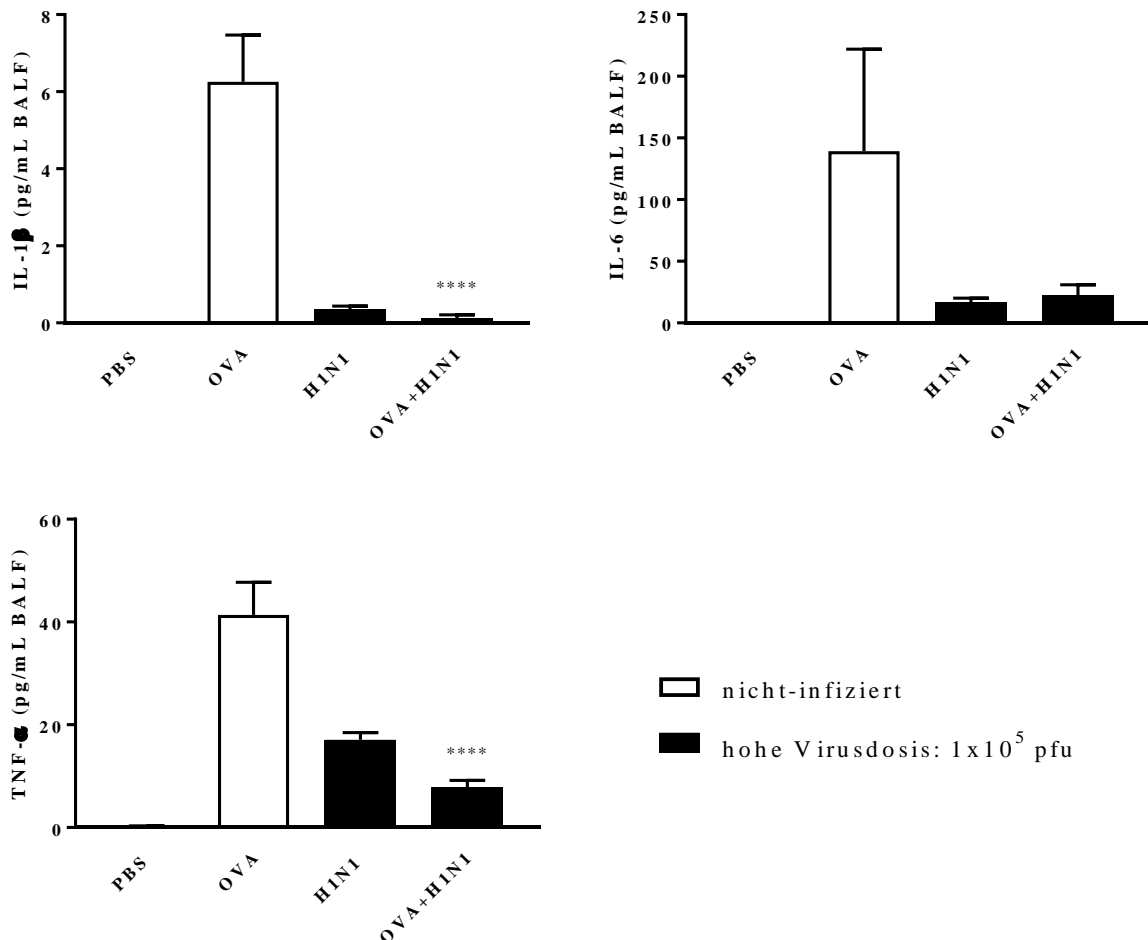


Abb. 4.14: Proteinkonzentrationen von pro-inflammatorischen Zytokinen im Lungenlumen.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.2 beschrieben behandelt. Die Mäuse wurden an den Tagen 35, 36 und 37 erneut gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert. An Tag 38 wurde eine broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt. Die Proben wurden vor der Ermittlung der Proteinkonzentration mithilfe eines VivaSpin2-Filters gefiltert. Die Proteinkonzentration wurde mittels CBA (siehe 3.12.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=5-8). Die Gruppen wurden statistisch mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+H1N1 sind dargestellt.

Ein gegenteiliges Bild zeigt sich bei der Betrachtung der Proteinkonzentration von IFN- γ gegenüber den T_H2- beziehungsweise pro-inflammatorischen Zytokinen. Es zeigt sich keine Produktion von IFN- γ bei PBS und nur eine sehr geringe Konzentration bei OVA. Im Gegensatz dazu ist die höchste Konzentration bei H1N1 zu finden, gefolgt von OVA+H1N1.

Für die Proteinkonzentration von IL-17A zeigt sich das gleiche Bild, wie bei den TH2-Zytokinen. Die höchste Konzentration findet sich bei OVA und in den drei verbleibenden Gruppen sind lediglich sehr geringe Konzentrationen nachweisbar.

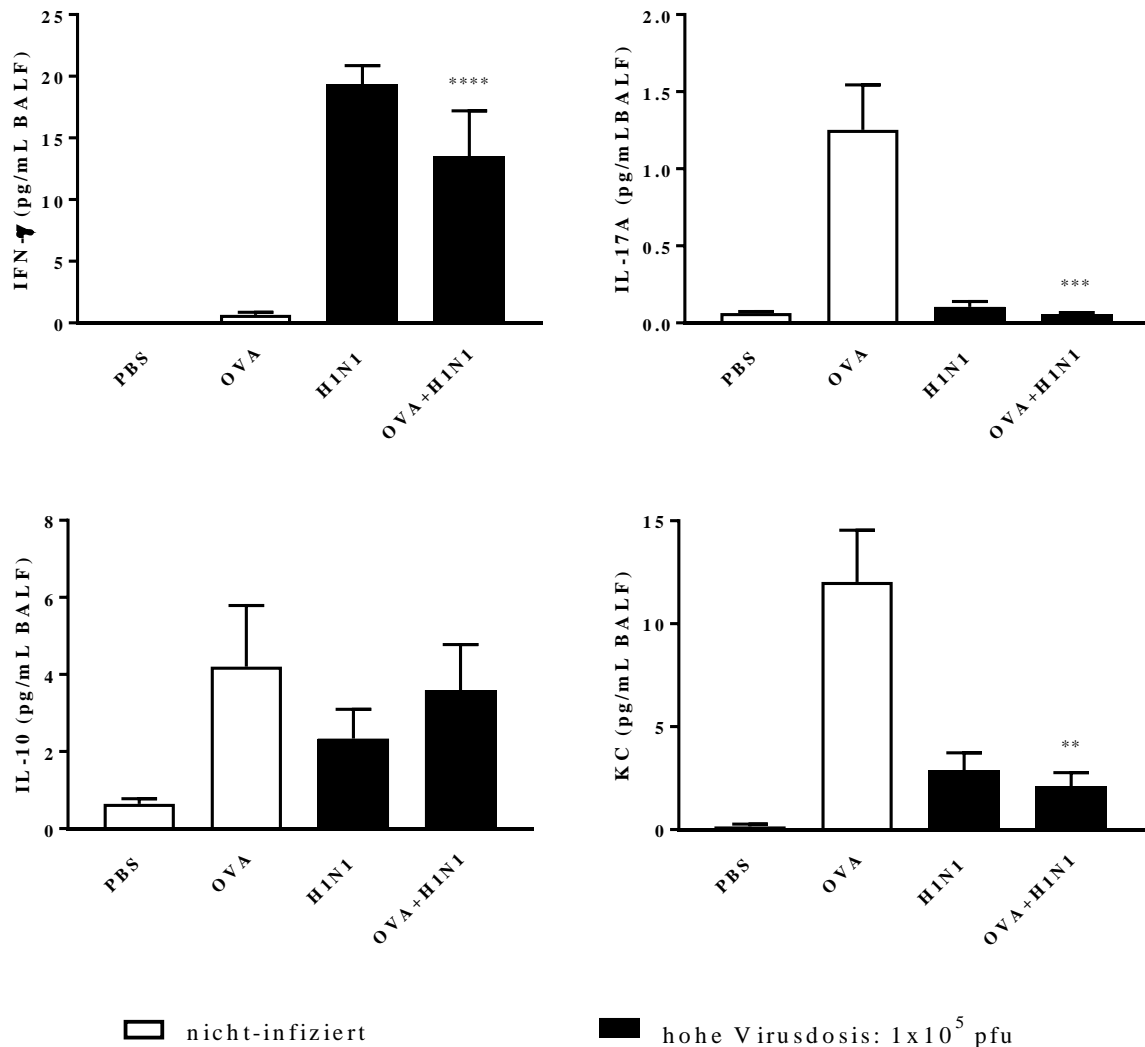


Abb. 4.15: Proteinkonzentrationen von verschiedenen Immunmediatoren im Lungenlumen.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.2 beschrieben behandelt. Die Mäuse wurden an den Tagen 35, 36 und 37 erneut gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert. An Tag 38 wurde eine broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt. Die Proben wurden vor der Ermittlung der Proteinkonzentration mithilfe eines VivaSpin2-Filters gefiltert. Die Proteinkonzentration wurde mittels CBA (siehe 3.12.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=5-8). Die Gruppen wurden statistisch mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+H1N1 sind dargestellt.

Bei IL-10 zeigen sich ähnlich hohe Proteinkonzentrationen bei OVA, H1N1 und OVA+H1N1. Tendenziell ist die Konzentration bei OVA am höchsten und die bei H1N1 die niedrigste der drei genannten Gruppen.

Für KC/CXCL1 findet sich ebenfalls die höchste Proteinkonzentration bei OVA. Jeweils deutlich reduzierte Konzentrationen finden sich sowohl bei H1N1 und OVA+H1N1. Bei PBS ist kaum KC/CXCL1 in der Lunge vorhanden.

Um zu untersuchen, wie sich die zugrundeliegende allergische Entzündung in der Lunge auf die Beseitigung der Influenza A-Viren auswirkt wurde der Virustiter in den Lungen der mit der hohen Virusdosis infizierten Tiere der Infektionsgruppe und Exazerbationsgruppe ermittelt. Hierzu wurde der Virustiter im Lungengewebe mittels Plaque-Test (siehe 3.13.1) bestimmt. Es finden sich, höhere Titer in Mäusen mit experimentellem Asthma als in gesunden Mäusen (siehe Abb. 4.16).

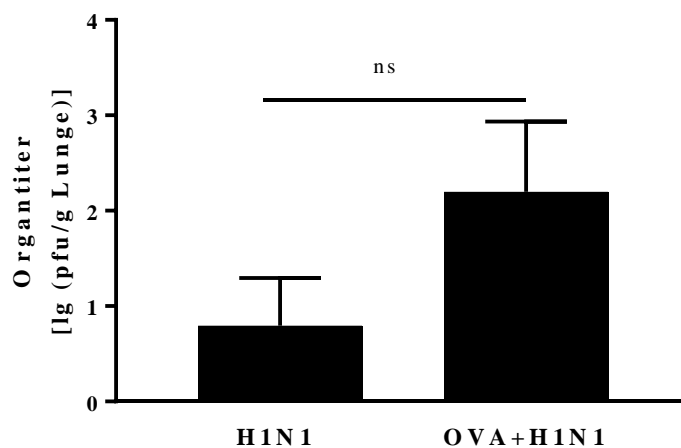


Abb. 4.16: Virusreplikation im Lungengewebe.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.2 beschrieben mit der hohen Virusdosis 1×10^5 pfu behandelt. Die Mäuse wurden an den Tagen 35, 36 und 37 erneut gegenüber einem OVA-Aerosol exponiert. An Tag 38 wurden die Lungen entnommen (siehe 2.2.4.4), anschließend zu Lungenhomogenat verarbeitet (siehe 3.8.3.1) und der Virustiter in der Lunge (siehe 3.13.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=5-6). Die Gruppen wurden statistisch mittels Student's t-Test verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns - nicht signifikant

In der zweiten Version des Versuchsprotokolls wurde, wie bereits erwähnt, auf die erneute Exposition der Mäuse gegenüber dem OVA-Aerosol an den Tagen sechs bis acht nach der Infektion verzichtet. Da sich außerdem in dem ersten Protokoll zeigt, dass die Ergebnisse der mit mittlerer Infektionsdosis infizierten Tiere sich erwartungsgemäß zu den anderen beiden Infektionsdosen verhält, wurde zusätzlich in diesem Protokoll auf diese Infektionsdosis aufgrund des 3R-Prinzips (*replace, reduce, refine*) für Tierversuche verzichtet und lediglich die niedrige Infektionsdosis von 1×10^3 pfu mit der hohen Infektionsdosis von 1×10^5 pfu verglichen.

Auch hier zeigt sich, dass alle Mäuse, die mit der geringen Dosis infiziert wurden, die Beobachtungsdauer von neun Tagen nach der Infektion überleben (siehe Abb. 4.17, oben links). Bei den Mäusen, die mit der hohen Infektionsdosis infiziert wurden, überlebten je eine Maus an Tag fünf beziehungsweise Tag sieben in der Infektionsgruppe und eine Maus an Tag sieben nach der Infektion in der Exazerbationsgruppe nicht (siehe Abb. 4.17, oben rechts).

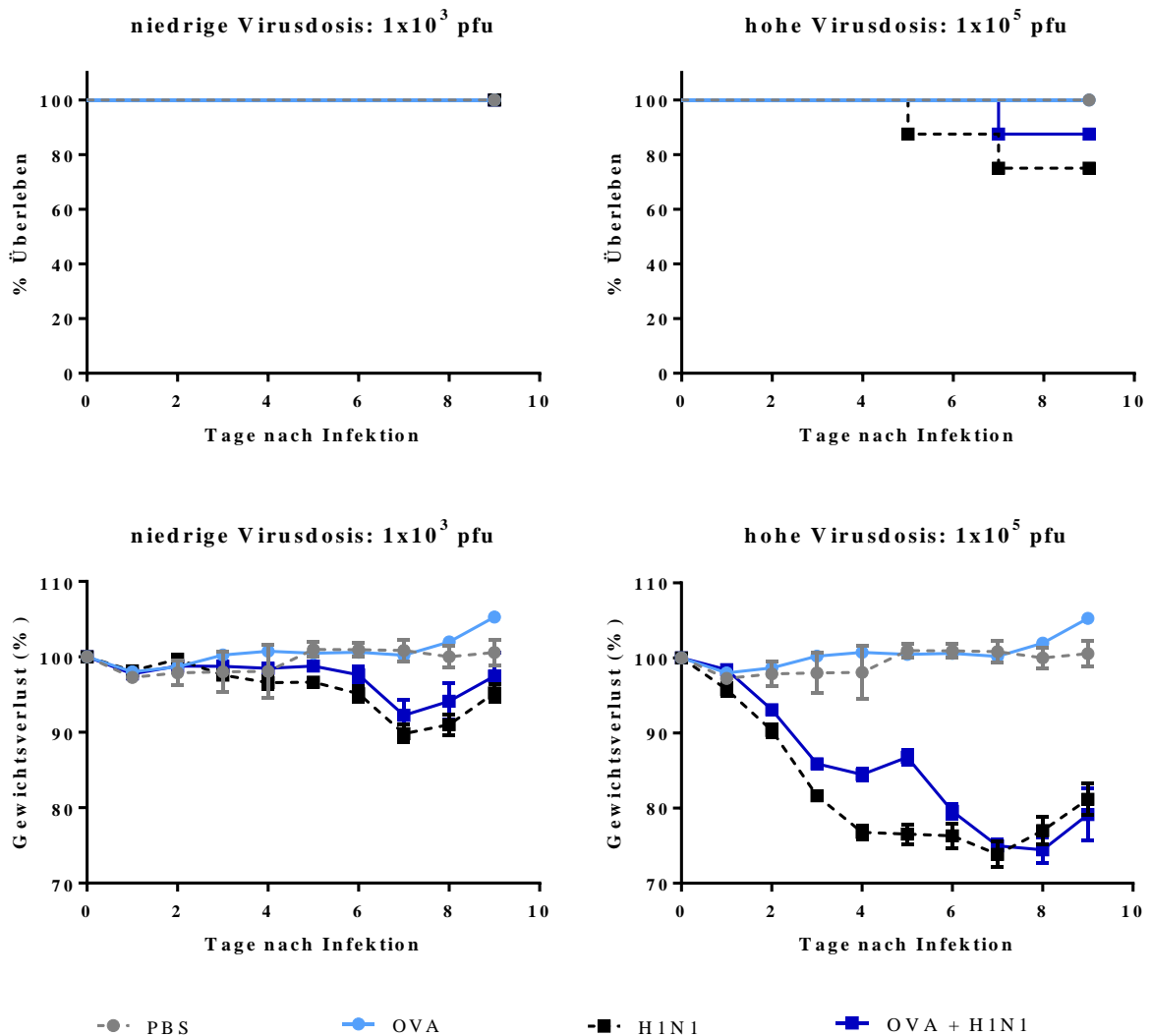


Abb. 4.17: Überleben und Gewichtsverlust.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.2 beschrieben behandelt. Eine erneute OVA-Aerosol-Exposition an den Tagen 35-37 fand nicht statt. Täglich wurden das Gewicht und das Überleben der Mäuse kontrolliert und protokolliert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=8).

Bei den Gewichtsverlusten sind Reduktionen von bis zu zehn Prozent des Ausgangsgewichtes bei H1N1_{niedrig} und OVA+H1N1_{niedrig} möglich. Bei der hohen Infektionsdosis sind sogar Gewichtsverluste bis zu 25 % des Ausgangsgewichtes zu verzeichnen. Tendenziell scheint der

Gewichtsverlust bei H1N1 größer als der von OVA+H1N1. PBS und OVA zeigen keine Gewichtsverluste.

Im Gegensatz zu der ersten Version des Versuchsprotokolls, zeigt sich hier, dass die höchste Zellzahl von infiltrierenden Immunzellen im Lungenlumen nicht bei OVA vorkommt (siehe Abb. 4.18). Hier sind die höchsten Zellzahlen jeweils bei H1N1_{niedrig} und OVA+H1N1_{niedrig} beziehungsweise H1N1_{hoch} und OVA+H1N1_{hoch} zu finden. Diese befinden sich auf gleichem Niveau. Bei PBS sind ebenfalls nur geringe Zellzahlen zu finden, die auch hier hauptsächlich aus Makrophagen bestehen. Die höchste Anzahl an Makrophagen wurde im Lungenlumen der Mäuse von H1N1_{hoch} gefunden, dicht gefolgt von den Mäusen OVA+H1N1_{hoch}. Geringere, aber auf ähnlichem Niveau befindliche Makrophagenanzahlen wurden bei H1N1_{niedrig} und OVA+H1N1_{niedrig} gefunden. Bei OVA wurden Makrophagen mit einer ähnlich hohen Anzahl wie bei PBS in der Lunge detektiert.

Eosinophile sind bei OVA, H1N1_{niedrig}, H1N1_{hoch}, OVA+H1N1_{niedrig} und OVA+H1N1_{hoch} in die Lunge eingewandert. Geringe Eosinophilenzahlen finden sich bei H1N1_{niedrig} und H1N1_{hoch} gefolgt von OVA. Die höchste Einwanderung von Eosinophilen findet man in bei OVA+H1N1_{niedrig} und OVA+H1N1_{hoch}.

Neutrophile wandern nur in den mit Influenza-Virus infizierten Mäusen in die Lunge ein. Hierbei zeigt sich, dass es zu einer verstärkten Einwanderung der Neutrophilen bei H1N1_{niedrig} gegenüber OVA+H1N1_{niedrig} beziehungsweise H1N1_{hoch} gegenüber OVA+H1N1_{hoch} kommt.

Lymphozyten finden sich in den Lungen aller Behandlungsgruppen, außer PBS. Dabei findet man eine signifikant erhöhte Einwanderung der Lymphozyten bei OVA+H1N1_{niedrig} und OVA+H1N1_{hoch} im Vergleich mit OVA. Eine weitere tendenziell erhöhte Einwanderung findet sich nochmals bei dem Vergleich von H1N1_{niedrig} und OVA+H1N1_{niedrig} beziehungsweise H1N1_{hoch} und OVA+H1N1_{hoch}.

Hier wurden ebenfalls der Umbau der Atemwege, die Mukusproduktion und die Einwanderung von Immunzellen in das Lungengewebe analysiert. Es ist zu erkennen, dass bei PBS, H1N1_{niedrig} und H1N1_{hoch} nur wenige mukusproduzierende Becherzellen vorkommen. Eine deutlich erhöhte Anzahl an Becherzellen findet sich in den Atemwegen von OVA, die signifikant bei OVA+H1N1_{niedrig} und OVA+H1N1_{hoch} abhängig von der Infektionsdosis erniedrigt sind (siehe Abb. 4.19, oben links). Das gleiche Bild findet sich auch für den produzierten Mukus (siehe Abb. 4.19, oben rechts). Nur wenig Mukus ist bei PBS, H1N1_{niedrig} und H1N1_{hoch} präsent. Die

größte Menge an Mukus findet sich bei OVA und auch diese ist bei OVA+H1N1_{niedrig} und OVA+H1N1_{hoch} abhängig von der Infektionsdosis reduziert.

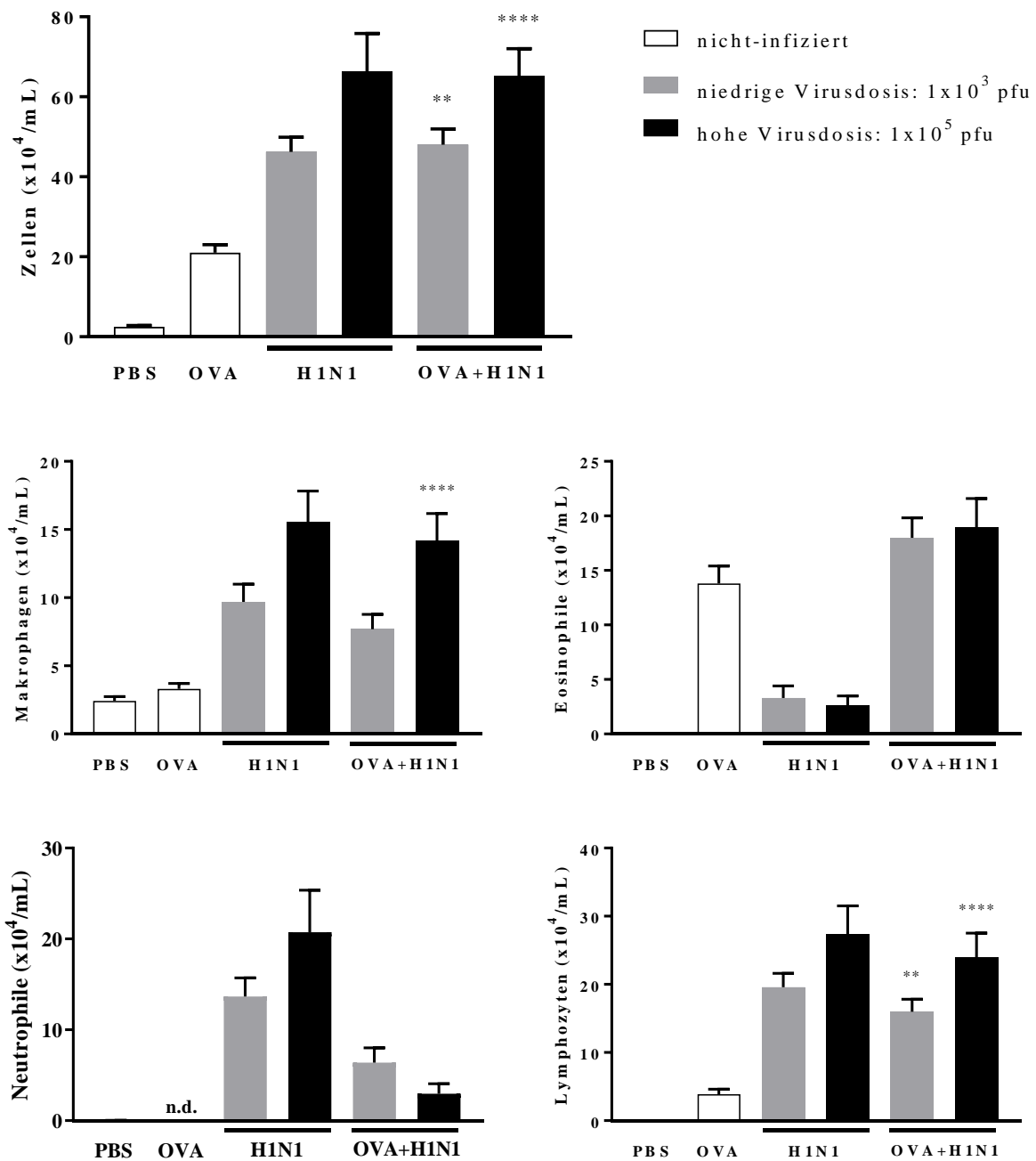


Abb. 4.18: Infiltrierende Immuzellen in das Lungenlumen.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.2 beschrieben behandelt. Eine erneute OVA-Aerosol-Exposition an den Tagen 35-37 fand nicht statt. An Tag 38 wurde eine broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt und anschließend die Gesamtzellanzahl darin ermittelt. Zusätzlich wurden für die morphologische Differenzierung dieser Zellen Zytospins (siehe 3.5) angefertigt, gefärbt und anschließend mikroskopisch ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=6-8$). Die Gruppen wurden statistisch innerhalb einer Infektionsdosis mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+H1N1 sind dargestellt. Abkürzung: n.d. – nicht detektierbar (alle Werte sind 0)

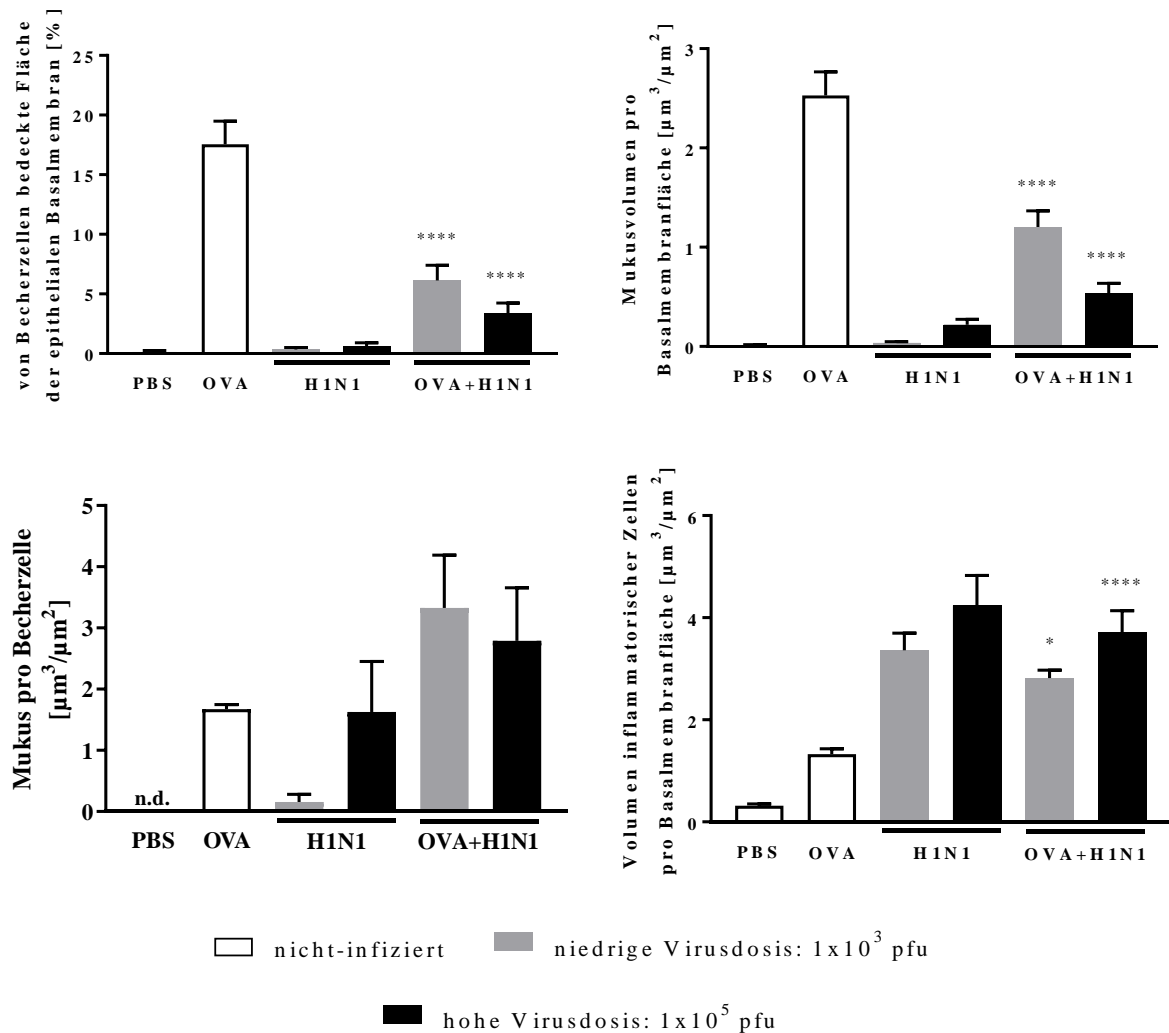


Abb. 4.19: Becherzellhyperplasie, Mukusproduktion und infiltrierende Immunzellen in den Atemwegen. Die Mäuse wurden wie in 3.2.2 beschrieben behandelt. Eine erneute OVA-Aerosol-Exposition an den Tagen 35-37 fand nicht statt. An Tag 38 wurden die Lungen für die Histologie entnommen und unter standardisierten Bedingungen präpariert (siehe 3.6.1). Die Schnitte wurden mit der PAS-Färbung gefärbt (siehe 3.6.3) und anschließend mikroskopisch ausgewertet (siehe 3.7). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=6-8). Die Gruppen wurden statistisch innerhalb einer Infektionsdosis mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+H1N1 sind dargestellt. Abkürzung: n.d. – nicht detektierbar (alle Werte sind 0)

Am wenigsten Mukus innerhalb einer Becherzelle zeigt sich bei H1N1_{niedrig}, gefolgt von OVA und H1N1_{hoch}. Tendenziell wird der meiste Mukus pro Becherzelle in OVA+H1N1_{niedrig} und OVA+H1N1_{hoch} gespeichert.

Ähnlich den Zellzahlen im Lungenlumen, finden sich auch im Lungengewebe nur wenige infiltrierende Immunzellen bei PBS. Auch signifikant erhöhte Zellzahlen bei OVA+H1N1_{niedrig} und OVA+H1N1_{hoch} sind im Vergleich gegenüber OVA zu sehen. Die tendenziell höchsten Zellzahlen sind jedoch bei H1N1_{niedrig} und H1N1_{hoch} zu finden.

Auch in dieser Version des Versuchsprotokolls wurde neben den zellulären Veränderungen die Beteiligung von löslichen Mediatoren auf Expressionsebene (siehe Abb. 4.20) in der niedrigen und hohen Infektionsdosis und auf Proteinebene (siehe Abb. 4.21 bis 4.23) in der hohen Infektionsdosis untersucht.

Bei den T_H2-Zytokinen findet sich keine Expression von IL-4 bei OVA. In den verbleibenden Gruppen liegt die Expression auf gleicher Höhe. Bei IL-5 liegt die höchste Expression bei OVA. In den restlichen Gruppen befindet sich die Expression ebenfalls auf gleichem Niveau. Dies gilt ebenso für IL-13. Auch hier ist die stärkste Expression bei OVA. Die Expression in den verbleibenden Gruppen liegt auf gleicher Höhe.

Bei dem pro-inflammatorischen Zytokin IL-6 zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Expression bei OVA+H1N1_{niedrig} und OVA+H1N1_{hoch} im Vergleich zu OVA. Die jeweils höchste Expression findet sich jedoch bei H1N1_{niedrig} und H1N1_{hoch}.

Für das T_H17-Zytokin IL-17A zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den T_H2-Zytokinen IL-5 und IL-13. Die höchste Expression liegt bei OVA. Die Expression in den fünf verbleibenden Gruppen liegt auf gleicher Höhe.

Bei dem Chemokin KC/CXCL1 liegen die Expressionen bei PBS, H1N1_{niedrig} und der OVA+H1N1_{niedrig} zusammen auf dem höchsten Niveau. Eine tendenziell niedrigere Expression findet sich demnach bei OVA, H1N1_{hoch} und OVA+H1N1_{hoch}.

Die Ergebnisse aus dem ersten Protokoll legten nahe, dass ggfs. noch weitere Mediatoren bzw. Zellen beteiligt sein könnten. Daher wurden zusätzlich die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und *Transforming growth factor* (TGF)- β untersucht. Dabei zeigt sich, dass die Expression von IL-10 bei PBS und OVA sehr gering ausfällt. Eine erhöhte Expression von IL-10 findet sich bei H1N1_{niedrig} und H1N1_{hoch}. Diese ist bei OVA+H1N1_{niedrig} nochmals erhöht gegenüber H1N1_{niedrig} und tendenziell erniedrigt bei OVA+H1N1_{hoch} im Vergleich zu H1N1_{hoch}.

Th2-assoziiert

verschiedene

anti-inflammatorisch

Transkriptionsfaktoren

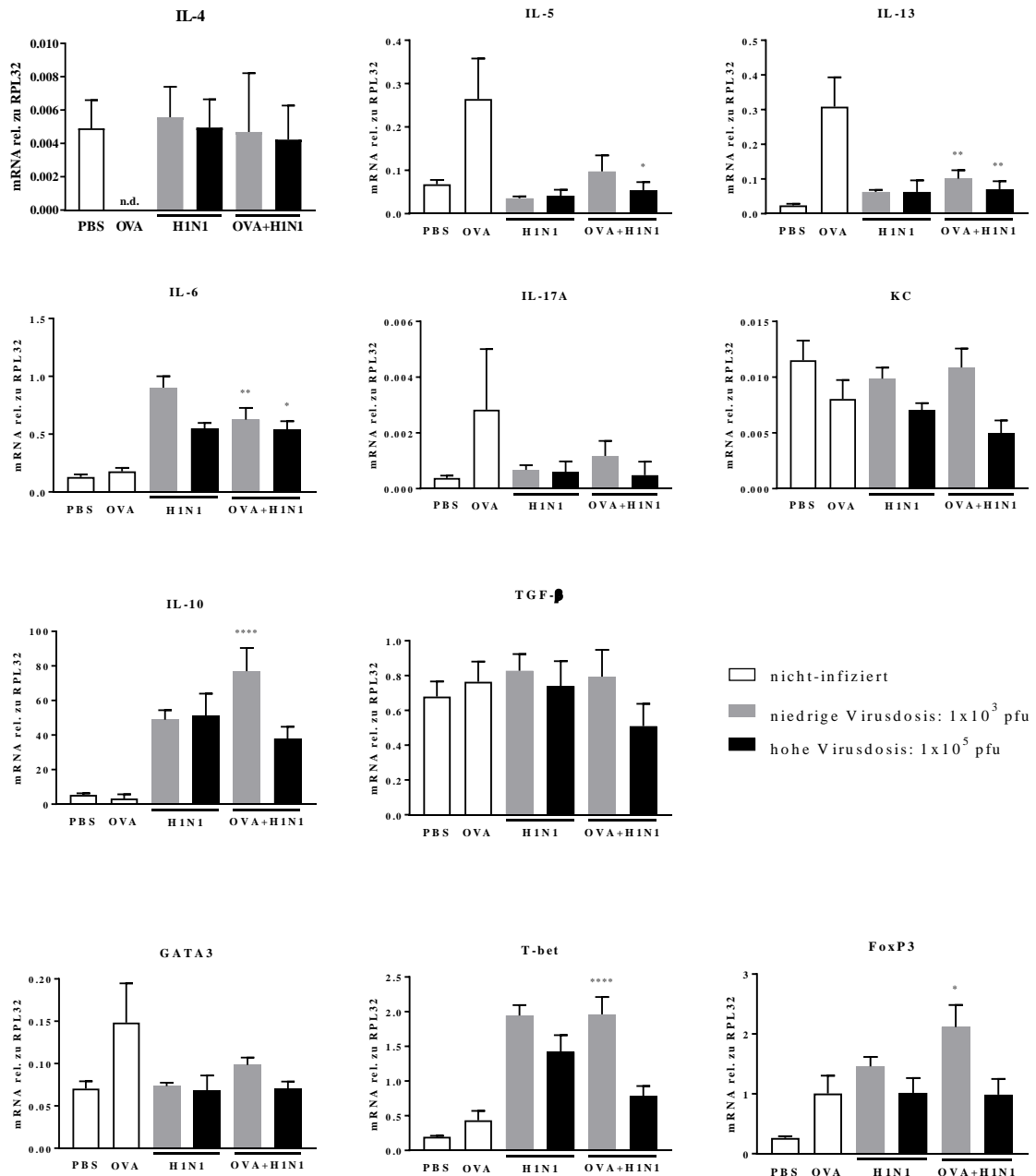


Abb. 4.20: Expression von Immunmediatoren und Transkriptionsfaktoren im Lungengewebe.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.2 beschrieben behandelt. Eine erneute OVA-Aerosol-Exposition an den Tagen 35-37 fand nicht statt. An Tag 38 wurden die Lungen entnommen (siehe 3.4.4), anschließend zu Lungenhomogenat verarbeitet (siehe 3.8.2), die RNA isoliert (siehe 3.9), eine reverse Transkription (siehe 3.10) und eine RT-qPCR (siehe 3.11) durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=6-8$). Die Gruppen wurden statistisch innerhalb einer Infektionsdosis mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+H1N1 sind dargestellt. Abkürzung: n.d. – nicht detektierbar (alle Werte sind 0)

Zusätzlich wurden die typischen Transkriptionsfaktoren der T_H2 -Zellen GATA3, T_H1 -Zellen T-bet beziehungsweise regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3) auf ihre Expression hin untersucht. Hierbei zeigt sich, dass die Expression des Transkriptionsfaktors GATA3 in der Lunge der OVA-Mäuse am höchsten ist. In den verbleibenden Gruppen liegt die Expression auf gleicher niedrigerer Höhe.

T-bet wird nur wenig bei PBS und OVA in der Lunge exprimiert. Die höchste Expression findet sich bei $H1N1_{niedrig}$ beziehungsweise $H1N1_{hoch}$ und dort vor allen Dingen bei $H1N1_{niedrig}$.

FoxP3 wird nur gering bei PBS exprimiert. Die Expression bei OVA, $H1N1_{hoch}$ und $OVA+H1N1_{hoch}$ liegen auf gleicher Höhe. Eine tendenziell höhere Expression findet man bei $H1N1_{niedrig}$ und $OVA+H1N1_{niedrig}$ im Vergleich zu OVA.

Betrachtet man nun die T_H2 -Zytokine auf Proteinebene (siehe Abb. 4.21), so zeigt sich, dass IL-4 nicht bei PBS und $H1N1_{hoch}$ gebildet wird. Die höchste Konzentration findet sich bei OVA. Eine erhöhte Produktion von IL-4 konnte somit bei $OVA+H1N1_{hoch}$ nicht gefunden werden. Jedoch ist die höchste Konzentration von IL-5 bei $OVA+H1N1_{hoch}$ gegenüber OVA und $H1N1_{hoch}$ zu finden. Auch IL-13 wird am meisten bei OVA produziert und zeigt eine signifikant niedrigere Konzentration bei $OVA+H1N1_{hoch}$.

Bei den pro-inflammatorischen Zytokinen (siehe Abb. 4.22) hingegen zeigt sich ein anderes Bild. Hier werden die drei untersuchten Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α nur in sehr geringem Maße bei PBS und OVA gebildet. Die hauptsächliche Produktion von IL-1 β und TNF- α findet bei $H1N1_{hoch}$ statt gefolgt von $OVA+H1N1_{hoch}$. Bei IL-6 liegt die Produktion bei $H1N1_{hoch}$ und $OVA+H1N1_{hoch}$ bei einer ähnlich hohen Konzentration.

Ein ähnliches Bild wie bei der Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine zeigt sich auch bei IFN- γ (siehe Abb. 4.23, oben links) und IL-10 (siehe Abb. 4.23, unten links). IFN- γ wurde bei PBS und OVA nicht und IL-10 nur in geringer Konzentration produziert. IFN- γ zeigt bei $H1N1_{hoch}$ und $OVA+H1N1_{hoch}$ eine ähnliche Konzentration. IL-10 wird tendenziell mehr bei $OVA+H1N1_{hoch}$ produziert im Vergleich zu $H1N1_{hoch}$.

IL-17A und KC/CXCL1 sind jeweils bei PBS nur in geringer Konzentration vorhanden. Die höchsten Konzentrationen finden sich jeweils bei OVA und nehmen über $H1N1_{hoch}$ bis $OVA+H1N1_{hoch}$ ab.

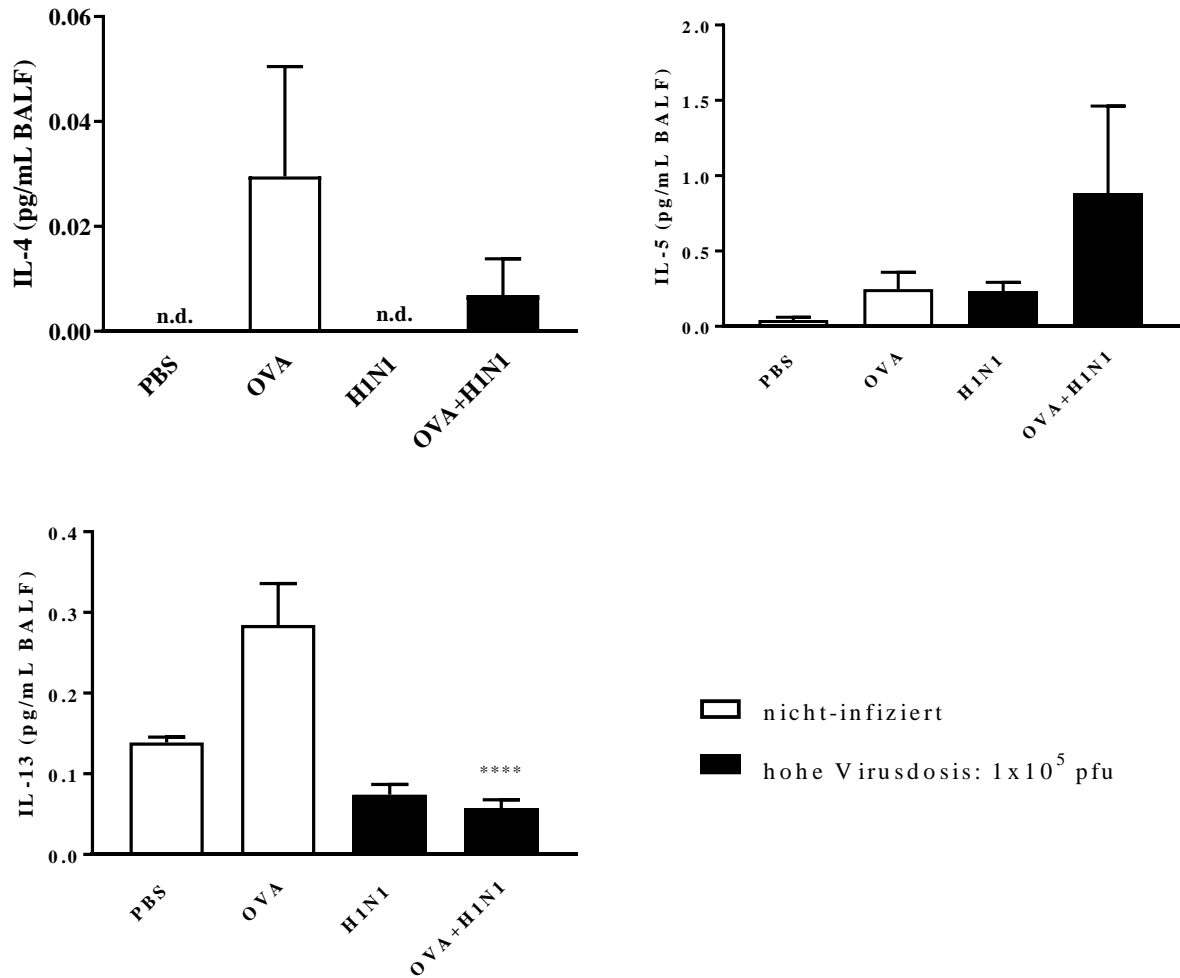


Abb. 4.21: Proteinkonzentrationen von T_H2-Zytokinen im Lungenlumen.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.2 beschrieben behandelt. Eine erneute OVA-Aerosol-Exposition an den Tagen 35-37 fand nicht statt. An Tag 38 wurde eine broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt. Die Proben wurden vor der Ermittlung der Proteinkonzentration mithilfe eines VivaSpin2-Filters gefiltert. Die Proteinkonzentration wurde mittels CBA (siehe 3.12.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=6-8). Die Gruppen wurden statistisch mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+H1N1 sind dargestellt. Abkürzung: n.d. – nicht detektierbar (alle Werte sind 0)

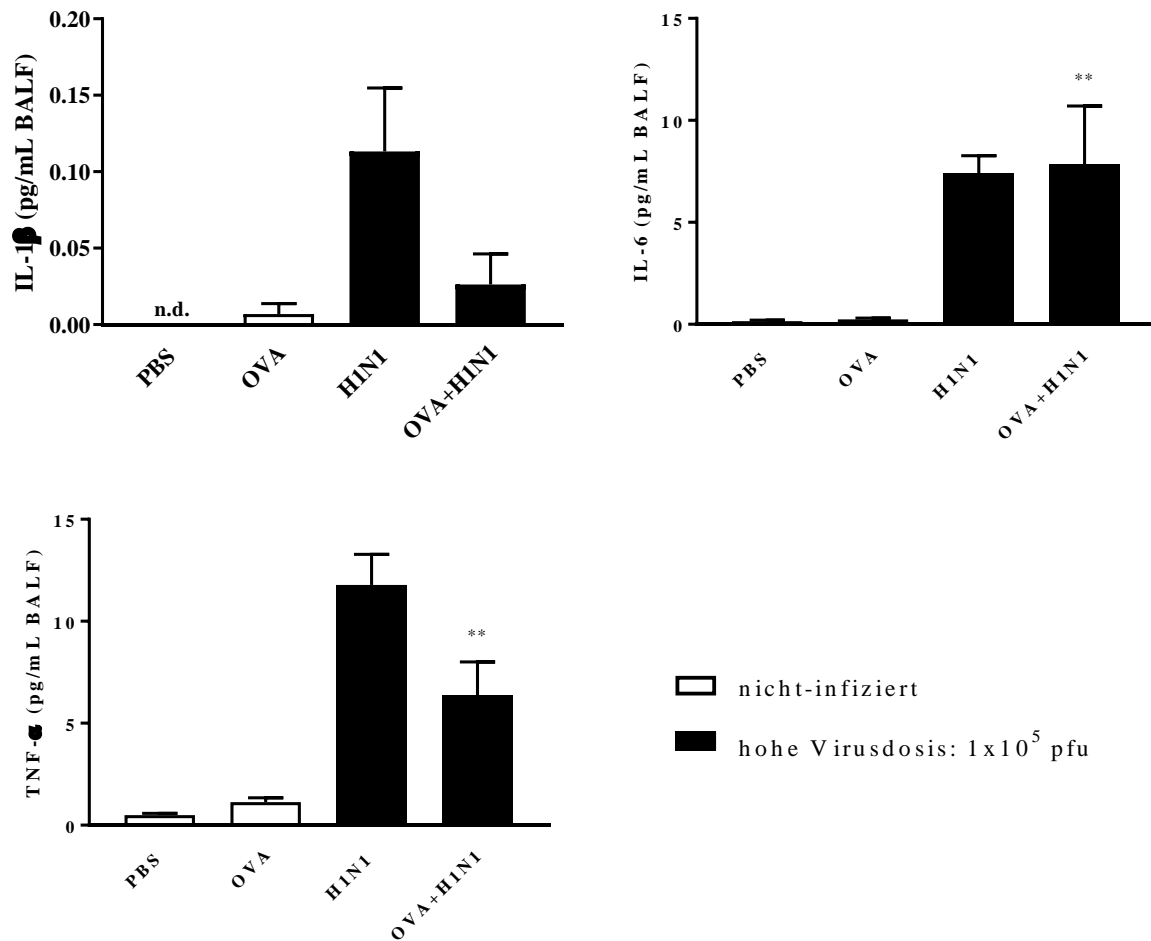


Abb. 4.22: Proteinkonzentrationen von pro-inflammatorischen Zytokinen im Lungenlumen.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.2 beschrieben behandelt. Eine erneute OVA-Aerosol-Exposition an den Tagen 35-37 fand nicht statt. An Tag 38 wurde eine broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt. Die Proben wurden vor der Ermittlung der Proteinkonzentration mithilfe eines VivaSpin2-Filters gefiltert. Die Proteinkonzentration wurde mittels CBA (siehe 3.12.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=6-8). Die Gruppen wurden statistisch mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+H1N1 sind dargestellt. Abkürzung: n.d. – nicht detektierbar (alle Werte sind 0)

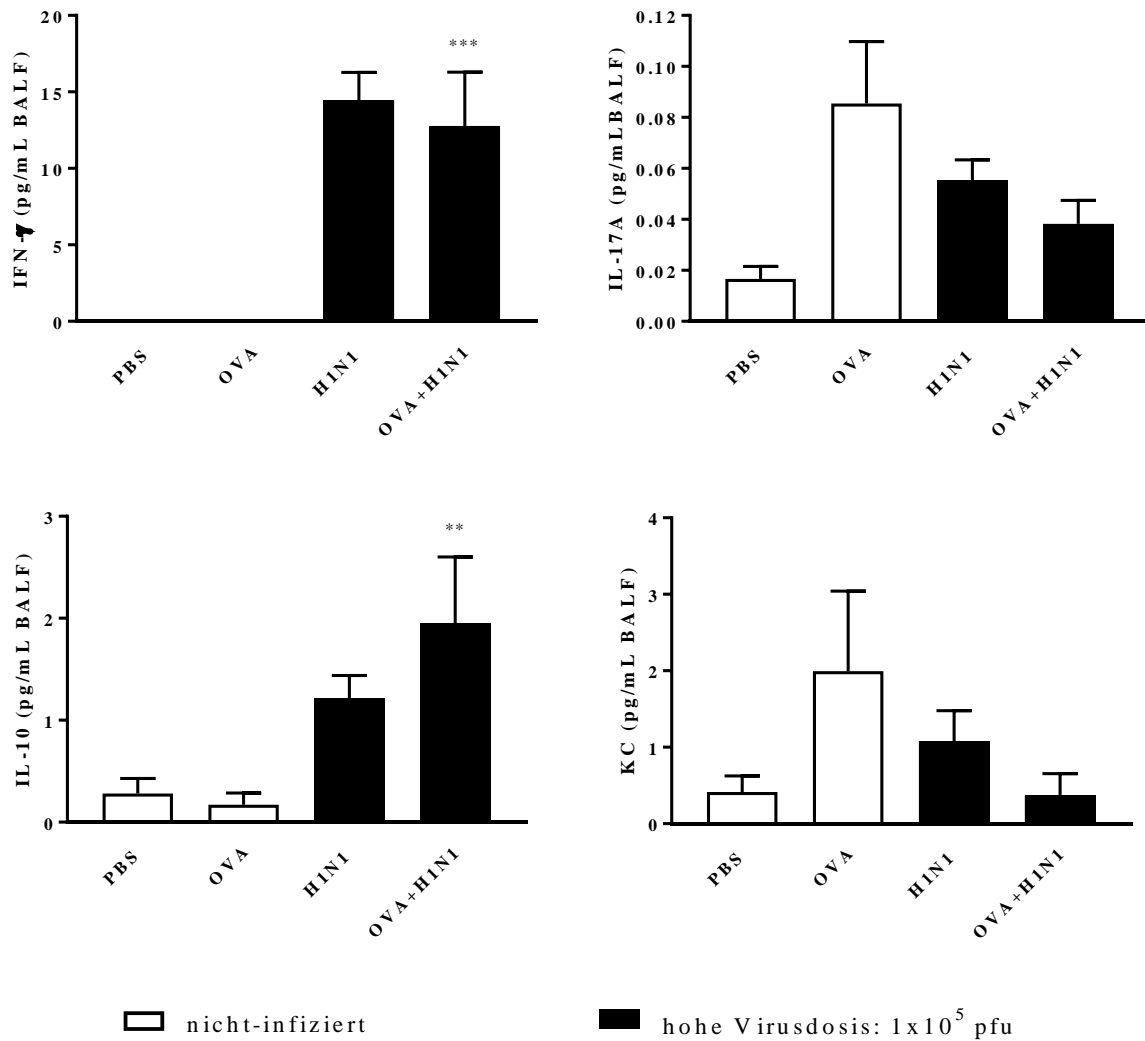


Abb. 4.23: Proteinkonzentrationen verschiedener Immunmediatoren im Lungenlumen.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.2 beschrieben behandelt. Eine erneute OVA-Aerosol-Exposition an den Tagen 35-37 fand nicht statt. An Tag 38 wurde eine broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt. Die Proben wurden vor der Ermittlung der Proteinkonzentration mithilfe eines VivaSpin2-Filters gefiltert. Die Proteinkonzentration wurde mittels CBA (siehe 3.12.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=6-8). Die Gruppen wurden statistisch mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+H1N1 sind dargestellt.

Wie bei der ersten Version des Versuchsprotokolls wurde auch hier der Virustiter im Lungengewebe mittels Plaque-Test bestimmt, um sich ein Bild darüber zu machen, wie sich die zugrundeliegende allergische Entzündung in der Lunge auf die Beseitigung der Influenza A-Viren auswirkt.

Der Virustiter in der Lunge der OVA+H1N1_{hoch}-Mäuse liegt tendenziell höher als bei den H1N1_{hoch}-Mäusen, da bei H1N1_{hoch} keine Viren nachgewiesen werden konnten (siehe Abb. 4.24).

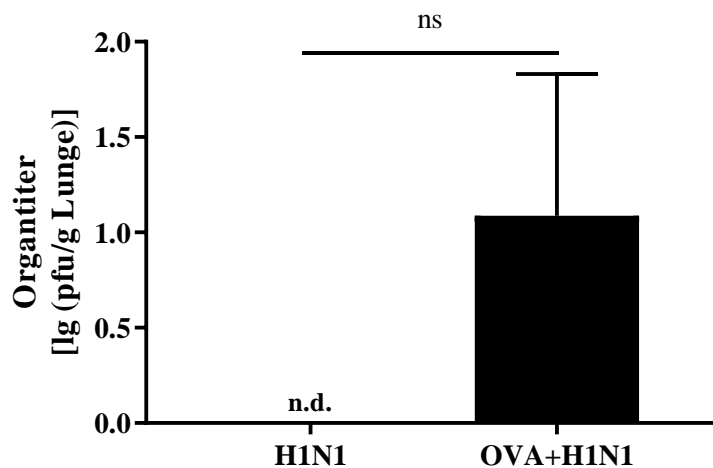


Abb. 4.24: Virusreplikation im Lungengewebe.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.2 beschrieben mit der hohen Virusdosis 1×10^5 pfu behandelt. Eine erneute OVA-Aerosol-Exposition an den Tagen 35-37 fand nicht statt. An Tag 38 wurden die Lungen entnommen (siehe 3.4.4), anschließend zu Lungenhomogenat verarbeitet (siehe 3.8.3.1) und der Virustiter in der Lunge (siehe 3.13.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=6-7). Die Gruppen wurden statistisch mittels Student's t-Test verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns – nicht signifikant. Abkürzung: n.d. – nicht detektierbar (alle Werte sind 0)

In beiden Behandlungsprotokollen konnte, unabhängig von der Infektionsdosis zum Analysezeitpunkt, keine erhöhte Mukusproduktion bei OVA+H1N1 im Vergleich mit OVA beobachtet werden. Eine erhöhte Entzündung in der Lunge im Hinblick auf die Zellinfiltration, die Expression und Produktion von Mediatoren konnte nur bei einem Verzicht auf eine erneute Exposition gegenüber dem Allergen OVA erreicht werden. Hierbei konnte die T_H2 -vermittelte Immunantwort jedoch nicht gesteigert werden. Allerdings lassen sich gesteigerte Konzentrationen für pro-inflammatorische Mediatoren, IL-10 und das T_H1 -Zytokin IFN- γ , sowie eine erhöhte Expression des T_H1 -Transkriptionsfaktors T-bet und des T_{reg} -Transkriptionsfaktors FoxP3 beobachten. Zusätzlich zeigt sich, dass die asthmatischen infizierten Tiere besser überleben, sowie einen geringeren Gewichtsverlust aufweisen im Vergleich mit den gesunden infizierten Tieren. Allerdings konnte ein höherer Virustiter in den Lungen der asthmatischen Tiere als in den gesunden Tieren gemessen werden.

4.3 Mausmodell für die Respiratorisches Syncytialvirus-induzierte Exazerbation experimentellen Asthmas

Da durch Infektion mit Influenza A-Viren in der Maus keine Exazerbation des experimentellen, allergischen Asthmas auszulösen war, wurde das Respiratorische Syncytialvirus als weiteres, wichtiges, respiratorisches Virus als Exazerbationsauslöser in der klinischen Situation verwendet, um ein Mausmodell für die virusinduzierte Exazerbation experimentellen Asthmas zu etablieren und charakterisieren. In diesem Modell wurden die beteiligten Immunantworten während des Infektionsverlaufes an der Exazerbation anhand von zwei Infektionsdosen, niedrig 5×10^3 IU und hoch 5×10^5 IU, und drei Zeitpunkten nach der Infektion untersucht. Dabei handelt es sich um einen frühen Zeitpunkt (ein Tag nach der Infektion), dem Zeitpunkt der maximalen Virusreplikation (vier Tage nach der Infektion) und dem Zeitpunkt der Viruselimination (acht Tage nach der Infektion)¹²⁸.

Dafür wurden sowohl die für die allergischen Asthma-typischen Immunantworten und anti-virale Immunantworten im Hinblick auf strukturelle Veränderungen in der Histologie, Zellinfiltration, Expression und Produktion von Immunmediatoren, Infektionsnachweis und die virale Replikation untersucht.

Um eine erfolgreiche Infektion nachzuweisen, werden Überleben und Gewichtsentwicklungen betrachtet. Gewichtsverluste deuten auf eine erfolgreiche Infektion und auf die Schwere der Infektion hin, ebenso das Überleben der Tiere. Hier zeigt sich, dass alle Mäuse mit beiden Infektionsdosen über die betrachteten acht Tage überlebt haben (siehe Abb. 4.25, obere Reihe). Des Weiteren zeigt sich, dass es zu keinen großen Gewichtabnahmen in den verschiedenen Behandlungsgruppen kommt. Lediglich kleinere tägliche Schwankungen sind zu Erkennen (siehe Abb. 4.25, untere Reihe).

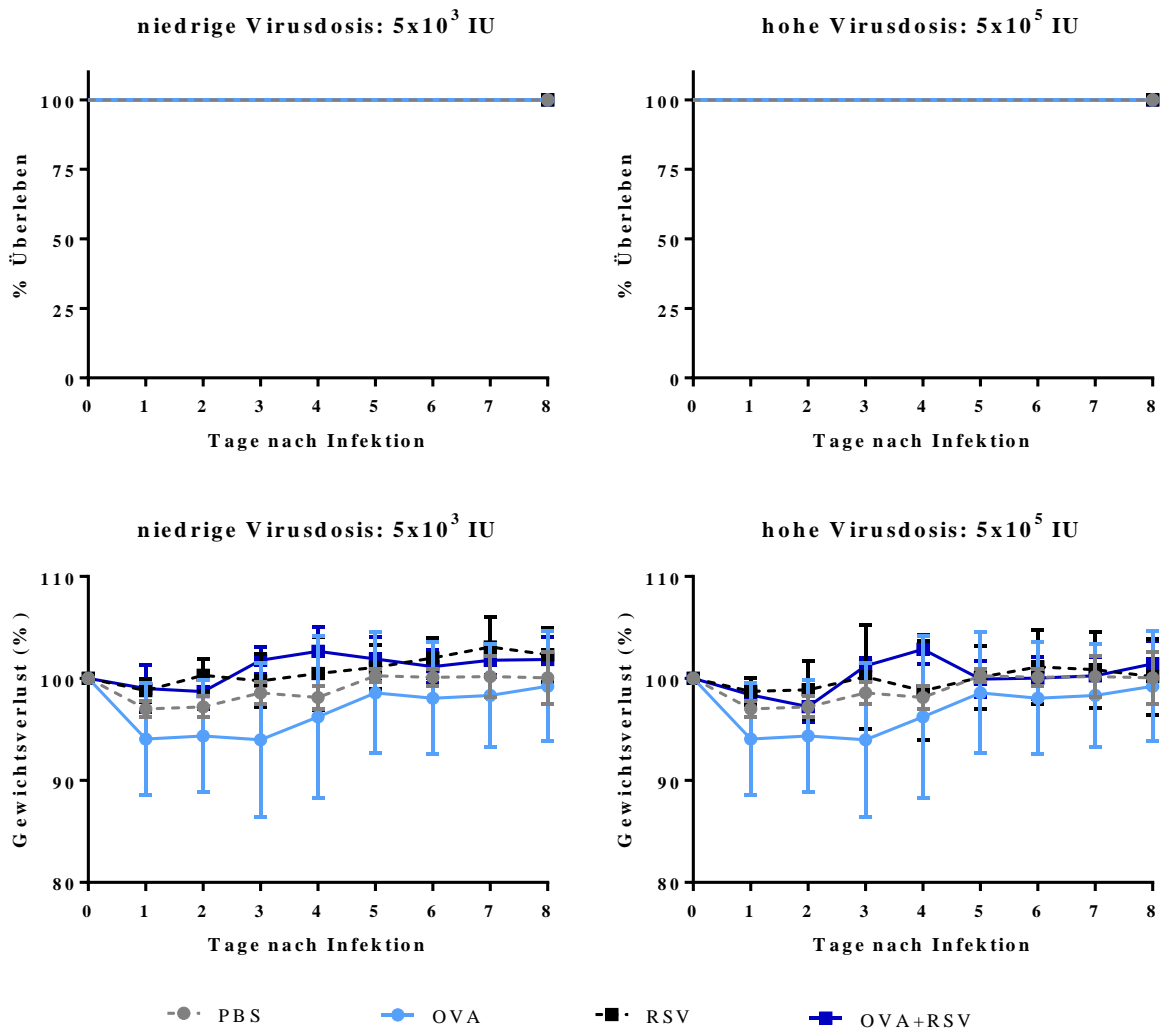


Abb. 4.25: Überleben und Gewichtsverlust.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben behandelt. Täglich wurden das Gewicht und das Überleben der Mäuse kontrolliert und protokolliert. Repräsentativ sind hier die Ergebnisse der Gewichts- und Überlebenskontrollen der Tiere, die für 8 Tage beobachtet wurden, gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=8).

Die Infiltration von Zellen in das Lungenlumen dient als Surrogat für die Entzündung in der Lunge. Einen Tag nach der Infektion zeigt sich, dass es nur zu einer geringen Einwanderung von Immunzellen in das Lungenlumen der Mäuse der Gesundgruppe (PBS), sowie der Infektionsgruppen beider Infektionsdosen (RSV_{niedrig} und RSV_{hoch}) kommt. Diese Zellen bestehen in allen drei Gruppen hauptsächlich aus Makrophagen und einigen wenigen eingewanderten Neutrophilen und Lymphozyten (siehe Abb. 4.26). Eine deutlich erhöhte Einwanderung von Immunzellen in die Lunge, ist im Gegensatz dazu, in der Asthmagruppe (OVA) zu sehen. Diese ist in den Exazerbationsgruppen ($OVA+RSV_{\text{niedrig}}$ und $OVA+RSV_{\text{hoch}}$) nochmals gesteigert. Die Anzahl der Makrophagen bei OVA, $OVA+RSV_{\text{niedrig}}$ und $OVA+RSV_{\text{hoch}}$ liegen auf gleichem Niveau, wie bei PBS , RSV_{niedrig} und RSV_{hoch} .

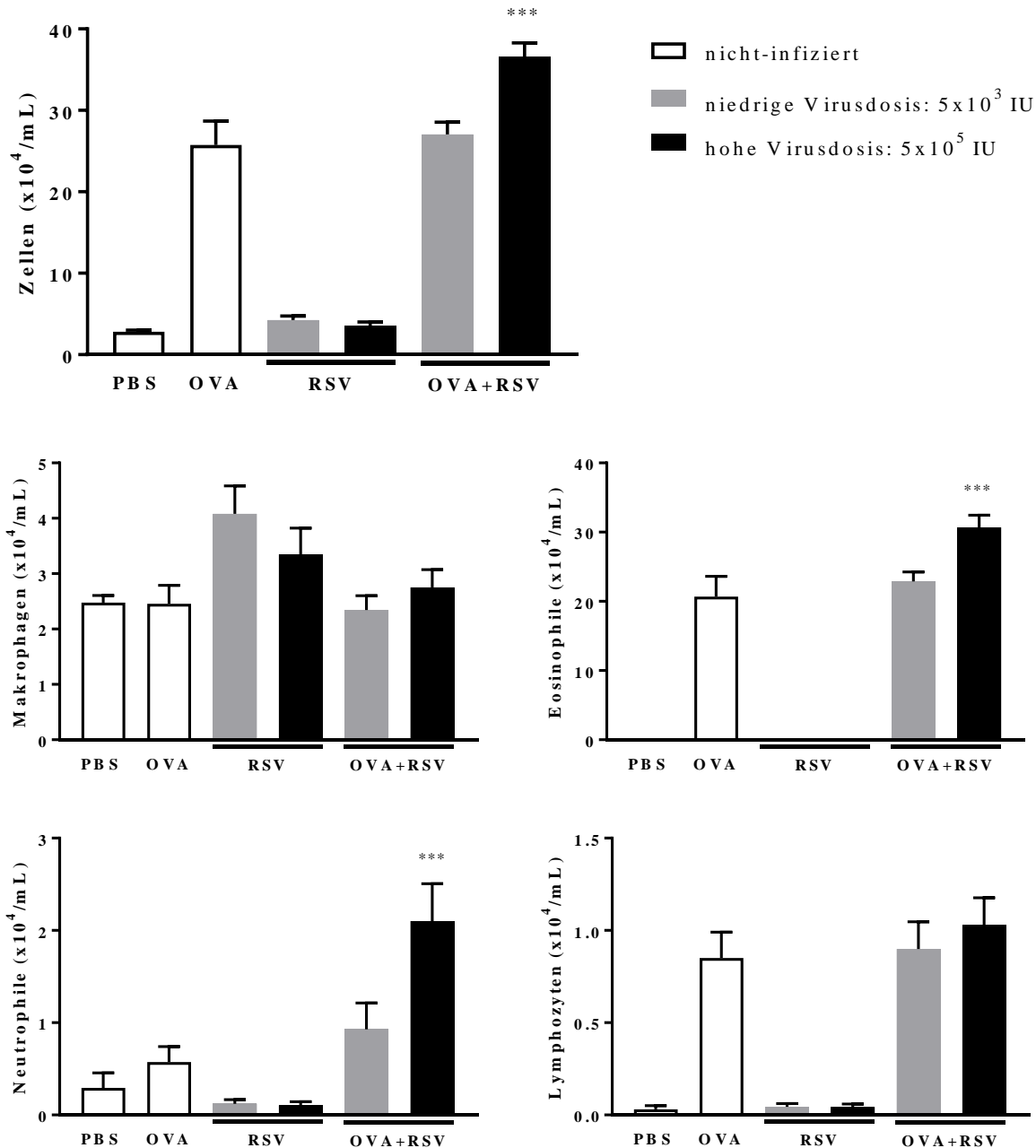


Abb. 4.26: Infiltrierende Immunzellen in das Lungenlumen 1 Tag nach der RSV-Infektion.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben behandelt. An Tag 30 bzw. 1 Tag nach der RSV-Infektion wurde eine broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt und anschließend die Gesamtzellanzahl darin ermittelt. Zusätzlich wurden für die morphologische Differenzierung dieser Zellen Zytospins (siehe 3.5) angefertigt, gefärbt und anschließend mikroskopisch ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=8). Die Gruppen wurden statistisch innerhalb einer Infektionsdosis mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Die Signifikanz zwischen den Gruppen OVA und OVA+RSV sind dargestellt.

Der hauptsächliche Zelltyp der eingewanderten Immunzellen bei OVA, OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch} stellt der eosinophile Granulozyt (Eosinophile) dar. Gefolgt werden die Eosinophilen von den neutrophilen Granulozyten (Neutrophilen) und Lymphozyten. In den Eosinophilen und Neutrophilen ist jeweils eine gesteigerte Einwanderung zwischen OVA und OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch} erkennbar, die im Vergleich zwischen OVA und OVA+RSV_{hoch} sogar signifikant erhöht sind. Bei den Lymphozyten zeigt sich lediglich eine Tendenz der erhöhten Einwanderung bei OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch} im Vergleich zu OVA.

Vier Tage nach der RSV-Infektion ist die Einwanderung von Immunzellen in die Lungen der PBS-Mäuse, RSV_{niedrig}-Mäuse und RSV_{hoch}-Mäuse ebenfalls gering (siehe Abb. 4.27). Auch hier ist der hauptsächliche Zelltyp der Makrophage. Nur sehr geringe Zahlen an Neutrophilen und Lymphozyten können bei RSV_{niedrig} und RSV_{hoch} beobachtet werden. Die Gesamtzellzahl der infiltrierenden Zellen bei OVA liegt leicht höher als einen Tag nach der Infektion. Diese liegt auch höher im Vergleich zu OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch}. Die Makrophagenanzahl ist bei OVA und OVA+RSV_{niedrig} auf gleichem Niveau mit PBS, RSV_{niedrig} und RSV_{hoch}. Die Makrophagenanzahl in OVA+RSV_{hoch} ist signifikant erhöht im Vergleich mit der Asthmagruppe. Den hauptsächlichen Anteil der Zellen machen auch hier die Eosinophilen bei OVA, OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch} aus. Hier liegen die Eosinophilenzahlen in OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch} gegenüber OVA ebenfalls niedriger. Ebenso verhält es sich bei den Lymphozyten. Lediglich eine tendenziell erhöhte Einwanderung von Neutrophilen, vor allem in OVA+RSV_{hoch} gegenüber OVA ist zu beobachten.

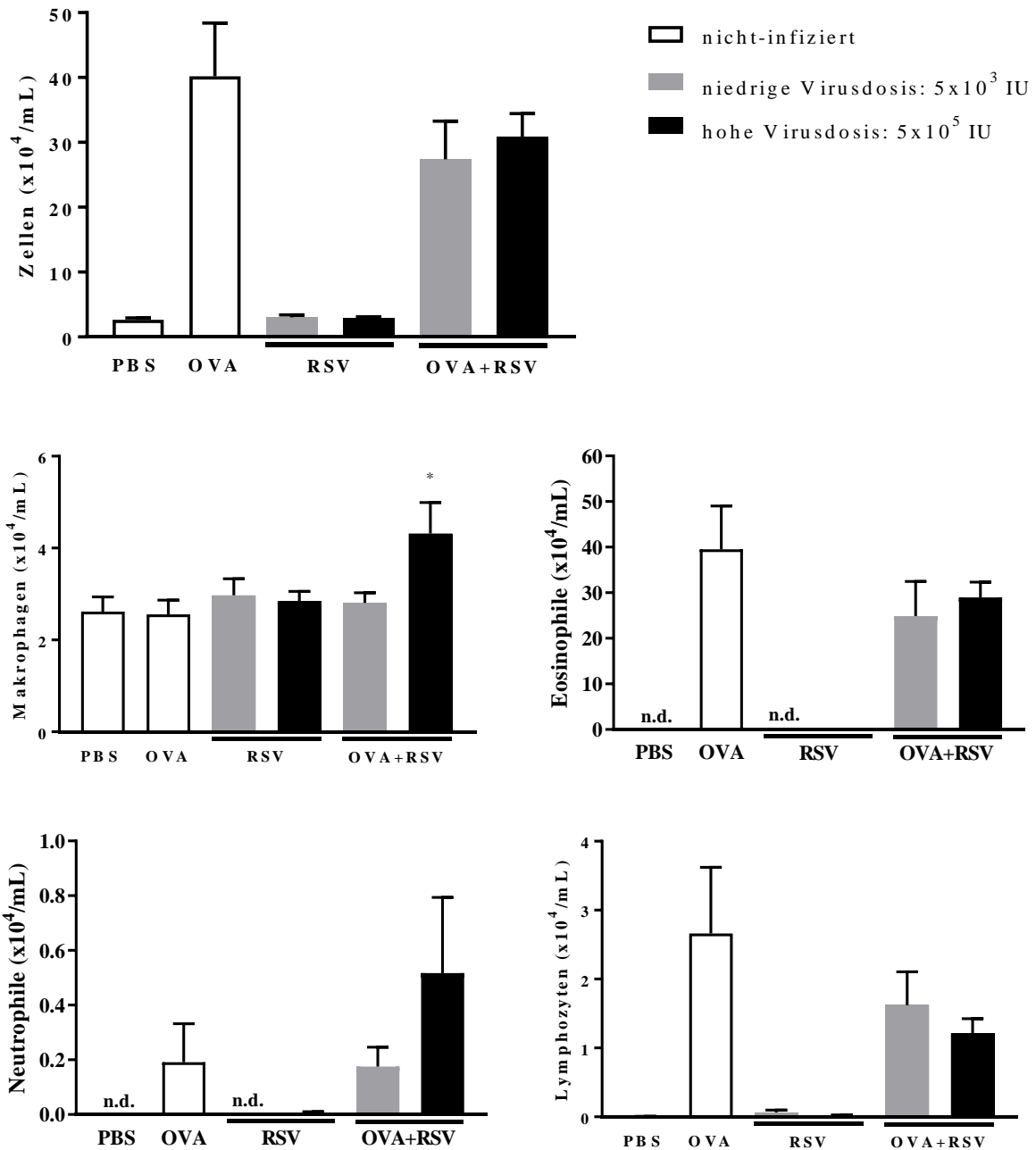


Abb. 4.27: Infiltrierende Immunzellen in das Lungenlumen 4 Tage nach der RSV-Infektion.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben behandelt. An Tag 33 bzw. 4 Tage nach der RSV-Infektion wurde eine broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt und anschließend die Gesamtzellanzahl darin ermittelt. Zusätzlich wurden für die morphologische Differenzierung dieser Zellen Zytospins (siehe 3.5) angefertigt, gefärbt und anschließend mikroskopisch ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=8). Die Gruppen wurden statistisch innerhalb einer Infektionsdosis mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+RSV sind dargestellt. Abkürzung: n.d. – nicht detektierbar (alle Werte sind 0)

Auch acht Tage nach der Infektion sind die Gesamtzellzahlen der infiltrierenden Zellen bei PBS, RSV_{niedrig} und RSV_{hoch} gering (siehe Abb. 4.28) und liegen auf ungefähr ähnlicher Höhe wie auch vier Tage beziehungsweise einen Tag nach der Infektion. Wie auch zu den anderen untersuchten Zeitpunkten besteht die Zellpopulation hauptsächlich aus Makrophagen. Lediglich einige wenige Neutrophile und Lymphozyten sind bei RSV_{niedrig} und RSV_{hoch} zu beobachten.

Die Gesamtzellzahlen der infiltrierenden Zellen bei OVA, OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch} liegen hier deutlich niedriger als im Vergleich zu den beiden früheren untersuchten Zeitpunkten. Die Zahlen von OVA und OVA+RSV_{niedrig} befinden sich auf ähnlichem Niveau. Nur OVA+RSV_{hoch} zeigt eine tendenziell erhöhte Zellzahl infiltrierender Immunzellen. Der Blick auf die Differenzierung der Zellen zeigt, dass die Anzahl der Makrophagen aller Gruppen auf gleicher Höhe liegen. Eosinophile sind ebenfalls der hauptsächlich eingewanderte Zelltyp bei OVA, OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch}. Hier zeigt sich nur eine erhöhte Einwanderung der Eosinophile bei OVA+RSV_{hoch} im Vergleich mit OVA und OVA+RSV_{niedrig}, die eine ähnliche Anzahl an Eosinophilen aufweisen. Neutrophile sind acht Tage nach der Infektion bei OVA nicht zu beobachten. Mit steigender Infektionsdosis in den Exazerbationsgruppen steigt auch die Neutrophilenanzahl in der Lunge der Mäuse an. Lymphozyten finden sich vermehrt bei OVA im Vergleich zu OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch}, in denen die Anzahl abhängig von der Infektionsdosis abnimmt.

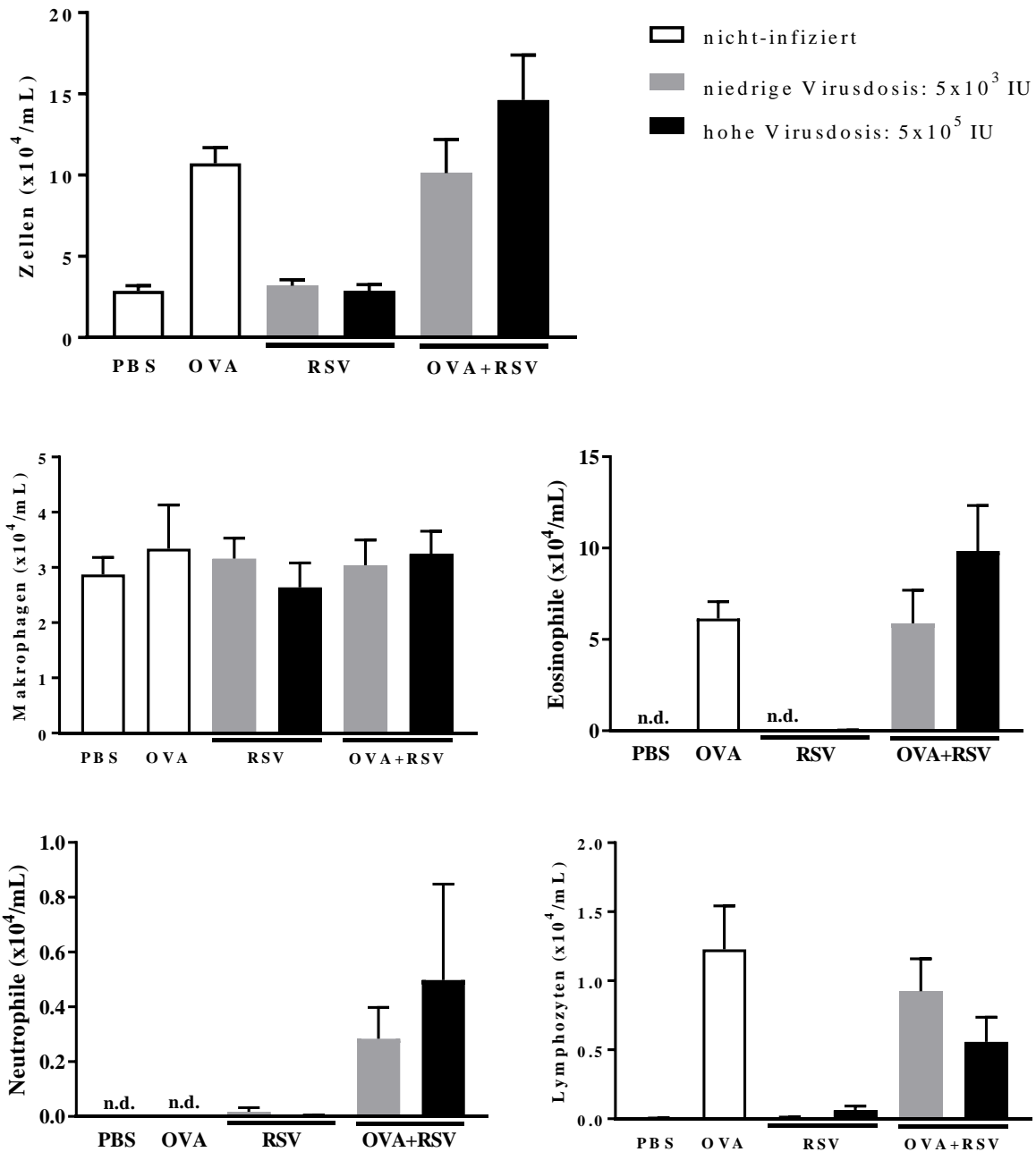


Abb. 4.28: Infiltrierende Immunzellen in das Lungenlumen 8 Tage nach der RSV-Infektion.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben behandelt. An Tag 37 bzw. 8 Tage nach der RSV-Infektion wurde eine broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt und anschließend die Gesamtzellanzahl darin ermittelt. Zusätzlich wurden für die morphologische Differenzierung dieser Zellen Zytospins (siehe 3.5) angefertigt, gefärbt und anschließend mikroskopisch ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=8). Die Gruppen wurden statistisch innerhalb einer Infektionsdosis mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+RSV sind dargestellt. Abkürzung: n.d. – nicht detektierbar (alle Werte sind 0)

Neben den zellulären Veränderungen von migrierenden Immunzellen wurden auch die Veränderungen der Atemwegsepithelzellen und die Mukusproduktion analysiert. Hierbei zeigt sich einen Tag nach der Infektion (siehe Abb. 4.29), dass bei PBS, RSV_{niedrig} und RSV_{hoch} nur

wenige Becherzellen innerhalb des Atemwegsepithels vertreten sind. Bei OVA, OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch} sind deutlich erhöhte Zahlen an Becherzellen im Atemwegsepithel zu finden. Diese vermehrte Zahl an Becherzellen ist bei OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch} gegenüber OVA nochmals gesteigert.

Ein ganz ähnliches Bild zeigt sich bei der Produktion von Mukus (siehe Abb. 4.29, oben rechts). Nur wenig Mukus wird bei PBS, RSV_{niedrig} und RSV_{hoch} produziert. Eine ansteigende Produktion von Mukus ist hingegen von OVA über OVA+RSV_{niedrig} zu OVA+RSV_{hoch} zu beobachten. Die erhöhte Mukusproduktion bei OVA+RSV_{hoch} gegenüber OVA ist signifikant.

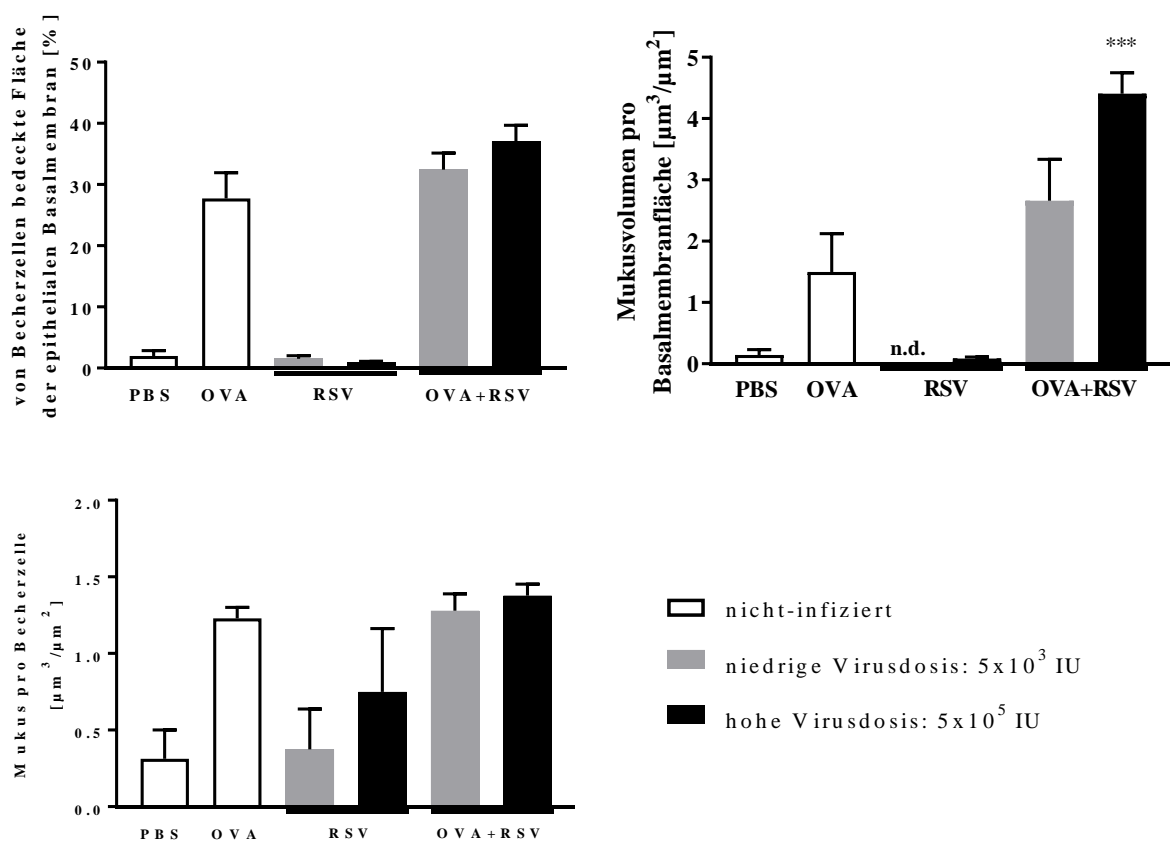


Abb. 4.29: Becherzellhyperplasie und Mukusproduktion in den Atemwegen 1 Tag nach der RSV-Infektion.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben behandelt. An Tag 30 bzw. 1 Tag nach der RSV-Infektion wurden die Lungen für die Histologie entnommen und unter standardisierten Bedingungen präpariert (siehe 3.6.1). Die Schnitte wurden mit der PAS-Färbung gefärbt (siehe 3.6.3) und anschließend mikroskopisch ausgewertet (siehe 3.7). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=8). Die Gruppen wurden statistisch innerhalb einer Infektionsdosis mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+RSV sind dargestellt. Abkürzung: n.d. – nicht detektierbar (alle Werte sind 0)

Betrachtet man die gespeicherte Mukusmenge pro Becherzelle einen Tag nach der Infektion (siehe Abb. 4.29, unten links), so fällt auf, dass bei PBS, RSV_{niedrig} und RSV_{hoch} eine ähnliche geringe Menge an Mukus gespeichert ist. Ebenfalls ähnliche Mengen an gespeichertem Mukus in einer Becherzelle finden sich bei OVA, OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch}. Diese ist jedoch tendenziell höher als die bei PBS, RSV_{niedrig} und RSV_{hoch}.

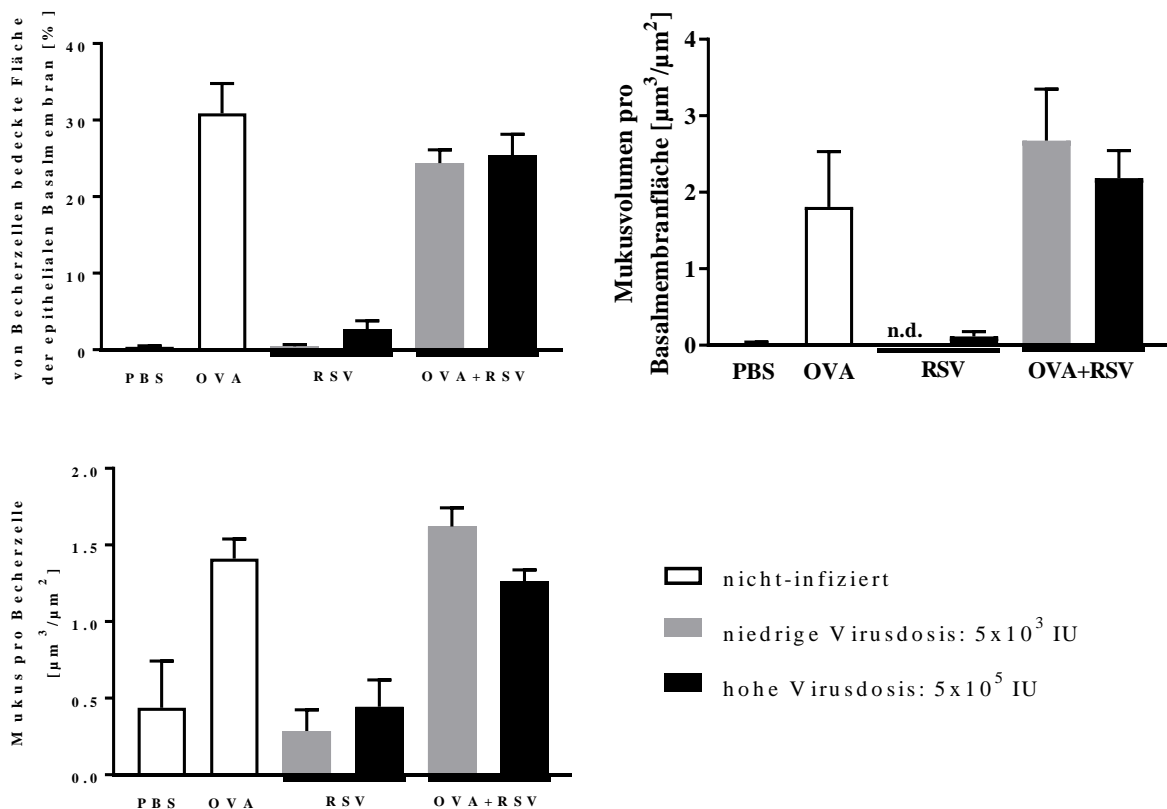


Abb. 4.30: Becherzellhyperplasie und Mukusproduktion in den Atemwegen 4 Tage nach der RSV-Infektion.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben behandelt. An Tag 33 bzw. 4 Tage nach der RSV-Infektion wurden die Lungen für die Histologie entnommen und unter standardisierten Bedingungen präpariert (siehe 3.6.1). Die Schnitte wurden mit der PAS-Färbung gefärbt (siehe 3.6.3) und anschließend mikroskopisch ausgewertet (siehe 3.7). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=8). Die Gruppen wurden statistisch innerhalb einer Infektionsdosis mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+RSV sind dargestellt. Abkürzung: n.d. – nicht detektierbar (alle Werte sind 0)

Vier Tage nach der Virusinfektion findet man ebenfalls nur wenige Becherzellen in den Atemwegen der PBS-Mäuse, RSV_{niedrig}-Mäuse und OVA+RSV_{hoch}-Mäuse. Eine erhöhte Anzahl an Becherzellen findet sich bei OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch}, die bei OVA nochmals gesteigert ist (siehe Abb. 4.30, oben rechts). Gleichsam ist die Mukusproduktion bei PBS, RSV_{niedrig} und RSV_{hoch} sehr gering. Bei OVA ist die Mukusproduktion erhöht und

zusätzlich gesteigert bei OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch} (siehe Abb. 4.30, oben rechts). Die gespeicherte Menge an Mukus innerhalb einer Becherzelle liegt auch hier bei PBS, RSV_{niedrig} und RSV_{hoch} und ist erhöht bei OVA, OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch} (siehe Abb. 4.30, unten links).

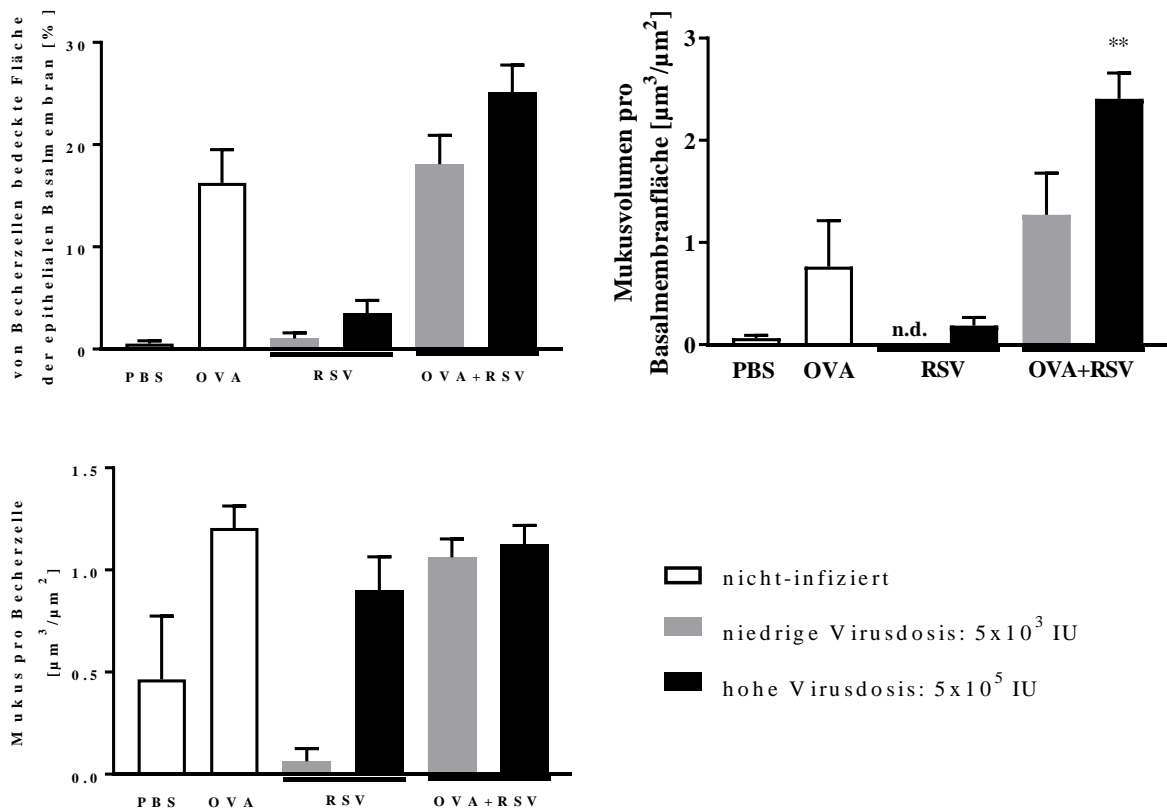


Abb. 4.31: Becherzellhyperplasie und Mukusproduktion in den Atemwegen 8 Tage nach der RSV-Infektion.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben behandelt. An Tag 37 bzw. 8 Tage nach der RSV-Infektion wurden die Lungen für die Histologie entnommen und unter standardisierten Bedingungen präpariert (siehe 3.6.1). Die Schnitte wurden mit der PAS-Färbung gefärbt (siehe 3.6.3) und anschließend mikroskopisch ausgewertet (siehe 3.7). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=8). Die Gruppen wurden statistisch innerhalb einer Infektionsdosis mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001. Die Signifikanz zwischen den Gruppen OVA und OVA+RSV sind dargestellt. Abkürzung: n.d. – nicht detektierbar (alle Werte sind 0)

Auch acht Tage nach der RSV-Infektion finden sich nur wenige Becherzellen in den Atemwegen von PBS, RSV_{niedrig} und RSV_{hoch}. Erhöhte Anzahlen an Becherzellen finden sich hingegen wiederum bei OVA, OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch}. Hierbei steigen die Zahlen von OVA über OVA+RSV_{niedrig} zu OVA+RSV_{hoch} an (siehe Abb. 4.31, oben links). Das gleiche Bild findet sich bei der Mukusproduktion (siehe Abb. 4.31, oben rechts). Bei dem gespeicherten Mukus in einer Becherzelle zeigt sich, dass bei PBS und RSV_{niedrig} weniger Mukus innerhalb

einer Becherzelle gespeichert wird. In den verbleibenden Gruppen liegt die Menge des gespeicherten Mukus innerhalb einer Becherzelle höher, aber zwischen den Gruppen auf ähnlichem Niveau (siehe Abb. 4.31, unten links).

Ein weiteres wichtiges Charakteristikum von Asthma und auch einer Exazerbation ist die verschlechterte Lungenfunktion, die sich durch eine Atemwegshyperreagibilität und einer erhöhten Obstruktion der Atemwege bemerkbar macht. Diese lässt sich durch eine Messung des Atemwegswiderstandes bei einer Methacholinprovokation in einem Plethysmographen (siehe 3.3) untersuchen.

Hier konnte jedoch weder an Tag eins (siehe Abb. 4.32), vier (siehe Abb. 4.33) beziehungsweise Tag acht (siehe Abb. 4.34) nach der Infektion ein erhöhter Atemwegswiderstand in allen Gruppen ermittelt werden.

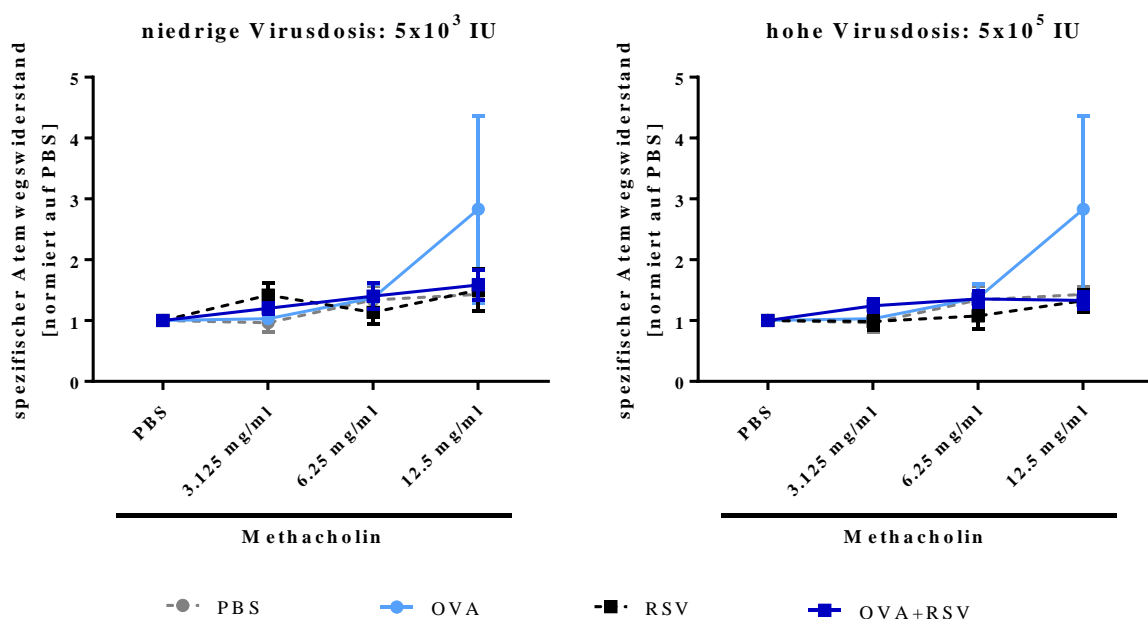


Abb. 4.32: Lungenfunktionsmessung 1 Tag nach der RSV-Infektion.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben behandelt. An Tag 30 bzw. 1 Tag nach der RSV-Infektion wurde die Lungenfunktion der Mäuse bestimmt. Dazu wurden die Mäuse einer Methacholinprovokation ausgesetzt und der Atemwegswiderstand aufgezeichnet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=4). Die Gruppen wurden statistisch innerhalb einer Methacholinkonzentration mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+RSV sind dargestellt.

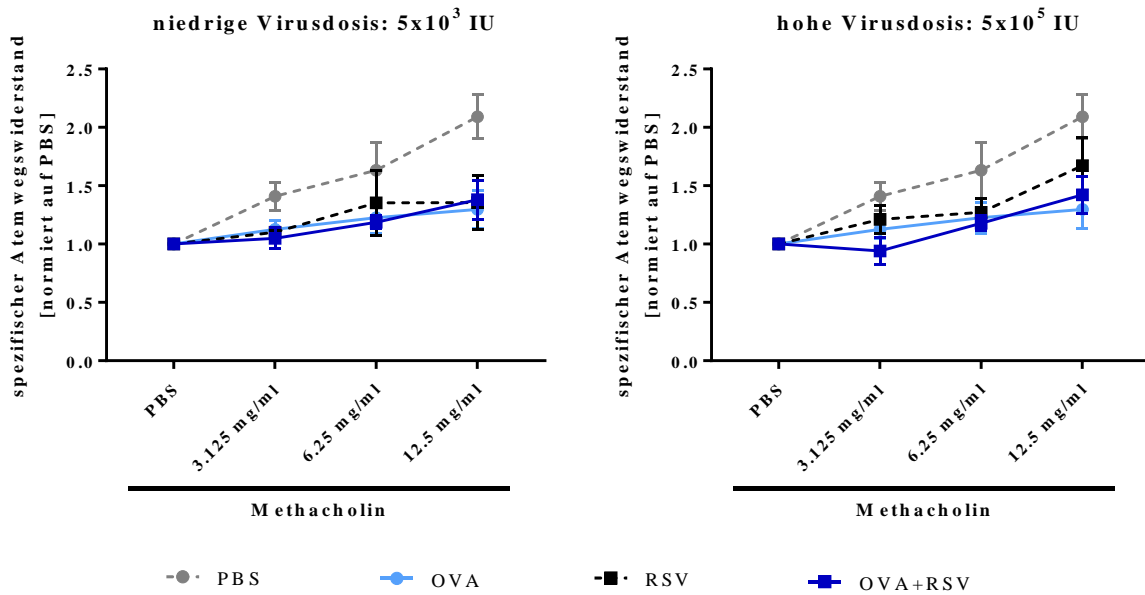


Abb. 4.33: Lungenfunktionsmessung 4 Tage nach der RSV-Infektion.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben behandelt. An Tag 33 bzw. 4 Tage nach der RSV-Infektion wurde die Lungenfunktion der Mäuse bestimmt. Dazu wurden die Mäuse einer Methacholinprovokation ausgesetzt und der Atemwegswiderstand aufgezeichnet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=4$). Die Gruppen wurden statistisch innerhalb einer Methacholinkonzentration mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+RSV sind dargestellt.

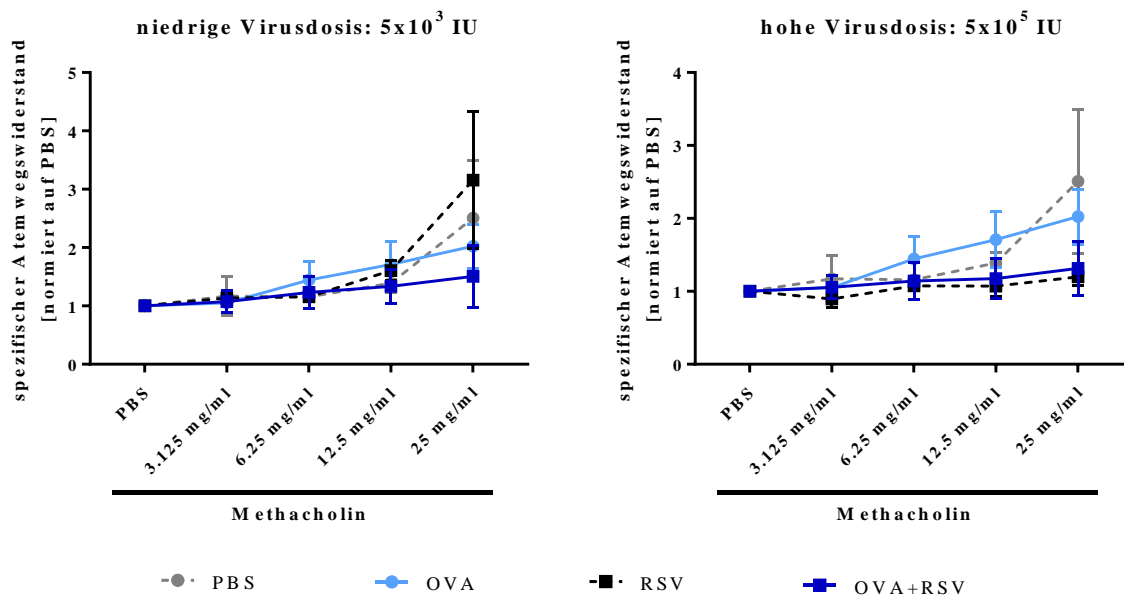


Abb. 4.34: Lungenfunktionsmessung 8 Tage nach der RSV-Infektion.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben behandelt. An Tag 37 bzw. 8 Tage nach der RSV-Infektion wurde die Lungenfunktion der Mäuse bestimmt. Dazu wurden die Mäuse einer Methacholinprovokation ausgesetzt und der Atemwegswiderstand aufgezeichnet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=4$). Die Gruppen wurden statistisch innerhalb einer Methacholinkonzentration mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+RSV sind dargestellt.

Zusätzlich wurden auch Transkriptionsfaktoren auf Expressionsebene und verschiedene Immunmediatoren auf Expressionsebene beziehungsweise auf Proteinebene untersucht.

Der Expressionsfaktor GATA3 wird einen Tag nach der Virusinfektion bei PBS, OVA, RSV_{niedrig} und RSV_{hoch} auf ähnlich hohem Niveau exprimiert. Lediglich OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch} zeigen leichte Tendenzen einer höheren Expression. Ein ähnliches Expressionsbild zeigt sich auch für T-bet. Lediglich FoxP3 zeigt nur eine minimale Expression bei PBS, RSV_{niedrig} und RSV_{hoch}. Im Gegensatz dazu liegt die Expression von FoxP3 bei OVA, OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch} höher. Diese steigt von OVA über OVA+RSV_{niedrig} und ist bei OVA+RSV_{hoch} am höchsten (siehe Abb. 4.35, oberste Reihe).

IFN- β wird einen Tag nach der Infektion bei PBS, RSV_{niedrig}, RSV_{hoch} und OVA+RSV_{niedrig} nur sehr gering exprimiert, gefolgt von OVA. Die höchste Expression findet sich bei OVA+RSV_{hoch}. IRF7 wird in den Infektionsgruppen und Exazerbationsgruppen abhängig von der Infektionsdosis vermehrt exprimiert. Die Expression der Exazerbationsgruppen liegt hierbei höher als in den Infektionsgruppen. Die geringste Expression zeigen PBS und RSV_{niedrig}. Die höchste Expression zeigt OVA+RSV_{hoch} direkt gefolgt von OVA (siehe Abb. 4.35, 2. Reihe).

Das Chemokin IP-10/CXCL10 wird auf ähnlich niedrigem Niveau von PBS, RSV_{niedrig} und RSV_{hoch} exprimiert. Eine mittlere Expression zeigen OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch} und die höchste Expression ist bei OVA zu sehen. TARC/CCL17 wird ebenfalls auf ähnlich niedrigem Niveau von PBS, RSV_{niedrig} und RSV_{hoch} exprimiert. Hier liegen die mittlere Expression bei OVA und OVA+RSV_{hoch} auf ähnlichem Niveau. Die höchste Expression findet sich bei OVA+RSV_{niedrig} (siehe Abb. 4.35, 3. Reihe).

Die Expression von IL-33 liegt auf einem ähnlichen Niveau in allen Gruppen. Lediglich OVA zeigt eine tendenziell höhere Expression, sowie RSV_{hoch} eine tendenziell erniedrigte Expression. Die höchste Expression von TGF- β findet sich bei PBS, dicht gefolgt von RSV_{niedrig}. Ein mittleres Expressionslevel findet sich bei OVA und OVA+RSV_{niedrig}, welches auf gleichem Niveau liegt. Die niedrigsten Expressionen sind bei RSV_{hoch} und OVA+RSV_{hoch} zu finden. Auch diese liegen auf einem ähnlichen Niveau (siehe Abb. 4.35, unterste Reihe).

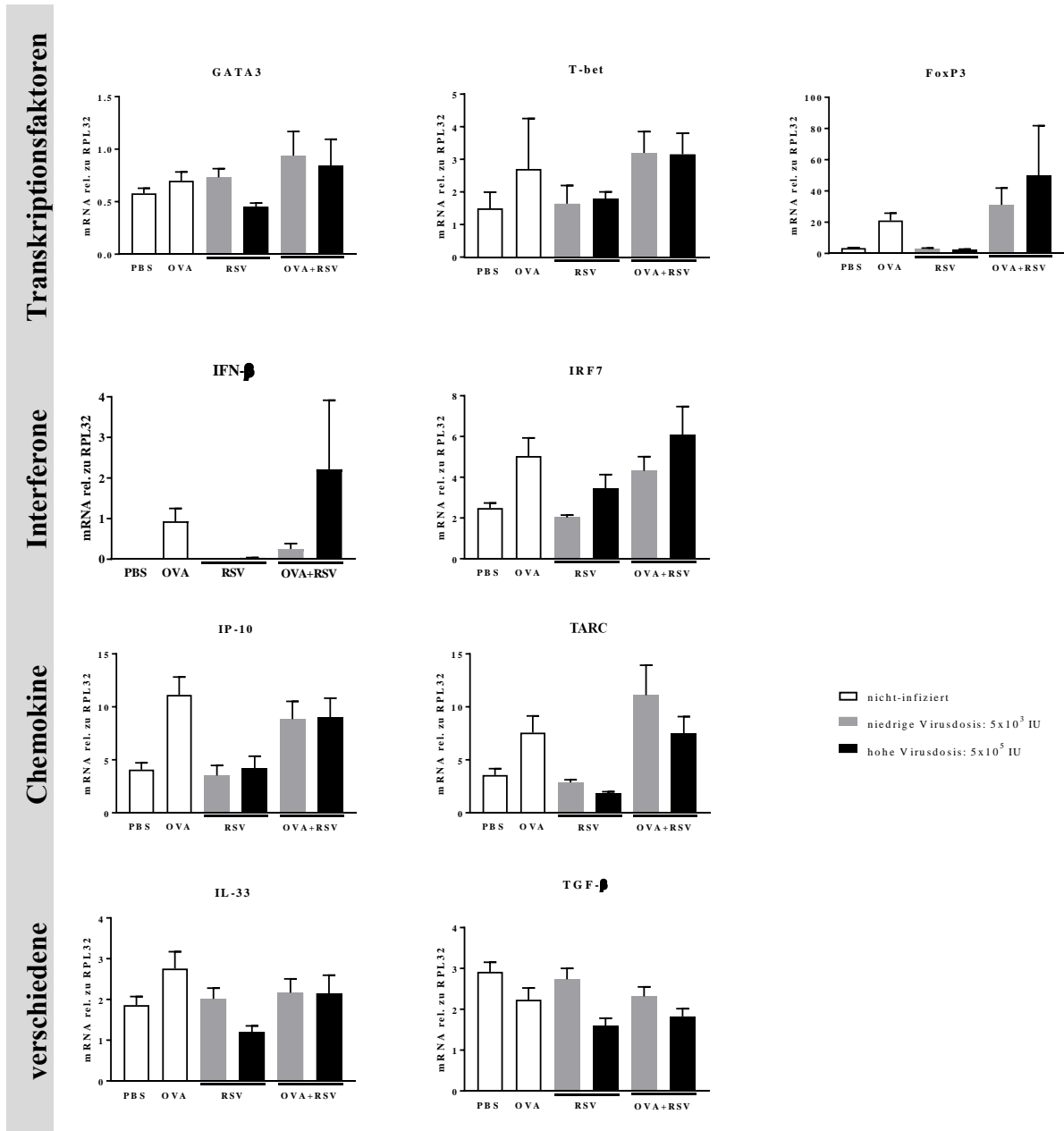


Abb. 4.35: Expression von Transkriptionsfaktoren und Immunmediatoren im Lungengewebe 1 Tag nach der RSV-Infektion.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben behandelt. An Tag 30 bzw. 1 Tag nach der RSV-Infektion wurden die Lungen entnommen (siehe 3.4.4), anschließend zu Lungenhomogenat verarbeitet (siehe 3.8.2), die RNA isoliert (siehe 3.9), eine reverse Transkription (siehe 3.10) und eine RT-qPCR (siehe 3.11) durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=8). Die Gruppen wurden statistisch innerhalb einer Infektionsdosis mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+RSV sind dargestellt.

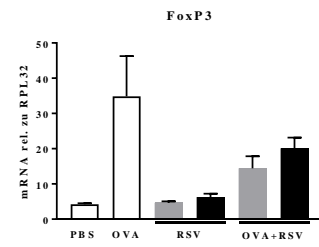
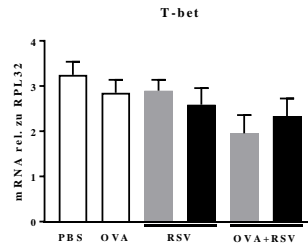
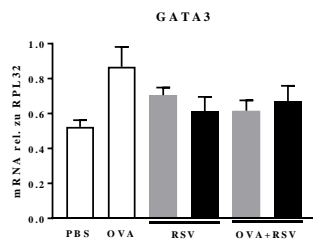
Vier Tage nach der Infektion liegt die Expression von GATA3 in allen Behandlungsgruppen auf ähnlich hohem Niveau. Lediglich OVA zeigt eine tendenziell erhöhte GATA3-Expression. Auch die Expression von T-bet liegt in allen Gruppen auf einer ähnlichen Höhe. Hier zeigt sich die tendenziell höchste Expression bei PBS und die tendenziell niedrigste Expression bei OVA+RSV_{niedrig}. Die Expression von FoxP3 steigt von PBS über RSV zu OVA+RSV abhängig von der Infektionsdosis an. Die höchste Expression findet sich bei OVA (siehe Abb. 4.36, oberste Reihe).

IFN- β zeigt das gleiche Expressionsmuster der Gruppen wie FoxP3. IRF7 wird bei PBS und RSV_{niedrig} am niedrigsten exprimiert. Eine steigende Expression findet sich von RSV_{hoch} über OVA und OVA+RSV_{niedrig} zu OVA+RSV_{hoch} (siehe Abb. 4.36, 2. Reihe).

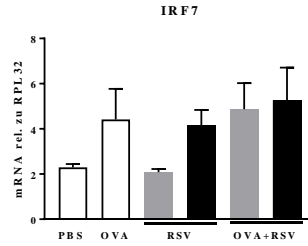
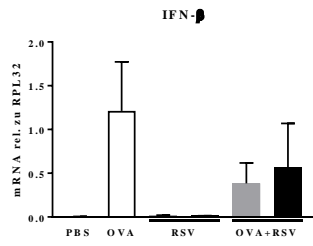
Für IP-10/CXCL10 finden sich die höchste Expression bei OVA und die niedrigste bei PBS. Die Expression bei RSV und OVA+RSV liegen dazwischen und steigen bei RSV abhängig von der Infektionsdosis und sind auf gleichem Niveau bei OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch}. Die TARC/CCL17-Expression liegt in allen Gruppen, außer in der OVA+RSV_{niedrig}, auf gleichem Niveau. Bei OVA+RSV_{niedrig} ist die Expression von TARC/CCL17 erhöht (siehe Abb. 4.36, 3.Reihe).

IL-33 wird am meisten bei PBS exprimiert, gefolgt von RSV_{niedrig}, OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch}. Darauf folgt die Expression bei OVA und die niedrigste Expression zeigt RSV_{hoch}. Auch bei TGF- β liegt die höchste Expression bei PBS vor, gefolgt von RSV_{niedrig}. Die niedrigste Expression hier findet sich jedoch bei OVA und steigt von RSV_{hoch} zu OVA+RSV abhängig von der Infektionsdosis (siehe Abb. 4.36, unterste Reihe).

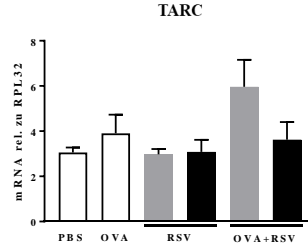
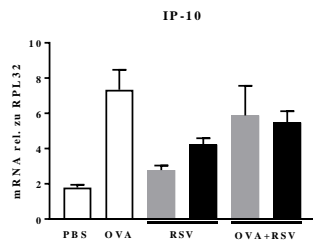
Transkriptionsfaktoren



Interferone



Chemokine



nicht-infiziert
 niedrige Virusdosis: 5×10^3 IU
 hohe Virusdosis: 5×10^5 IU

verschiedene

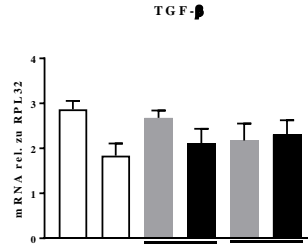
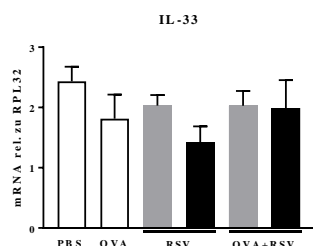


Abb. 4.36: Expression von Transkriptionsfaktoren und Immunmediatoren im Lungengewebe 4 Tage nach der RSV-Infektion.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben behandelt. An Tag 33 bzw. 4 Tage nach der RSV-Infektion wurden die Lungen entnommen (siehe 3.4.4), anschließend zu Lungenhomogenat verarbeitet (siehe 3.8.2), die RNA isoliert (siehe 3.9), eine reverse Transkription (siehe 3.10) und eine RT-qPCR (siehe 3.11) durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=8). Die Gruppen wurden statistisch innerhalb einer Infektionsdosis mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+RSV sind dargestellt.

Die Expression von GATA3 ist acht Tage nach der Infektion am höchsten bei OVA und sinkt abhängig von der Infektionsdosis bei OVA+RSV. Die Reduktion der Expression zwischen OVA und OVA+RSV_{hoch} ist signifikant. Die Expression von GATA3 bei RSV_{niedrig}, RSV_{hoch} und PBS liegen auf ähnlichem Niveau wie OVA+RSV_{hoch}. T-bet zeigt eine ähnliche Expression in allen Gruppen mit tendenziell leichter Erhöhung bei PBS und tendenziell leichter Erniedrigung bei OVA+RSV_{niedrig}. Die Expression von FoxP3 steigt von RSV_{niedrig} über RSV_{hoch} und PBS zu OVA+RSV abhängig von der Infektionsdosis an. Die höchste Expression findet sich bei OVA und OVA+RSV_{hoch} (siehe Abb. 4.37, oberste Reihe).

IFN- β wird bei PBS, RSV_{niedrig}, RSV_{hoch} und OVA+RSV_{niedrig} nur sehr gering exprimiert. Eine mittlere Expression zeigt OVA und die höchste Expression ist bei OVA+RSV_{hoch} zu sehen. IRF7 zeigt auch hier ein ähnliches Expressionsmuster wie FoxP3. IRF7 hat die niedrigste Expression bei PBS und RSV_{niedrig}, die über RSV_{hoch} zu OVA+RSV abhängig von der Infektionsdosis ansteigt. Die höchste Expression findet sich bei OVA (siehe Abb. 4.37, 2. Reihe).

Für IP-10/CXCL10 zeigen sich die höchste Expression bei OVA und die niedrigste bei PBS und RSV_{niedrig}. Die Expression RSV_{hoch} und OVA+RSV_{hoch} liegen auf dem zweitniedrigsten Niveau und steigt nochmal an bei OVA+RSV_{niedrig} (siehe Abb. 4.36, 3.Reihe). TARC/CCL17, IL-33 und TGF- β zeigen die gleichen Expressionsmuster der Gruppen. Hier liegt die höchste Expression jeweils bei PBS, die über OVA und RSV abhängig von der Infektionsdosis abnimmt. Eine geringe Erhöhung in der Expression zeigt sich bei OVA+RSV_{niedrig} gegenüber RSV, die jedoch am stärksten wiederum bei OVA+RSV_{hoch} abfällt. Diese Reduktion der Expression bei OVA+RSV_{hoch} gegenüber OVA ist bei TGF- β signifikant (siehe Abb. 4.37, 3. und letzte Reihe).

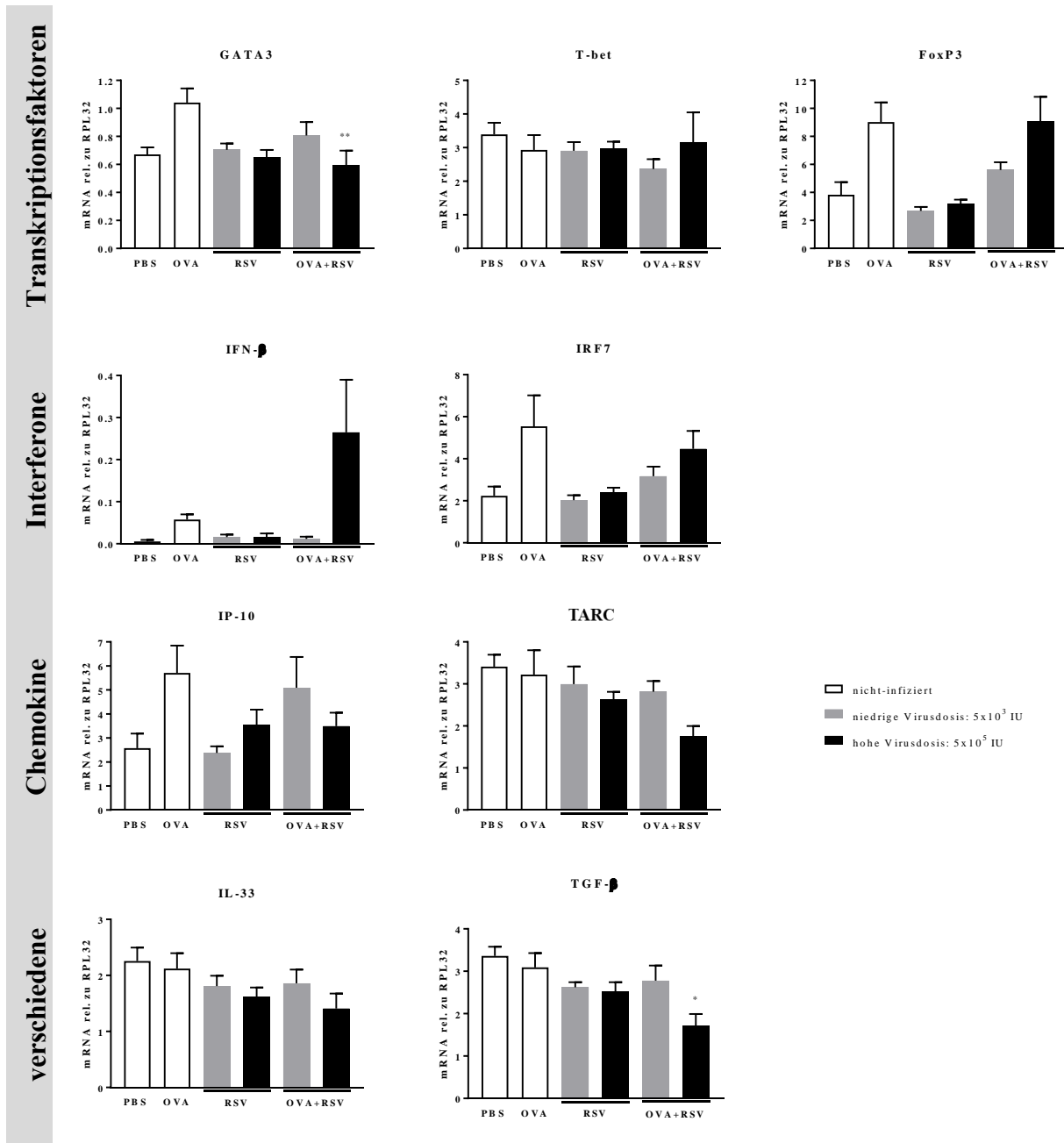


Abb. 4.37: Expression von Transkriptionsfaktoren und Immunmediatoren im Lungengewebe 8 Tage nach der RSV-Infektion.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben behandelt. An Tag 37 bzw. 8 Tage nach der RSV-Infektion wurden die Lungen entnommen (siehe 3.4.4), anschließend zu Lungenhomogenat verarbeitet (siehe 3.8.2), die RNA isoliert (siehe 3.9), eine reverse Transkription (siehe 3.10) und eine RT-qPCR (siehe 3.11) durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=8$). Die Gruppen wurden statistisch innerhalb einer Infektionsdosis mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$. Die Signifikanz zwischen den Gruppen OVA und OVA+RSV sind dargestellt.

Neben der Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren und Immunmediatoren, wurden auch weitere Immunmediatoren auf der Proteinebene untersucht. Dazu zählen unter anderem T_H2 -Zytokine, Interferone, pro-inflammatorische Zytokine, Chemokine und andere.

Bei der Betrachtung der T_H2 -Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 einen Tag nach der Infektion zeigen alle drei Zytokine die höchste Konzentration jeweils bei OVA. Diese sind gefolgt von OVA+RSV, wobei bei IL-4 und IL-13 die Konzentrationen zwischen OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch} auf einem ähnlich hohen Niveau liegen. Bei IL-5 nimmt die Konzentration abhängig von der Infektionsdosis bei OVA+RSV ab. Im Gegensatz dazu ist die Konzentration von IL-5 und IL-13 bei PBS, RSV_{niedrig} und RSV_{hoch} nur sehr gering und auf ähnlicher Höhe und IL-4 lässt sich in diesen Gruppen nicht nachweisen (siehe Abb. 4.38).

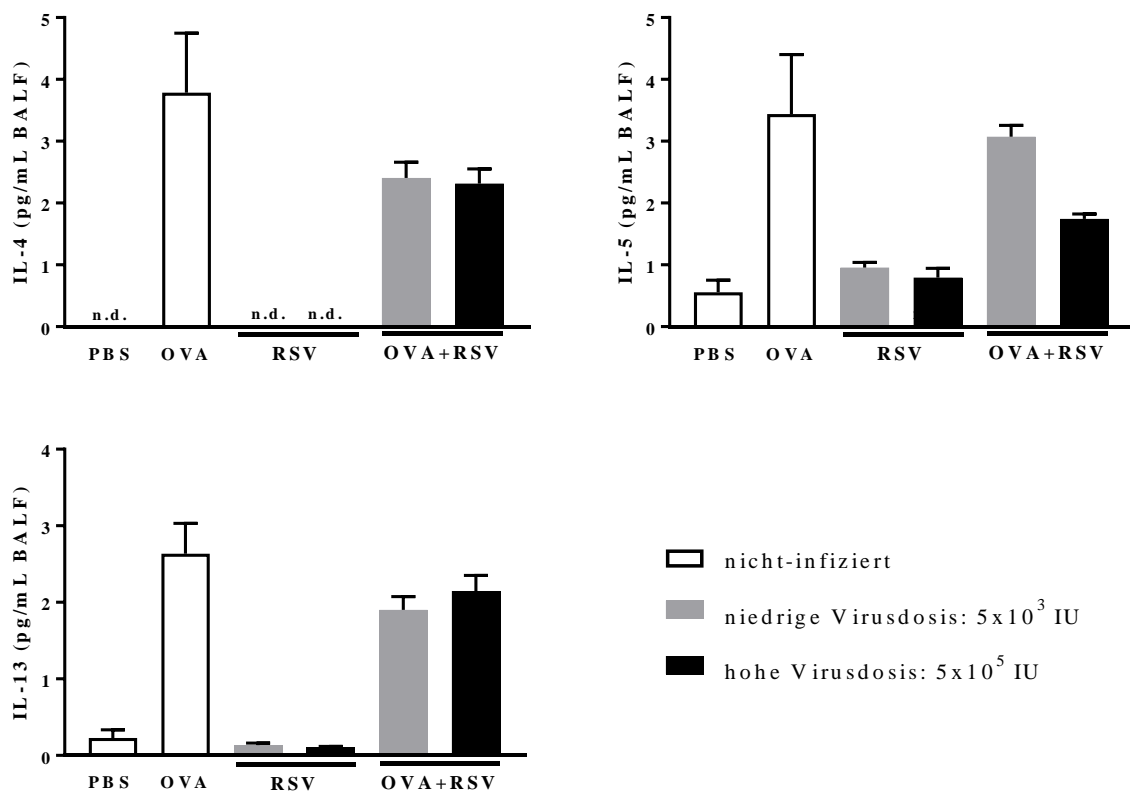


Abb. 4.38: Proteinkonzentrationen von T_H2 -Zytokinen im Lungenlumen 1 Tag nach der RSV-Infektion. Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben behandelt. An Tag 30 bzw. 1 Tag nach der RSV-Infektion wurde eine broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels CBA (siehe 3.12.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=4). Die Gruppen wurden statistisch mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+RSV sind dargestellt. Abkürzung: n.d. – nicht detektierbar (alle Werte sind 0)

Vier Tage nach der Infektion ist IL-4 ebenfalls bei PBS, RSV_{niedrig} und RSV_{hoch} nicht detektierbar. Und die Konzentrationen bei OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch} sind auch nur sehr niedrig. Die höchste Konzentration findet sich bei OVA. IL-5 zeigt in allen Gruppen eine ähnlich hohe Konzentration, lediglich bei RSV_{hoch} ist die Konzentration erniedrigt. Auch IL-13 zeigt nur geringe Konzentrationen bei PBS, RSV_{niedrig} und RSV_{hoch}. Die höchste Konzentration

wurde bei OVA gemessen. Die Konzentrationen von OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch} sind signifikant reduziert gegenüber OVA (siehe Abb. 4.39).

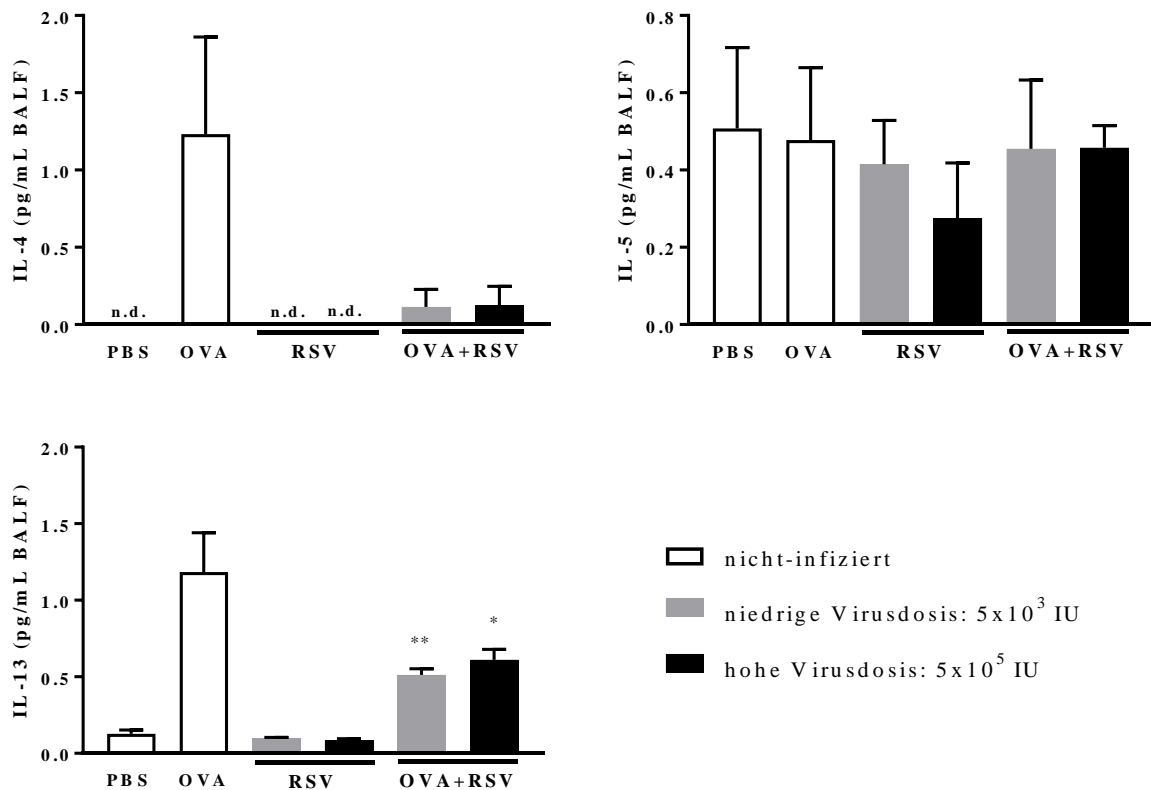


Abb. 4.39: Proteinkonzentrationen von T_H2-Zytokinen im Lungenlumen 4 Tage nach der RSV-Infektion. Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben behandelt. An Tag 33 bzw. 4 Tage nach der RSV-Infektion wurde eine broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels CBA (siehe 3.12.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n=4). Die Gruppen wurden statistisch mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+RSV sind dargestellt. Abkürzung: n.d. – nicht detektierbar (alle Werte sind 0)

IL-4 kann acht Tage nach der Infektion nur noch bei OVA und OVA+RSV_{niedrig} nachgewiesen werden. Die höhere Konzentration zeigt sich dabei bei OVA. IL-5 zeigt die niedrigste Konzentration RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch}. Die Konzentrationen steigen danach von OVA über RSV_{hoch} und OVA+RSV_{niedrig} auf die höchste Konzentration bei PBS. Die Konzentration von IL-13 ist bei PBS, RSV_{niedrig} und RSV_{hoch} niedrig und auf gleicher Höhe. Mittlere Konzentrationen finden sich bei OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch} und die höchste Konzentration liegt bei OVA vor (siehe Abb. 4.40).

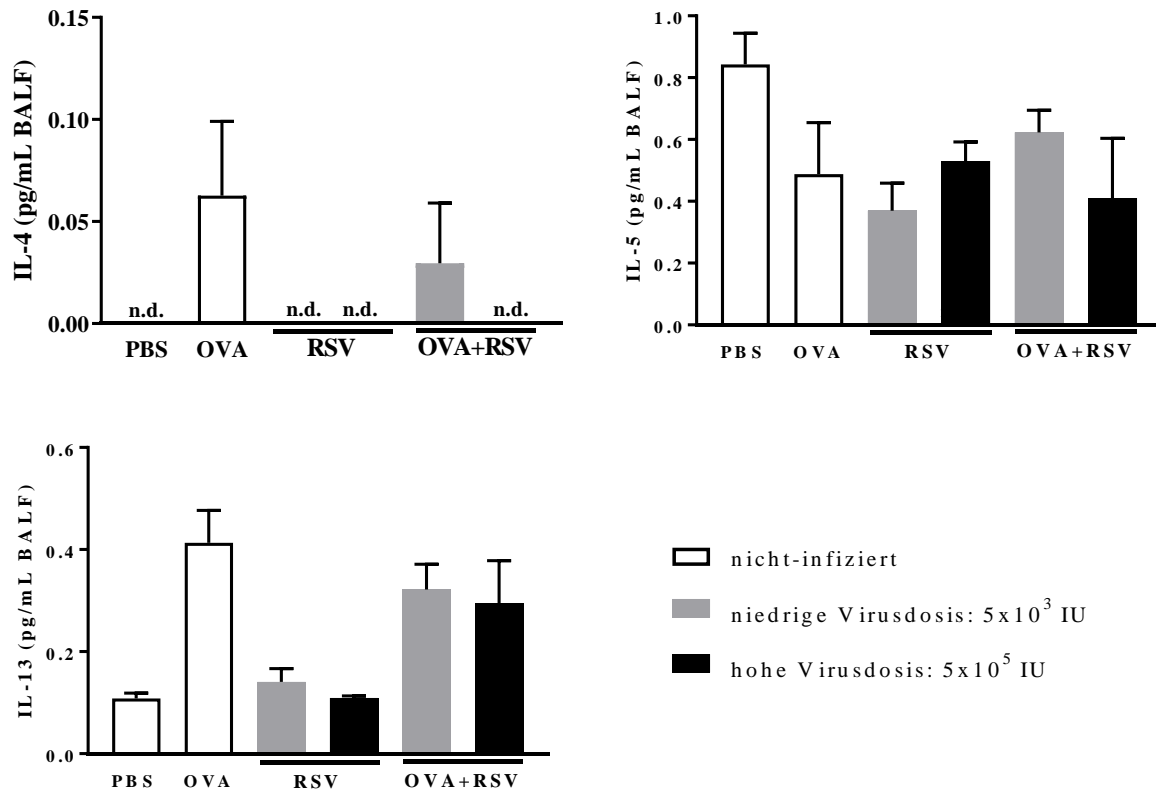


Abb. 4.40: Proteinkonzentrationen von T_H2-Zytokinen im Lungenlumen 8 Tage nach der RSV-Infektion. Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben behandelt. An Tag 37 bzw. 8 Tage nach der RSV-Infektion wurde eine broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels CBA (siehe 3.12.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=4). Die Gruppen wurden statistisch mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+RSV sind dargestellt. Abkürzung: n.d. – nicht detektierbar (alle Werte sind 0)

Einen Tag nach der Infektion konnten für IFN- α keine Unterschiede in den Konzentrationen der verschiedenen Gruppen gemessen werden. Lediglich eine leichte Tendenz zu erhöhten Konzentrationen bei OVA+RSV lassen sich erkennen. Die höchste Konzentration von IFN- β wurde bei PBS und OVA+RSV_{hoch} gemessen. Eine gemeinsame mittlere Konzentration findet sich bei OVA und OVA+RSV_{niedrig}. Weiterhin kommt es zu einer weiteren Reduktion der Konzentration von IFN- β über RSV_{hoch} zu der niedrigsten gemessenen Konzentration bei RSV_{niedrig}. IFN- γ zeigt die höchste Konzentration bei RSV_{niedrig}. In allen anderen Gruppen wurden nur geringe Konzentrationen nachgewiesen, beziehungsweise konnte IFN- γ nicht gemessen werden (siehe Abb. 4.41).

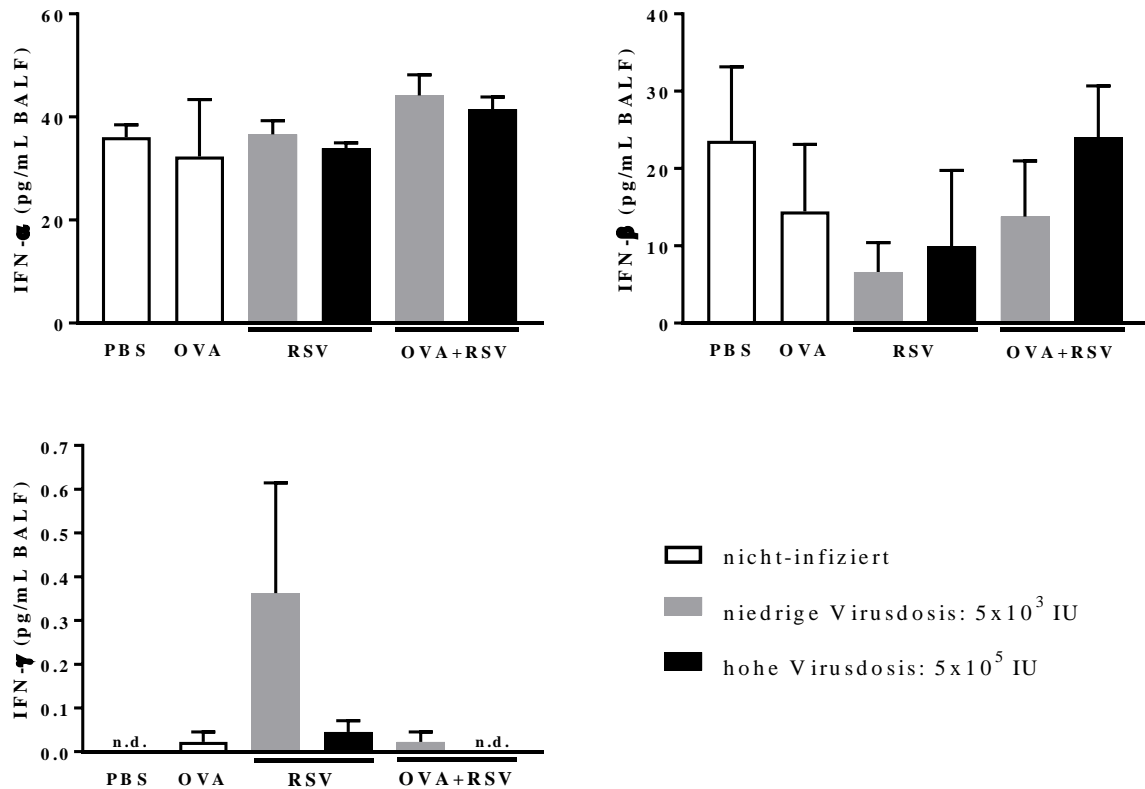


Abb. 4.41: Proteinkonzentrationen von Interferonen im Lungenlumen 1 Tag nach der RSV-Infektion.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben behandelt. An Tag 30 bzw. 1 Tag nach der RSV-Infektion wurde eine broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels ELISA (siehe 3.12.2) bzw. CBA (siehe 3.12.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=4). Die Gruppen wurden statistisch mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+RSV sind dargestellt. Abkürzung: n.d. – nicht detektierbar (alle Werte sind 0)

Die niedrigste Konzentration von IFN- α ist vier Tage nach der Infektion RSV_{niedrig} zu finden. Sie steigt über RSV_{hoch}, PBS, OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch} bis zur höchsten Konzentration bei OVA an. IFN- β kann bei PBS, OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch} nicht detektiert werden. Ansonsten ist eine Steigerung der Konzentrationen abhängig von der Infektionsdosis bei RSV bis zur höchsten gemessenen Konzentration bei OVA zu sehen. IFN- γ hingegen konnte in keiner der Behandlungsgruppen detektiert werden (siehe Abb. 4.42).

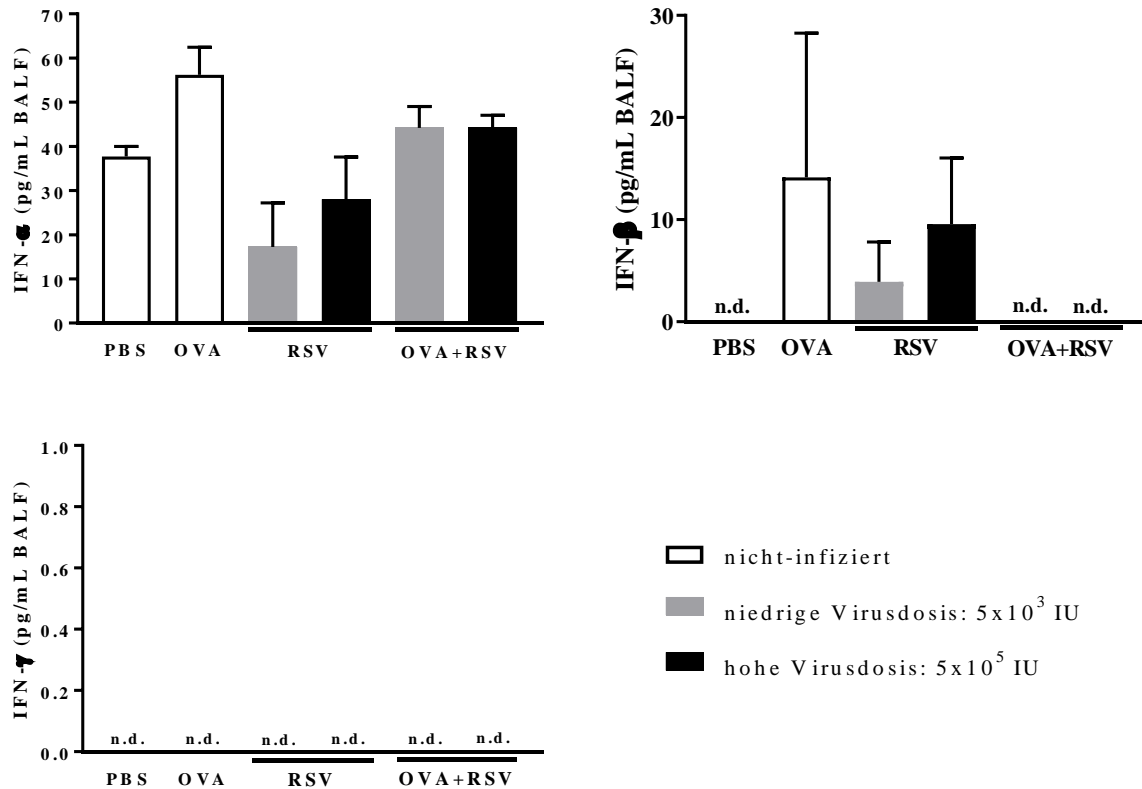


Abb. 4.42: Proteinkonzentrationen von Interferonen im Lungenlumen 4 Tage nach der RSV-Infektion. Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben behandelt. An Tag 33 bzw. 4 Tage nach der RSV-Infektion wurde eine broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels ELISA (siehe 3.12.2) bzw. CBA (siehe 3.12.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=4). Die Gruppen wurden statistisch mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+RSV sind dargestellt. Abkürzung: n.d. – nicht detektierbar (alle Werte sind 0)

IFN- α zeigt acht Tage nach der Infektion die niedrigste Konzentration bei PBS. Ansteigende mittlere Konzentrationen finden sich bei OVA+RSV_{hoch}, RSV_{niedrig} und OVA. Die beiden höchsten Konzentrationen finden sich bei RSV_{hoch} und OVA+RSV_{niedrig}. IFN- β hat geringe Konzentrationen bei PBS, RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{niedrig}. Darüber hinaus steigen die Konzentrationen von OVA+RSV_{hoch} über RSV_{hoch} bis zur höchsten Konzentration bei OVA. IFN- γ kann bei OVA, RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch} nicht detektiert werden. Eine ähnlich hohe Konzentration findet sich hingegen bei RSV_{hoch} und OVA+RSV_{niedrig}. Die tendenziell höchste Konzentration wurde bei PBS gemessen (siehe Abb. 4.43).

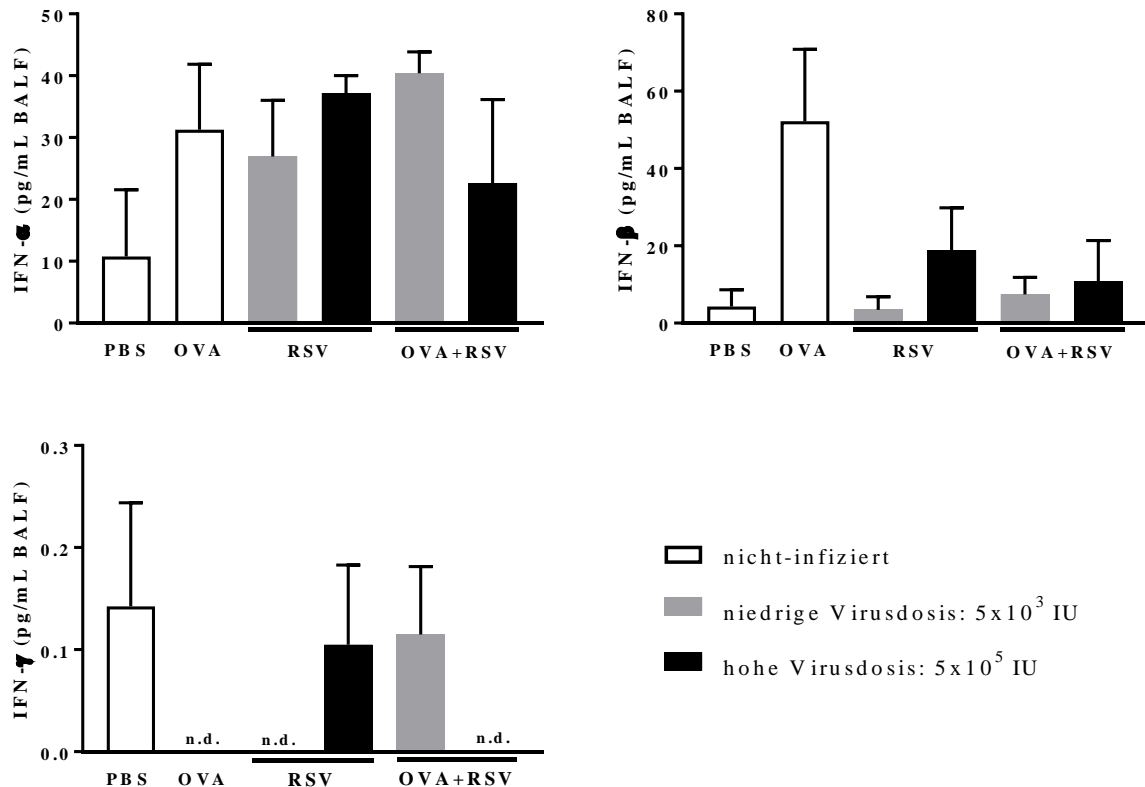


Abb. 4.43: Proteinkonzentrationen von Interferonen im Lungenlumen 8 Tage nach der RSV-Infektion. Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben behandelt. An Tag 37 bzw. 8 Tage nach der RSV-Infektion wurde eine broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels ELISA (siehe 3.12.2) bzw. CBA (siehe 3.12.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=4). Die Gruppen wurden statistisch mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+RSV sind dargestellt. Abkürzung: n.d. – nicht detektierbar (alle Werte sind 0)

Bei den pro-inflammatorischen Zytokinen zeigt sich einen Tag nach der Infektion, dass die höchste Konzentration von IL-1 α bei RSV_{hoch} und OVA+RSV_{niedrig} liegen. Diese nehmen weiterhin von OVA über OVA+RSV_{hoch}, und PBS bis zur niedrigsten Konzentration bei RSV_{niedrig} ab. IL-1 β konnte bei PBS, RSV_{niedrig} und RSV_{hoch} nicht detektiert werden. Bei OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch} nimmt die Konzentration abhängig von der Infektionsdosis zu und die höchste Konzentration zeigt OVA. Bei IL-6 und TNF- α sind jeweils nur geringe Konzentrationen bei PBS, RSV_{niedrig} und RSV_{hoch} zu sehen, wobei die Konzentrationen bei RSV_{niedrig} und RSV_{hoch} abhängig von der Infektionsdosis leicht zurückgehen. Die jeweils mittleren Konzentrationen finden sich bei OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch}, wobei bei IL-6 eine geringe Konzentrationsabnahme abhängig von der Infektionsdosis zu sehen ist, während sie bei TNF- α auf gleicher Höhe bleiben. Die höchste Konzentration von IL-6 und TNF- α ist jeweils bei OVA (siehe Abb. 4.44).

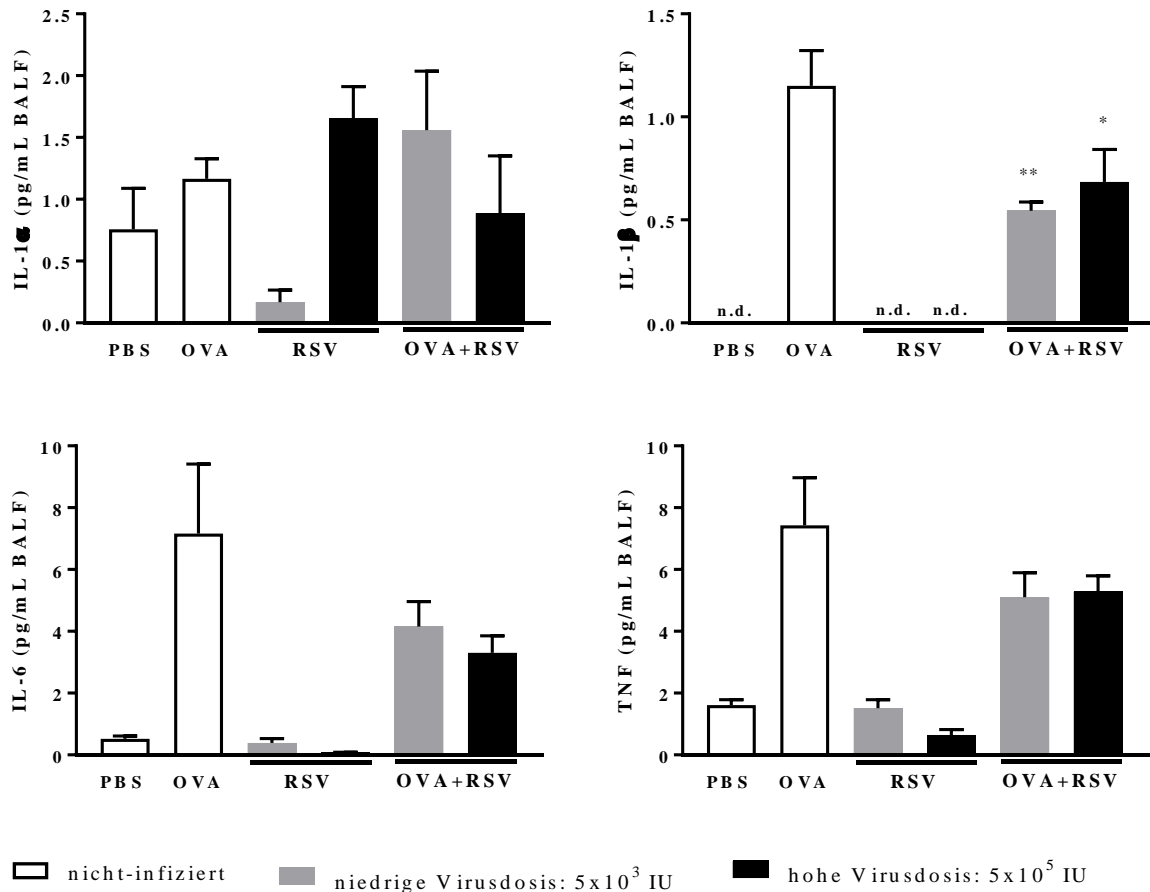


Abb. 4.44: Proteinkonzentrationen von pro-inflammatorischen Zytokinen im Lungenlumen 1 Tag nach der RSV-Infektion.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben behandelt. An Tag 30 bzw. 1 Tag nach der RSV-Infektion wurde eine broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels CBA (siehe 3.12.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=4). Die Gruppen wurden statistisch mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+RSV sind dargestellt. Abkürzung: n.d. – nicht detektierbar (alle Werte sind 0)

Vier Tage nach der Infektion zeigen sich geringe, aber steigende Konzentrationen von IL-1 α bei PBS, RSV_{niedrig} und RSV_{hoch}. Die Konzentrationen von OVA, OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch} zeigen sich auf ähnlich hohem Niveau, wobei die tendenziell höchste Konzentration bei OVA+RSV_{niedrig} zu finden ist. IL-1 β ist weder bei PBS noch bei RSV_{niedrig} oder RSV_{hoch} messbar. Auch ist die Konzentration bei OVA+RSV_{hoch} nur sehr gering, diese steigt jedoch über OVA+RSV_{niedrig} bis zur höchsten Konzentration bei OVA an. IL-6 und TNF- α weisen das gleiche Produktionsprofil auf. Die Konzentrationen sind bei PBS, RSV_{niedrig} und RSV_{hoch} jeweils nur sehr gering. Bei OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch} zeigt sich eine Reduktion der Konzentrationen abhängig von der Infektionsdosis. Die jeweils höchste Konzentration findet sich bei OVA (siehe Abb. 4.45).

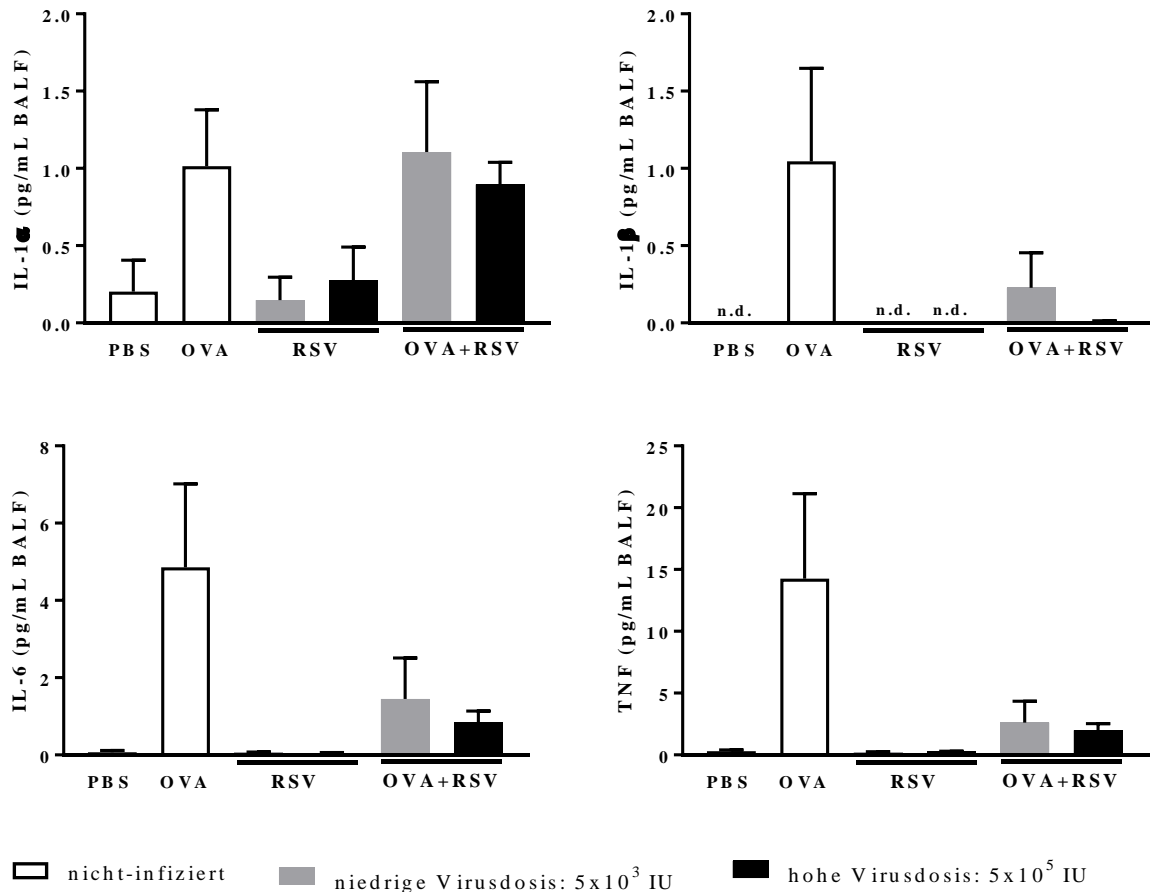


Abb. 4.45: Proteinkonzentrationen von pro-inflammatorischen Zytokinen im Lungenlumen 4 Tage nach der RSV-Infektion.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben behandelt. An Tag 33 bzw. 4 Tage nach der RSV-Infektion wurde eine broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels CBA (siehe 3.12.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=4). Die Gruppen wurden statistisch mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+RSV sind dargestellt. Abkürzung: n.d. – nicht detektierbar (alle Werte sind 0)

IL-1 α zeigt acht Tage nach der Infektion die höchste Konzentration bei OVA, gefolgt von OVA+RSV_{niedrig}, RSV_{niedrig}, PBS und RSV_{hoch} bis zur niedrigsten Konzentration bei OVA+RSV_{hoch}. IL-1 β konnte in keiner der Behandlungsgruppen nachgewiesen werden. IL-6 ist nicht detektierbar bei RSV_{hoch} und findet sich nur in geringen Konzentrationen PBS und RSV_{niedrig}. Die Konzentration steigt bei OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch} abhängig von der Infektionsdosis bis zur höchsten Konzentration bei OVA an. Die Reduktion der Konzentration bei OVA+RSV_{niedrig} im Vergleich mit OVA ist signifikant. TNF- α zeigt hier ein ähnliches Produktionsprofil wie IL-1 α . Allerdings zeigt sich hier die höchste Konzentration bei OVA+RSV_{niedrig} (siehe Abb. 4.46).

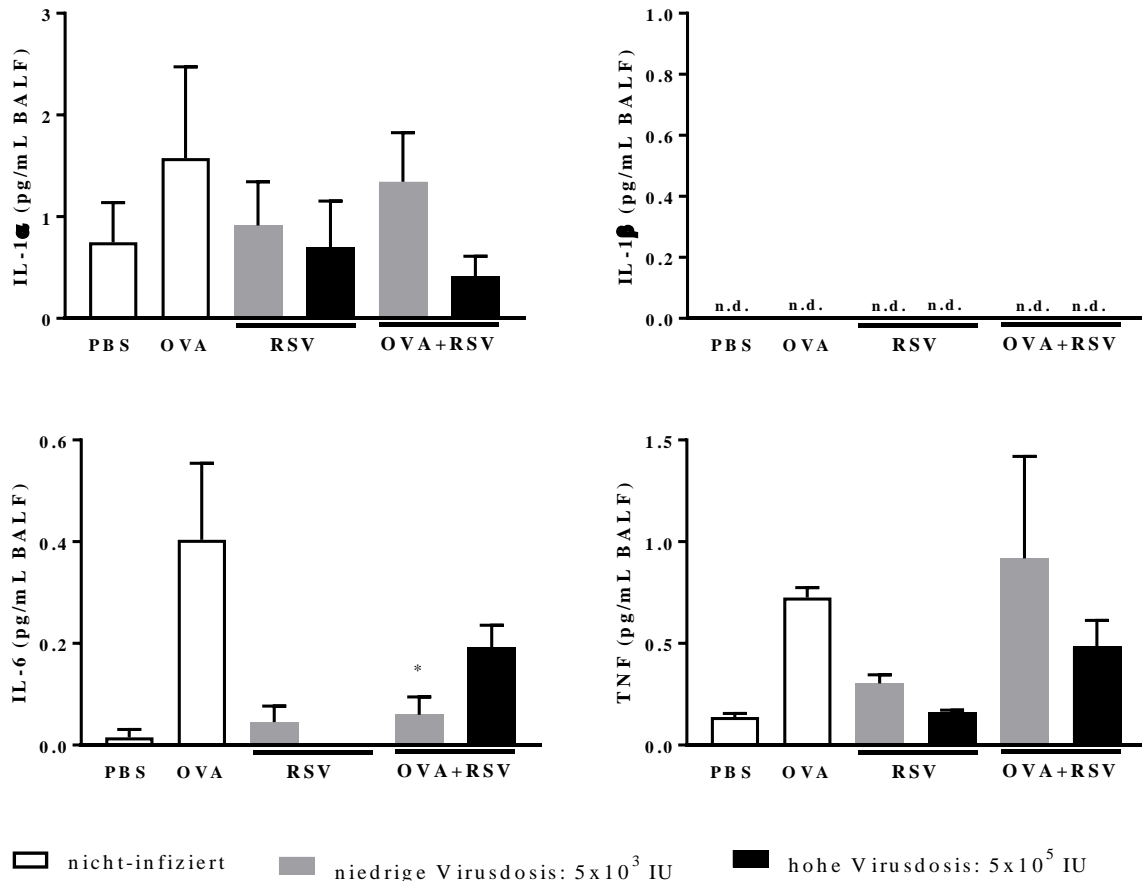


Abb. 4.46: Proteinkonzentrationen von pro-inflammatorischen Zytokinen im Lungenlumen 8 Tage nach der RSV-Infektion.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben behandelt. An Tag 37 bzw. 8 Tage nach der RSV-Infektion wurde eine broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels CBA (siehe 3.12.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=4). Die Gruppen wurden statistisch mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+RSV sind dargestellt. Abkürzung: n.d. – nicht detektierbar (alle Werte sind 0)

Es wurden ebenfalls Chemokine, die für die Einwanderung und das Überleben von beteiligten Zelltypen verantwortlich sind, betrachtet. So sieht man einen Tag nach der Infektion geringe Konzentrationen von Eotaxin-1/CCL11 bei PBS, RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch}. Die höchste Konzentration liegt bei OVA+RSV_{niedrig} vor, die abhängig von der Infektionsdosis abfällt. Die Konzentration bei OVA liegt zwischen den Konzentrationen von OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch}. Das gleiche Produktionsmuster der Behandlungsgruppen ergibt sich bei KC/CXCL1. RANTES/CCL5 hingegen kann bei PBS und RSV_{hoch} nicht detektiert werden und liegt bei RSV_{niedrig} nur in geringer Konzentration vor. Die Konzentrationen bei OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch} nehmen wiederum abhängig von der Infektionsdosis ab und liegen unterhalb der höchsten Konzentration, die bei OVA zu finden ist (siehe Abb. 4.47).

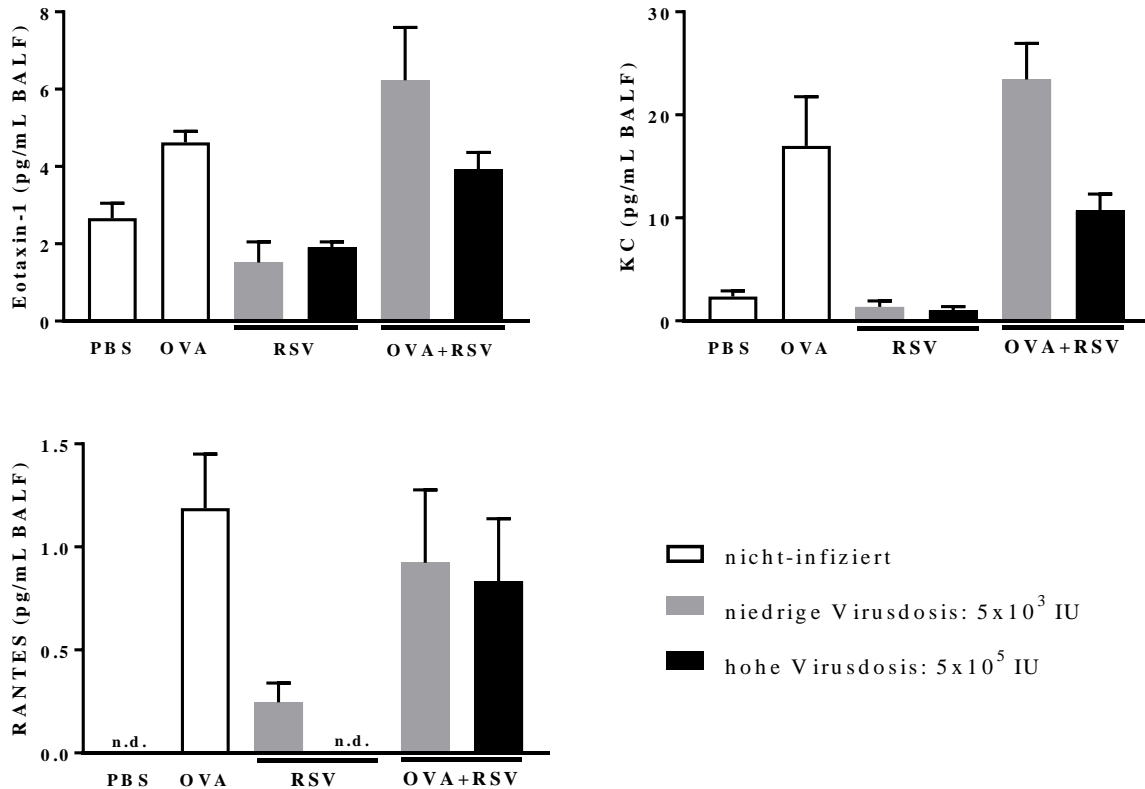


Abb. 4.47: Proteinkonzentrationen von Chemokinen im Lungenlumen 1 Tag nach der RSV-Infektion.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben behandelt. An Tag 30 bzw. 1 Tag nach der RSV-Infektion wurde eine broncho-alveoläre Lavage (siehe 34.2) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels CBA (siehe 3.12.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=4$). Die Gruppen wurden statistisch mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+RSV sind dargestellt. Abkürzung: n.d. – nicht detektierbar (alle Werte sind 0)

Vier Tage nach der Infektion zeigt Eotaxin-1/CCL11 geringe Konzentrationen auf ähnlichem Niveau bei PBS und RSV_{niedrig}. Mittlere Konzentrationen, ebenfalls alle auf ähnlicher Höhe, finden sich bei RSV_{hoch}, OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch}. Die höchste Konzentration liegt bei OVA. Für KC/CXCL1 finden sich nur geringe Konzentrationen bei PBS und RSV_{hoch}. Nicht detektierbar ist KC/CXCL1 bei RSV_{niedrig}. Die höchsten Konzentrationen finden sich bei OVA und OVA+RSV_{niedrig}. Die Konzentration bei OVA+RSV_{hoch} ist nur geringfügig reduziert. RANTES/CCL5 ist nicht detektierbar bei PBS, RSV_{niedrig} und RSV_{hoch}. Geringe Konzentrationen auf ähnlichem Niveau finden sich bei OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch} und die höchste Konzentration zeigt OVA (siehe Abb. 4.48).

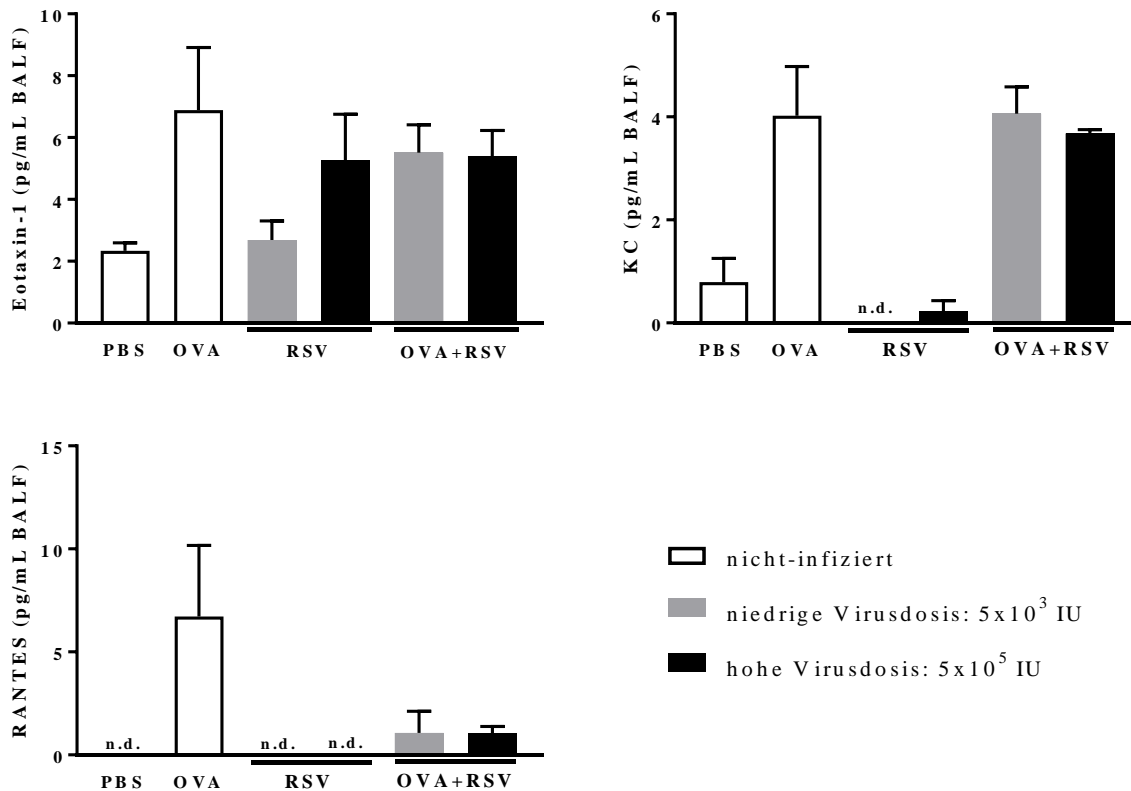


Abb. 4.48 Proteinkonzentrationen von Chemokinen im Lungenlumen 4 Tage nach der RSV-Infektion.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben behandelt. An Tag 33 bzw. 4 Tage nach der RSV-Infektion wurde eine broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels CBA (siehe 3.12.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=4$). Die Gruppen wurden statistisch mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+RSV sind dargestellt. Abkürzung: n.d. – nicht detektierbar (alle Werte sind 0)

Eotaxin-1/CCL11 zeigt acht Tage nach der Infektion jeweils abhängig von der Infektionsdosis steigende Konzentrationen bei RSV_{niedrig}, RSV_{hoch}, OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch}. Dabei sind die Konzentrationen bei PBS und RSV_{niedrig} die niedrigsten, gefolgt von mittleren Konzentrationen bei RSV_{hoch} und OVA+RSV_{niedrig}. Die höchsten Konzentrationen zeigen OVA+RSV_{hoch} und OVA. Im Gegensatz dazu zeigen KC/CXCL1 und RANTES/CCL5 jeweils eine Reduktion der Konzentration abhängig von der Infektionsdosis bei RSV_{niedrig}, RSV_{hoch}, OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch}. KC/CXCL1 ist mit der geringsten Konzentration bei RSV_{hoch} vertreten. Mittlere Konzentrationen finden sich mit ähnlicher Höhe bei PBS, RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch}. Die beiden hohen Konzentrationen sind bei OVA und OVA+RSV_{niedrig} zu sehen, wobei die Konzentration von OVA die tendenziell höchste ist. RANTES/CCL5 ist bei RSV_{hoch} nicht detektierbar und nur in geringer Konzentration bei PBS messbar. Davon ausgehend steigen die Konzentrationen bei OVA+RSV_{hoch} über RSV_{niedrig} und OVA bis zur höchsten Konzentration bei OVA+RSV_{niedrig} an (siehe Abb. 4.49).

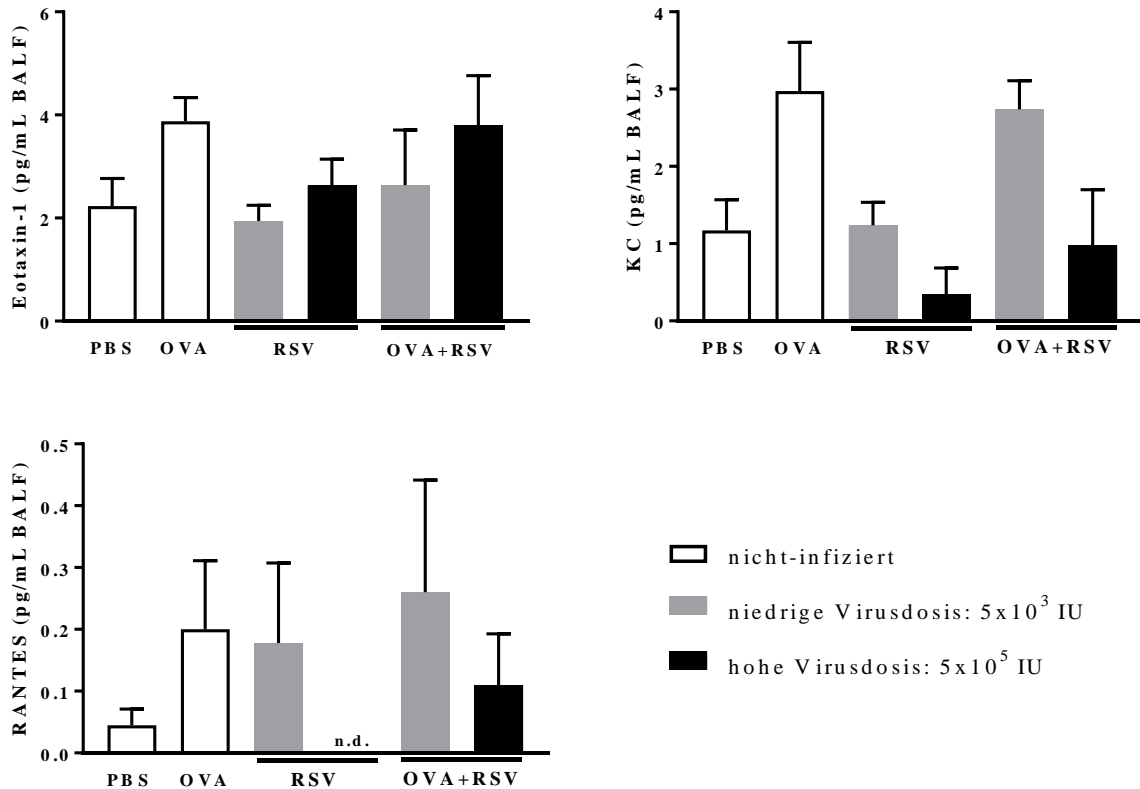


Abb. 4.49: Proteinkonzentrationen von Chemokinen im Lungenlumen 8 Tage nach der RSV-Infektion. Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben behandelt. An Tag 37 bzw. 8 Tage nach der RSV-Infektion wurde eine broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels CBA (siehe 3.12.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=4). Die Gruppen wurden statistisch mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; **** p<0,0001. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+RSV sind dargestellt. Abkürzung: n.d. – nicht detektierbar (alle Werte sind 0)

Zusätzlich wurden noch das pro-inflammatorische Zytokin IL-17A und das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 untersucht. Wie auch schon bei anderen pro-inflammatorischen Zytokinen zeigt IL-17A einen Tag nach der Infektion die geringsten Konzentrationen bei RSV_{niedrig} und RSV_{hoch} gefolgt von PBS. Mittlere Konzentrationen sind hier bei OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch} zu sehen und die höchste Konzentration zeigt OVA. IL-10 konnte bei OVA+RSV_{hoch} nicht nachgewiesen werden und zeigt auch, außer bei RSV_{niedrig}, nur geringe Konzentrationen (siehe Abb. 4.50).

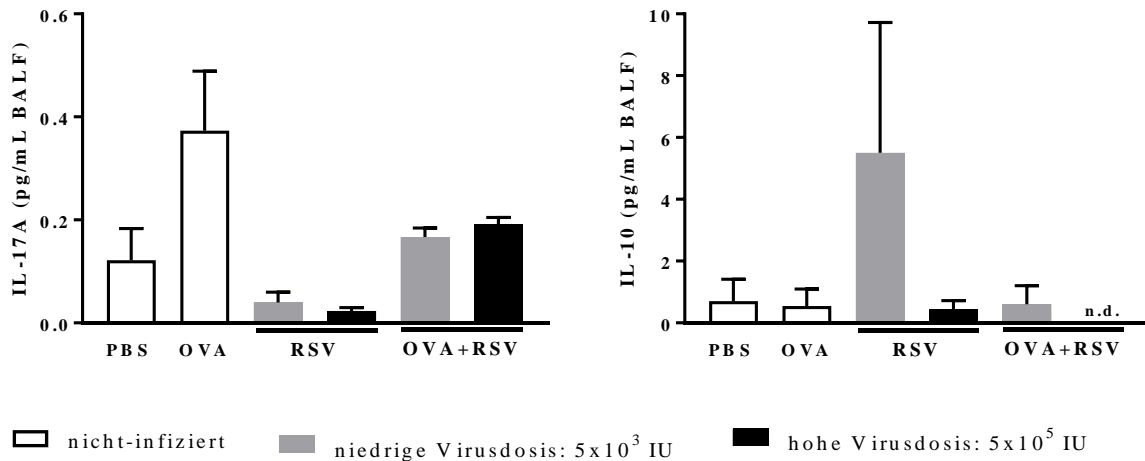


Abb. 4.50: Proteinkonzentrationen verschiedener Immunmediatoren im Lungenlumen 1 Tag nach der RSV-Infektion.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben behandelt. An Tag 30 bzw. 1 Tag nach der RSV-Infektion wurde eine broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels CBA (siehe 3.12.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=4). Die Gruppen wurden statistisch mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+RSV sind dargestellt. Abkürzung: n.d. – nicht detektierbar (alle Werte sind 0)

Die geringste Konzentration von IL-17A ist vier Tage nach der Infektion bei RSV_{niedrig} zu sehen. Diese steigt abhängig von der Infektionsdosis an und erreicht ebenfalls bei PBS eine ähnliche Konzentration. Mittlere Konzentrationen finden sich bei OVA+RSV_{niedrig} und OVA+RSV_{hoch}, die gleichauf liegen. Die höchste Konzentration wurde bei OVA gemessen. IL-10 kann bei OVA und RSV_{hoch} und OVA+RSV_{hoch} nicht nachgewiesen werden. Eine geringe Konzentration ist bei PBS zu sehen, die über OVA+RSV_{niedrig} bis zur höchsten Konzentration bei RSV_{niedrig} ansteigt (siehe Abb. 4.51).

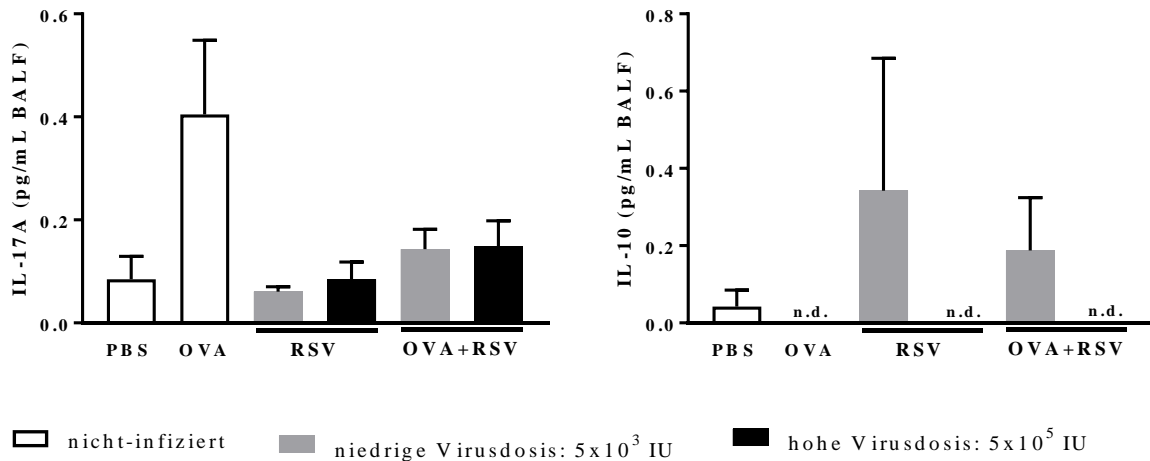


Abb. 4.51: Proteinkonzentrationen verschiedener Immunmediatoren im Lungenlumen 4 Tage nach der RSV-Infektion.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben behandelt. An Tag 33 bzw. 4 Tage nach der RSV-Infektion wurde eine broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels CBA (siehe 3.12.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=4). Die Gruppen wurden statistisch mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+RSV sind dargestellt. Abkürzung: n.d. – nicht detektierbar (alle Werte sind 0)

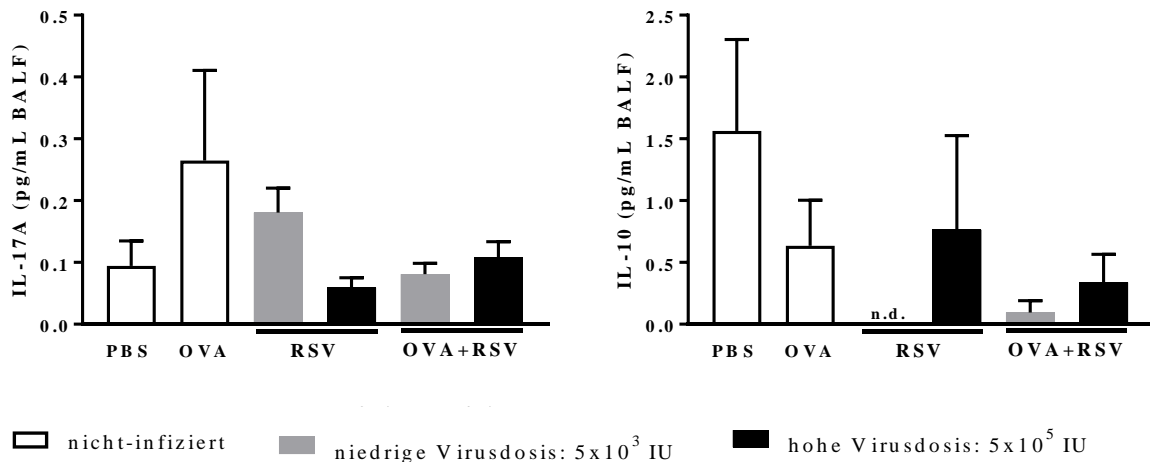


Abb. 4.52: Proteinkonzentrationen verschiedener Immunmediatoren im Lungenlumen 8 Tage nach der RSV-Infektion.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben behandelt. An Tag 37 bzw. 8 Tage nach der RSV-Infektion wurde eine broncho-alveoläre Lavage (siehe 3.4.2) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels CBA (siehe 3.12.1) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=4). Die Gruppen wurden statistisch mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen OVA und OVA+RSV sind dargestellt. Abkürzung: n.d. – nicht detektierbar (alle Werte sind 0)

Acht Tage nach der Infektion ist die höchste Konzentration bei OVA zu finden. Davon ausgehend nimmt die Konzentration über RSV_{niedrig}, OVA+RSV_{hoch}, PBS, OVA+RSV_{niedrig} bis zur niedrigsten Konzentration bei RSV_{hoch} stetig ab. IL-10 konnte bei RSV_{niedrig} nicht nachgewiesen werden. Eine nur sehr geringe Konzentration konnte ebenfalls bei OVA+RSV_{niedrig} gemessen werden. Zunehmende Konzentrationen sind bei OVA+RSV_{hoch}, OVA und RSV_{hoch} bis zur höchsten Konzentration bei PBS zu sehen (siehe Abb. 4.52).

Zum Abschluss wurde die Replikation der Viren in der Lunge von gesunden (RSV) und asthmatischen (OVA+RSV) Mäusen untersucht. Dazu wurde der Virustiter in der Lunge mittels Plaque-Test (siehe 3.13.2) an allen Zeitpunkten bestimmt. An den Zeitpunkten, einen Tag beziehungsweise acht Tage nach der Infektion konnten jeweils keine Plaques in beiden Behandlungsgruppen nachgewiesen werden (hier nicht graphisch gezeigt). Vier Tage nach der Infektion wurde ein tendenziell erhöhter Virustiter in der Lunge der gesunden Mäuse gegenüber den asthmatischen Mäusen ermittelt (siehe Abb. 4.53).

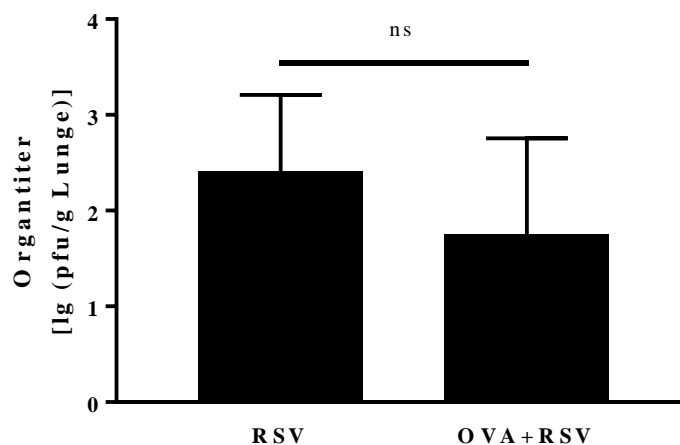


Abb. 4.53: Virusreplikation im Lungengewebe 4 Tage nach der RSV-Infektion.

Die Mäuse wurden wie in 3.2.3 beschrieben mit der hohen Virusdosis 5×10^5 IU behandelt. Tag 33 bzw. 4 Tage nach der RSV-Infektion wurden die Lungen entnommen (siehe 3.4.4), anschließend zu Lungenhomogenat verarbeitet (siehe 3.8.3.1) und der Virustiter in der Lunge (siehe 3.13.2) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=8). Die Gruppen wurden statistisch mittels Student's t-Test verglichen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns – nicht signifikant.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass es in keiner der Behandlungsgruppen zu einer substanziellen Gewichtsabnahme kommt und alle Tiere den Beobachtungszeitraum überleben. Die Mukusproduktion und die Anzahl an Becherzellen ist an allen Analysezeitpunkten unabhängig der Infektionsdosis bei OVA+RSV im Vergleich mit OVA erhöht.

Die erhöhte Entzündung in der Lunge im Hinblick auf Zellinfiltration und die Expression und Produktion von Mediatoren bei OVA+RSV gegenüber OVA findet sich nur einen Tag beziehungsweise acht Tage nach der Infektion und auch nur für die hohe Infektionsdosis. Hier findet sich jeweils eine erhöhte Infiltration von Eosinophilen, Neutrophilen und Lymphozyten bei OVA+RSV_{hoch} im Vergleich mit OVA.

Eine AHR ließ sich in keiner der Gruppen zu keinem Zeitpunkt durch Methacholin auslösen.

Bei der Expression und Produktion von Transkriptionsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen zeigt sich ein sehr gemischtes und nicht eindeutiges Bild. So ist zwar die Expression des T_H2-Transkriptionsfaktors GATA3 erhöht, die Produktion der T_H2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, sowie die Expression von TARC/CCL17, IL-33 und TGF- β und Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α und IL-17A und IL-10 und die Chemokine Eotaxin-1/CCL11 und RANTES/CCL5 erniedrigt bei OVA+RSV_{hoch} im Vergleich mit OVA.

Der T_H1-Transkriptionsfaktor T-bet ist bei OVA+RSV_{hoch} erhöht gegenüber RSV_{hoch} und OVA, aber die Produktion des T_H1-Zytokins IFN- γ ist bei OVA+RSV_{hoch} gegenüber RSV_{hoch} erniedrigt, ebenso die Produktion und Expression der Chemokine KC/CXCL1 beziehungsweise IP-10/CXCL10.

Die Typ I Interferone IFN- α , IFN- β und der Transkriptionsfaktor für Typ I Interferone IRF7 hingegen sind in der Expression und Produktion erhöht bei OVA+RSV_{hoch} im Vergleich mit RSV_{hoch}.

Der Transkriptionsfaktor der regulatorischen T-Zellen FoxP3 ist bei OVA+RSV_{hoch} sowohl im Vergleich mit RSV_{hoch} als auch OVA erhöht. Acht Tage nach der Infektion gleicht sich die Expression bei OVA+RSV_{hoch} und OVA an.

Der Virustiter in der Lunge ließ sich nur an Tag vier, dem Tag des Replikationsmaximums, und auch nur in der hohen Infektionsdosis messen. Dabei liegt der Virustiter bei RSV tendenziell höher als bei OVA+RSV.

All das steht im Gegensatz zu dem Zeitpunkt vier Tage nach der Infektion. Hier konnte weder für die Entzündung der Lunge im Hinblick auf die Zellinfiltration und die Expression und Produktion von Transkriptionsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen, die Becherzellhyperplasie, sowie die AHR eine Verschlimmerung bei OVA+RSV im Vergleich zu OVA erreicht werden.

5 Diskussion

Asthma ist bis heute nicht heilbar.⁶⁴ Die größten Herausforderungen für den Patienten und die Gesundheitssysteme stellen die sogenannten Asthma-Exazerbationen dar.^{71,73} Dabei handelt es sich um die akute Verschlimmerung der bereits bestehenden Asthma-Symptomatik, die in den meisten Fällen durch eine chronische Entzündung der Atemwege hervorgerufen wird. Verschiedene Stimuli, wie Allergene, Bakterien, Umweltverschmutzung, Viren, Zigarettenrauch⁷⁷⁻⁷⁹, Schwangerschaft⁸⁰⁻⁸² und Stress^{83,84} können Exazerbationen auslösen. Die Mehrheit der Exazerbationen ist jedoch mit respiratorischen Viren assoziiert.^{70,85,86} Die akute Verschlimmerung der Symptome während einer Exazerbation geht mit einer Erhöhung der bereits bestehenden Entzündung einher, die zu erhöhter Zellinfiltration in die Atemwege, erhöhter Produktion von Zytokinen und Chemokinen, erhöhter Mukusproduktion, sowie einer erhöhten AHR führt. Jedoch sind die Mechanismen der Entstehung der virusbedingten Exazerbation, die zu der oben genannten Pathologie führen, bis heute noch nicht verstanden.

Daher wurde in einem ersten Teil der hier vorliegenden Arbeit in einem Tiermodell einer poly(I:C)-induzierten Exazerbation experimentellen Asthmas die frühen Immunantworten, die zu der Entstehung der Exazerbation beitragen, näher untersucht. Daraus resultierend soll ein Markerprofil vorgeschlagen werden, das der Voraussage oder dem frühzeitigen Erkennen einer anstehenden Exazerbation dient. Hierfür wurde eine Kinetik der frühen Immunantworten anhand der Zellinfiltration, sowie der Expression und Produktion von Immunmediatoren in der Lunge bestimmt. Dabei wurden verschiedene Zelltypen sowie Mediatoren betrachtet, die zu den oben genannten Charakteristika, wie erhöhte Mukusproduktion, AHR und vermehrte Entzündung beitragen können. Ebenfalls wurden Zellen und Mediatoren betrachtet, die eine Rolle in der Immunantwort gegenüber Infektionserregern, vor allem Viren, besitzen.

Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Entzündung in den Atemwegen der Mäuse der Exazerbationsgruppe vor allem bis zwölf Stunden bei der Betrachtung von entzündlichen Mediatoren, beziehungsweise sogar bis 96 Stunden bei Betrachtung der Infiltration der Lunge durch Immunzellen, nach der poly(I:C)-Applikation vorhanden war.

Bei der Untersuchung der Infiltration der Lunge durch Immunzellen konnten in den ersten zwölf Stunden nach der poly(I:C)-Applikation erhöhte Zahlen von Eosinophilen und vor allem auch Neutrophilen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu sind Lymphozyten erst ab 24 Stunden nach der poly(I:C)-Applikation erhöht. Makrophagen hingegen sind über den

gesamten betrachteten Zeitraum in ähnlicher Anzahl vorhanden und auch gegenüber den anderen Behandlungsgruppen nicht erhöht.

Auch bei der Betrachtung von verschiedenen sezernierten Mediatoren stellt man fest, dass eine erhöhte Expression beziehungsweise Produktion in den ersten zwölf beziehungsweise bei einer Ausnahme bis 24 Stunden nach der poly(I:C)-Applikation stattfindet.

Die Expression der Chemokine IP-10/CXCL10 und TARC/CCL17 steigt in den ersten zwölf Stunden leicht an. Das pro-inflammatorische Zytokin IL-15 wird innerhalb der ersten acht Stunden ansteigend exprimiert. Die, für die Bekämpfung von viralen Infektionen wichtigen, Interferone werden ebenfalls in den ersten zwölf Stunden nach der poly(I:C)-Applikation ansteigend gebildet. Die Konzentrationen der T_H2 -Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, sind erwartungsgemäß bereits zum Zeitpunkt der poly(I:C)-Applikation erhöht, steigen jedoch nochmals innerhalb des zwölf Stunden-Zeitfensters an, wobei IL-4 und IL-5 ein Konzentrationsplateau zwischen zwei und acht beziehungsweise zwölf Stunden aufweisen. Auch die Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 α , IL-1 β und IL-17A, sowie das Chemokin Eotaxin-1/CCL11 steigen in den ersten zwölf Stunden an. Im Gegensatz dazu zeigen TNF- α und KC/CXCL1 einen sprunghaften Anstieg in nur zwei Stunden und einen sich direkt anschließenden Abfall. Zusätzlich zeigt auch IL-6 einen sprunghaften Anstieg innerhalb von zwei Stunden, jedoch bleibt dieser Anstieg bis zwölf Stunden nach der poly(I:C)-Applikation erhalten. Die Konzentration von VEGF hingegen verzeichnet erst nach acht einen Anstieg bis nach 24 Stunden.

Daraus lässt sich erkennen, dass die frühe Kombination aus anti-viralen und asthmatischen Immunantworten für die Entstehung einer akuten Asthma-Exazerbation verantwortlich sein könnte. Zusätzlich zeigt sich in dem hier angewandten Modell, dass es scheinbar keine negative Regulation zwischen der allergischen T_H2 /Eosinophilen-vermittelten und der anti-viralen T_H1 /Neutrophilen-vermittelten Immunantworten gibt, da die Konzentrationen der Exazerbationsgruppe meist höher oder aber auf gleichem Niveau wie die der poly(I:C)-behandelten Gruppe liegen.

Da sowohl das Maximum der Zellinfiltration in der Lunge als auch die Konzentrationsmaxima der meisten Mediatoren in den ersten zwölf Stunden nach der poly(I:C)-Applikation liegen, lässt sich vermuten, dass die Etablierung einer Exazerbation lediglich eines kurzen Zeitfensters bedarf, in dem gehandelt werden sollte, um somit die Exazerbation durch Medikation abmildern oder im Idealfall auch verhindern zu können. Daraus resultierte die Frage, ob es möglich ist ein Mediatorprofil zu finden, das für eine Detektion der frühen Veränderung in den

Immunantworten hilfreich ist und somit eine Voraussage einer anstehenden Exazerbation möglich ist.

Eine Kinetik in dieser Frühphase nach einer exazerbationsauslösenden Infektion wurde in der Literatur bisher weder im Mausmodell noch in experimentellen Virusinfektionen in Asthmapatienten beschrieben. Dennoch finden sich Zeitverlaufsstudien in der Literatur, die eine Kinetik im Zusammenhang mit dem Verlauf der Virusinfektion aufzeigen und sich über Tage als Untersuchungszeitpunkte erstreckt, um somit ein möglichst breites Spektrum der verschiedenen Phasen der Virusinfektion in ihren Untersuchungen abzudecken. Dabei wurden sowohl Mausmodelle^{112,119,128-134} als auch experimentelle HRV-Infektionen in Asthmapatienten beziehungsweise Untersuchungen von Asthmapatienten mit natürlicher Virusinfektion¹³⁵⁻¹³⁸ verwendet.

Es gibt ein weiteres poly(I:C) verwendendes, aber HDM-basiertes Mausmodell zur Untersuchung der virusbedingten Asthma-Exazerbation in BALB/c Mäusen von De Alba et al.¹³⁴, dass die Endpunkte vier, 24 und 48 Stunden nach der letzten Behandlung setzt. Jedoch muss man hier beachten, dass die Applikation des poly(I:C) zwar nach der Sensibilisierung, aber vor der Provokation der Tiere mit dem Allergen HDM stattfand, sodass es sich hierbei nicht um eine Exazerbation einer bereits bestehenden allergischen Atemwegsentzündung handelt und die letzte Behandlung also die Provokation mit HDM darstellt. Daher unterscheiden sich die Verläufe der Zytokinproduktion erwartungsgemäß in diesem Modell gegenüber dem in dieser Arbeit verwendeten Modell. So sind die pro-inflammatorischen Zytokine und KC/CXCL1 bei vier Stunden erhöht und fallen anschließend ab, wohingegen die T_H2-Zytokine von vier bis auf ihr Maximum bei 24 Stunden ansteigen und dann wieder abfallen. Dies kann sich jedoch aus der noch nicht etablierten allergischen Atemwegsentzündung zum Zeitpunkt der poly(I:C)-Applikation ergeben.

Alle weiteren Mausmodelle mit einer Zeitverlaufsstudie verwenden entweder HRV, RSV oder Influenza-Viren in Kombination mit verschiedenen Auslösern der allergischen Atemwegsentzündung und Mausstämmen zur Auslösung einer Exazerbation.

Bartlett et al.¹¹² und Beale et al.¹²⁸ verwenden HRV1b, um eine OVA-induzierte allergische Atemwegsentzündung in BALB/c Mäusen zu exazerbieren. Die Infektion mit dem HRV erfolgte im Anschluss an die letzte Provokation mit OVA. Analysezeitpunkte waren null, eins, zwei, drei, fünf, sieben und 14 Tage nach der Infektion. Neutrophile steigen von Tag null bis Tag eins an und fallen direkt danach wieder. Eosinophile und Lymphozyten hingegen steigen

kontinuierlich bis Tag sieben an und fallen erst dann wieder ab. Die T_H2 -Zytokine IL-4 und IL-13 sind bereits zehn Stunden nach der Infektion erhöht und fallen anschließend ab, wohingegen IL-5 von zehn Stunden bis einen Tag nach der Infektion nochmal ansteigt und erst anschließend abfällt.

Hashimoto et al.¹²⁹ verwenden RSV, um eine OVA-induzierte allergische Atemwegsentzündung in BALB/c Mäusen zu exazerbieren. Die Infektion erfolgte an Tag drei der achttägigen Provokation mit OVA und wurde als Tag null des Protokolls definiert. Die Analysen wurden an den Tagen null, zwei, vier, sechs, zehn und 14 durchgeführt. Es wurden lediglich drei Zytokine betrachtet. IL-17 steigt von Tag null bis zu der höchsten gemessenen Konzentration an Tag sechs und fällt anschließend wieder ab. IL-13 steigt von Tag null bis Tag zwei und fällt danach wieder ab. Hier ist jedoch zu beachten, dass die Konzentrationen in der Exazerbationsgruppe niedriger sind als die in der Asthmagruppe. $IFN-\gamma$ konnte hier lediglich an Tag sechs gemessen werden und die Konzentration der OVA und RSV behandelten Tiere liegt zwar über der Konzentration der nur OVA behandelten Tiere aber deutlich unter der Konzentration der nur infizierten Tiere.

Nazir et al.¹³³ kombinieren einen Influenza A-Virus des Subtyps H3N2 mit einer OVA-induzierten allergischen Atemwegsentzündung in BALB/c Mäusen. Die Infektion mit dem Influenza-Virus fand 24 Stunden vor der ersten von drei Provokationen mit OVA statt, sodass es sich wie auch hier wie bei De Alba et al.¹³⁴ nicht um eine Exazerbation einer bereits bestehenden allergischen Atemwegsentzündung handelt. Die Analysen wurden für neun, zwölf, 24 und 48 Stunden nach der letzten Provokation mit OVA terminiert. Die Zellinfiltration steigt von neun bis 24 Stunden und fällt anschließend ab. Neutrophile sind zu Beginn bei neun Stunden hoch und fallen anschließend kontinuierlich ab. Makrophagen steigen von neun bis zwölf Stunden und nehmen dann wieder ab. Lymphozyten und Eosinophile steigen von neun bis 24 Stunden an und fallen erst dann wieder ab. $IFN-\gamma$ steigt stark von neun bis zwölf Stunden an und fällt anschließend wieder, wohingegen IL-4 und IL-5 von neun bis 24 Stunden ansteigen und erst dann wieder abfallen.

Einen saisonalen Influenza A-Virus des Subtyps H1N1 verwenden An et al.¹³⁰ für die Exazerbationsauslösung einer OVA-induzierten allergischen Atemwegsentzündung in C57BL/6 Mäusen. Ein Tag nach der der vollständigen Etablierung der allergischen Atemwegsentzündung wurden die Mäuse infiziert und null, einen, drei, fünf und sieben Tage nach der Infektion analysiert. $IFN-\gamma$ steigt stetig von Tag null bis Tag sieben an. $IFN-\lambda 2/3$ steigt von Tag null bis Tag eins auf die höchste gemessene Konzentration und fällt anschließend wieder. Die Konzentration in der infizierten Asthmagruppe ist jedoch geringer als die der

gesunden Infizierten. IL-4, IL-5 und IL-13 zeigen zu Beginn an Tag null bereits hohe Konzentrationen, die anschließend abfallen, wobei die Influenza-Infektion in den asthmatischen Mäusen die Produktion der Zytokine im Vergleich zu nicht infizierten asthmatischen Mäusen verringert.

Auch Ishikawa et al.¹³¹ verwenden einen saisonalen Influenza A-Virus des Subtyps H1N1 in Verbindung mit einer OVA-induzierten allergischen Atemwegsentzündung in C57BL/6 Mäusen für ihre Untersuchungen. 24 Stunden nach der letzten Provokation mit OVA wurden die Tiere infiziert und im Anschluss null, zwei, vier und sechs Tage nach der Infektion analysiert. Die Konzentration von IFN- α und IL-6 steigen von Tag null bis Tag vier und fallen anschließend und die Konzentrationen von IFN- γ und TNF- α konnten nur an Tag sechs gemessen werden. Die Konzentration von TNF- α ist jedoch in der Exazerbationsgruppe im Vergleich zur Infektionsgruppe verringert.

Samarasinghe et al.¹³² induzierten in C57BL/6 Mäusen mit dem Pilz *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) eine allergische Atemwegsentzündung und infizierten anschließend mit einem pandemischen Influenza A-Virus des Subtyps H1N1. Die Analyse erfolgte einen, drei, fünf, sieben und neun Tage nach der Infektion. Die Konzentrationen von IFN- α , IFN- γ und IFN- λ 3 steigen jeweils bis Tag fünf beziehungsweise Tag drei nach der Infektion und sinken danach wieder ab. Jedoch ist die Konzentration aller Interferone in der Exazerbationsgruppe niedriger als in der Infektionsgruppe.

Einen anderen Influenza A-Virus Subtyp H3N2 hingegen verwenden Ravanetti et al.¹¹⁹ für die Exazerbationsauslösung ihrer HDM-induzierten allergischen Atemwegsentzündung. Die Infektion findet am ersten Tag der letzten Provokationswoche mit HDM und die Analysen 14 Stunden, einen, zwei, vier, sechs, acht und 15 Tage nach der Infektion statt. Die Zellzahl ist 14 Stunden nach der Infektion erhöht, fällt jedoch bis einen Tag nach der Infektion und steigt wieder bis sechs Tage nach der Infektion, um erneut abzufallen. Das gleiche Bild zeigt sich für die Neutrophile. Eosinophile sind auch leicht erhöht, steigen jedoch 14 Stunden nach der Infektion nochmals weiter an bis vier Tage nach der Infektion und fallen anschließend. Lymphozyten sind ebenfalls 14 Stunden nach der Infektion erhöht, fallen bis vier Tage nach der Infektion, um erneut anzusteigen. Die Konzentrationen von TNF- α , IP-10/CXCL10, IFN- γ und IL-5 zeigen an den Tagen eins, zwei und vier relativ gleichbleibende Konzentrationen, die an Tag sechs ansteigen und direkt im Anschluss wieder sinken. IL-6 ist nur an Tag sechs messbar. Die Konzentration von KC/CXCL1 steigt schwach aber stetig von Tag eins bis Tag sechs nach der Infektion und fällt anschließend wieder. IL-17A steigt von Tag eins auf Tag zwei und hält dieses Niveau relativ stabil bis Tag sechs und nimmt dann wieder ab. IL-13

hingegen steigt von Tag eins auf Tag zwei, um auf Tag vier wieder abzufallen und auf Tag sechs wieder anzusteigen, um wieder abzufallen an Tag acht und wieder leicht anzusteigen an Tag 15.

Unterschiedliche Verläufe der Kinetiken der Zellinfiltration und Zytokinproduktion zeigen die Modelle von De Alba et al.¹³⁴ und Nazir et al.¹³³ was jedoch auf den Zeitpunkt der poly(I:C)- beziehungsweise Influenza-Virus-Applikation zwischen der Sensibilisierung und Provokation mit den jeweiligen Allergenen zurückzuführen sein könnte. Ähnliche Verläufe der Kinetiken der Zellinfiltration und Zytokinproduktion zeigen die Modelle von Bartlett et al.¹¹² und Beale et al.¹²⁸, die HRV-1b für die Auslösung der Exazerbation verwenden, sowie das Modell von Ravanetti et al.¹¹⁹, die einen Influenza A-Virus des Subtyps H3N2 verwenden. Lediglich einen größeren Unterschied in der Kinetik für IL-6 zeigt sich zwischen dem hier verwendeten Modell und dem Modell von Ravanetti et al.¹¹⁹. In dem Modell von Ravanetti et al.¹¹⁹ konnte IL-6 lediglich an einem Tag (sechs Tage nach der Infektion) nachgewiesen werden, wohingegen in dem hier verwendeten Modell IL-6 bereits sehr früh in sehr hoher Konzentration und diese zusätzlich über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden konnte. Ebenfalls ähnliche Verläufe der Kinetiken der Zellinfiltration und Zytokinproduktion zeigen die Modelle von Hashimoto et al.¹²⁹, die einen RSV für die Auslösung der Exazerbation verwenden, und An et al.¹³⁰, Ishikawa et al.¹³¹ und Samarasinghe et al.¹³², die einen Influenza A-Virus des Subtyps H1N1 verwenden. Jedoch bleiben die Anzahl der infiltrierenden Zellen und Zytokinkonzentrationen in den jeweiligen Exazerbationsgruppen oftmals unterhalb der zugehörigen Asthmagruppen beziehungsweise Infektionsgruppen.

Bei experimentellen Infektionen mit HRV in Asthmapatienten zeigen die Zytokine IL-4, IL-5, IL-13 und die Chemokine TARC/CCL17 und IP-10/CXCL10 ähnliche Verläufe wie in unserem Modell, jedoch sind diese Verläufe nicht über Stunden, sondern Tage gerichtet. Die Interferone hingegen zeigen ihre Höchstkonzentrationen im Verlauf der infizierten Asthmapatienten früher (Tag zwei nach Infektion) als in unserem Modell (zwölf Stunden nach poly(I:C)-Applikation), allerdings muss auch hier wieder beachtet werden, dass es sich bei den Skalen um Stunden beziehungsweise Tage handelt.¹³⁵ Auch die schwersten Symptome treten an Tag drei¹³⁷ beziehungsweise Tag vier^{135,136} nach der Infektion und jeweils 24 Stunden vor der schlechtesten gemessenen Lungenfunktion auf. In den Studien von Hansel et al.¹³⁵ und Jackson et al.¹³⁶ zeigen sich vermehrte Symptome der unteren Atemwege während der Virusinfektion, jedoch werden keine Angaben zu therapeutischen Maßnahmen aufgeführt. In der Studie von Zambrano et al.¹³⁷ wurden ebenfalls vermehrte Symptome der unteren Atemwege verzeichnet, jedoch war kein

Eingreifen mit anti-inflammatorischen Medikamenten, wie inhalierte oder orale Kortikosteroide, nötig.

Bei asthmatischen Kindern, die aufgrund der Unkontrollierbarkeit ihres Asthmas in das Behandlungszentrum kamen, zeigt sich während einer natürlichen Influenza-Infektion sogar innerhalb der ersten zwei Tage die größte Verschlechterung der Lungenfunktion, die sich anschließend wieder verbessert und an Tag sieben vollständig erholt hat.¹³⁸

Sowohl die Beobachtungen der zeitlichen Entwicklung der Exazerbation in den Mausmodellen sowie bei experimentellen Infektionen mit HRV beziehungsweise natürlichen Influenza-Infektionen in Asthmapatienten stützen die Ergebnisse der hier angestellten Untersuchungen, dass die Exazerbation durch die frühen Immunantworten nach der Virusinfektion induziert wird und dabei ein Zusammenspiel der allergischen und anti-viralen Immunantworten eine Rolle spielt.

Um ein Mediatorprofil für eine Voraussage beziehungsweise das frühzeitige Erkennen einer anstehenden Exazerbation vorschlagen zu können, wurden alle untersuchten Mediatoren im Hinblick auf den Zeitpunkt des Auftretens ihrer höchsten Konzentration, der Höhe der gemessenen Konzentration in der BAL und dem jeweils höchsten Konzentrationsunterschied zwischen der Exazerbationsgruppe und der stabilen Asthmagruppe sortiert (siehe Abb. 5.1).

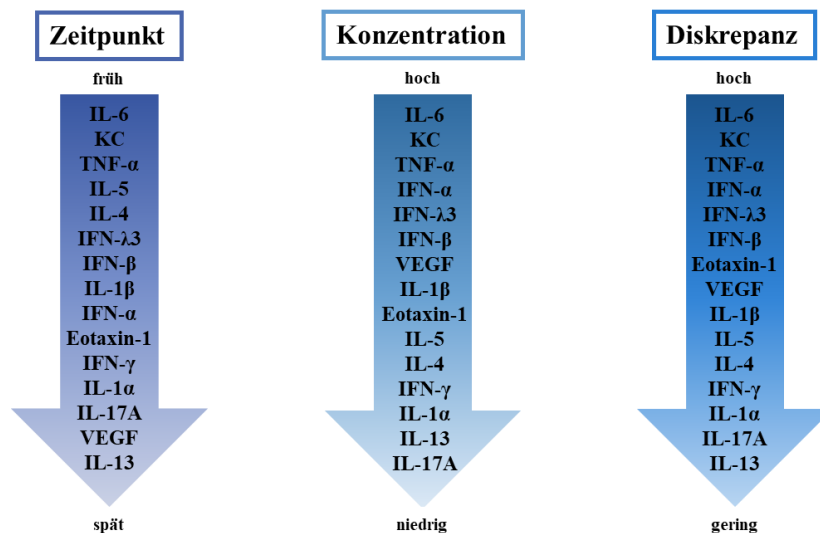


Abb. 5.1: Sortierung der gemessenen Mediatoren zur Untersuchung der frühen Exazerbation von experimentellem Asthma

Die Abbildung zeigt links die Mediatoren sortiert nach dem Zeitpunkt des Auftretens ihrer höchsten gemessenen Konzentration. Dabei wurden Mediatoren mit dem gleichen Zeitpunkt des Auftretens zusätzlich nach der Höhe der Konzentration sortiert. In der Mitte ist die Sortierung der Mediatoren nach ihrer höchsten gemessenen Konzentration innerhalb des gesamten Betrachtungszeitraumes von 96h abgebildet. Rechts zeigt die Abbildung die Mediatoren sortiert nach dem jeweils höchsten Konzentrationsunterschied zwischen der Exazerbationsgruppe und der stabilen Asthmagruppe.

Dabei stellt sich heraus, dass IL-6 bereits zum frühest untersuchten Zeitpunkt eine sehr hohe Konzentration zeigt, die höchste gemessene Konzentration aller Mediatoren und diese auch noch den größten Unterschied gegenüber der Konzentration der stabilen Asthmagruppe aufweist. Gefolgt von KC/CXCL1 und TNF- α in allen drei Rankings.

Dies ist jedoch keine große Überraschung, da sie bereits im Zusammenhang von Virusinfektionen, Asthma oder auch im Zusammenhang mit einer virusvermittelten Asthma-Exazerbation beschrieben wurden. So wurde eine erhöhte Konzentration von IL-6 im Plasma von Asthmatikern in Zusammenhang mit einer schlechteren Lungenfunktion¹³⁹ und einem vermehrten Auftreten von Exazerbationen gebracht.¹⁴⁰ Es konnte auch gezeigt werden, dass bei eben diesen Exazerbationen das bereits in stabilen Asthmatikern erhöhte IL-6 nochmals erhöht ist.¹⁴¹⁻¹⁴³ Der Neutrophil-Attraktor IL-8, das funktionelle Homolog zu dem hier untersuchten KC/CXCL1, zeigt ebenfalls erhöhte Konzentrationen in nasalen Waschungen von asthmatischen Kindern mit nachweislicher virusbedingter Exazerbation.¹⁴⁴ Dabei ist die Produktion von IL-8 zum Einen abhängig von der Replikation der Viren und zum Anderen von der Bindung der Viren an die Rezeptoren.¹⁴⁵ Auch TNF- α zeigt sowohl eine erhöhte Expression¹⁴⁶ als auch Produktion¹⁴⁷ in den Atemwegen von Asthmapatienten in der stabilen Phase und eine nochmalige Erhöhung während einer schweren Exazerbation.¹⁴²

Da die Voraussagbarkeit einer Exazerbation mittels eines solchen Mediatorprofils jedoch nur durch eine regelmäßige Kontrolle der Mediatoren in kurzen Abständen gegeben und die Verfügbarkeit der BAL in Patienten eingeschränkt ist, wurden besser zugängliche Kompartimente, wie der Nasen-Rachen-Raum durch eine Nasenspülung oder Körperflüssigkeiten, wie Blut oder am besten Speichel, als Probenmaterial angenommen. Daher wurden in dem hier verwendeten Modell auch Serumproben und die NAL auf die Mediatoren getestet. Eine Gewinnung von Speichelproben hingegen gestaltet sich bei Mäusen wiederum schwierig. Es zeigt sich, dass alle drei Mediatoren, sowohl im Blut als auch in der NAL nachweisbar waren. Darüber hinaus zeigte sich, dass IL-6 sogar noch höhere Konzentrationen in der NAL gegenüber der BAL aufweist, was eine Detektion sogar nochmals erleichtert.

Auf der einen Seite lässt sich aus diesen Ergebnissen ein kombiniertes Mediatorprofil aus IL-6, KC/CXCL1 beziehungsweise IL-8 im Patienten, TNF- α , sowie einem T_H2-Zytokin, z.B. IL-5, und einem Interferon, z.B. IFN- λ 3, für eine frühe Detektion einer entstehenden virusinduzierten Exazerbation im Speichel vorschlagen. Eine Verifizierung durch Patientendaten müsste jedoch noch erfolgen.

Auf der anderen Seite lässt sich die Frage stellen, ob sich diese Mediatoren auch gleichzeitig als Angriffspunkte für eine Therapie, zum Beispiel durch Neutralisierung der Mediatoren, eignen um somit die Entstehung der Exazerbation zu unterdrücken und die Verschlimmerung gänzlich zu stoppen oder zumindest sehr stark abmildern zu können, und somit die Progression der Erkrankung aufhalten zu können. Allerdings müssen hier auch die Auswirkungen auf die virale Replikation und die anti-viralen Immunantworten, sowie die Beseitigung der viralen Infektion bedacht und getestet werden.

Daher sollten in dem zweiten Teil zusätzlich Mausmodelle für die virusinduzierte Exazerbation experimentellen Asthmas etabliert werden. Dazu wurden zwei unterschiedliche respiratorische Viren verwendet. Zum einen ein Influenza A-Virus des Subtyps H1N1 aus der Pandemie von 2009 (A/Hamburg/NY1580/09 pH1N1)¹²⁵, der in Hamburg aus einem Patienten isoliert wurde und zum anderen ein Respiratorisches Syncytialvirus des Stammes A2.

Zuerst wurde das Mausmodell für die Influenza-Virus-induzierte Exazerbation experimentellen Asthmas etabliert und charakterisiert (siehe Kapitel 3.2.2). Der tendenziell späte Zeitpunkt (neun Tage nach der Infektion) der Analyse wurde für die Etablierung des Modells bewusst gewählt, um auch Effekte der Virusreplikation und Schädigung der Atemwege durch die Infektion als mögliche Auslöser der Exazerbation nicht auszuschließen, da dieser nach dem zu erwartenden Replikationsmaximum liegt. Zusätzlich wurden ebenfalls aufeinanderfolgend zwei unterschiedliche Protokolle verwendet. Hierbei spielte der transiente Phänotyp der OVA-induzierten Entzündung in der Lunge der Maus eine Rolle. Deshalb wurde in der ersten Protokollvariante eine erneute Exposition der Mäuse gegenüber dem Allergen durchgeführt um den Phänotyp der OVA-induzierten Entzündung in der Lunge aufrecht zu erhalten. In der zweiten Variante wurde jedoch auf diese erneute Exposition verzichtet, da sie in der Asthmagruppe zu einer extremen Steigerung der allergischen T_H2-vermittelten Entzündung der Lunge führte, wodurch die Vermutung aufkam, dass die allergische Entzündung zu diesem Zeitpunkt noch nicht wieder komplett abgebaut wurde.

In beiden Behandlungsprotokollen konnte, unabhängig von der Infektionsdosis zum Analysezeitpunkt, keine erhöhte Mukusproduktion in den Exazerbationsgruppen im Vergleich mit der Asthmagruppe beobachtet werden. Eine erhöhte Entzündung in der Lunge im Hinblick auf die Zellinfiltration, die Expression und Produktion von Mediatoren konnte nur bei einem Verzicht auf eine erneute Exposition gegenüber dem Allergen OVA erreicht werden. Hierbei konnte die T_H2-vermittelte Immunantwort jedoch nicht gesteigert werden. Allerdings lassen

sich gesteigerte Konzentrationen für pro-inflammatorische Mediatoren, sowie das T_H1-Zytokin IFN- γ , sowie eine erhöhte Expression des T_H1-Transkriptionsfaktors T-bet beobachten. Die AHR konnte in diesem Modell nicht bestimmt werden.

Aufgrund dessen stellt sich nun die Frage, ob es sich also in diesem Fall um ein Mausmodell für die Influenza-Virus-vermittelte Exazerbation experimentellen Asthmas handelt. Da es sich bei Patienten bei der Asthma-Exazerbation immer um eine akute Verschlechterung ihrer Symptome handelt, die höchstwahrscheinlich mit einer erhöhten Mukusproduktion, einer Erhöhung der bereits bestehenden T_H2-vermittelten Entzündung der Lunge und einer erhöhten AHR einhergeht, würde man hier definitionsgemäß nicht von einer Influenza-Virus-vermittelten Asthma-Exazerbation in diesem Sinne sprechen. Daher sollte man in diesem Fall vielmehr von einem Mausmodell einer Asthma-Influenza-Virus-Komorbidität sprechen.

In beiden Modellen mit den unterschiedlichen Behandlungsprotokollen zeigte sich, dass nicht-infizierte Tiere (Gesundgruppe, PBS und Asthmagruppe, OVA) und auch die infizierten Tiere der geringen, sowie der mittleren Infektionsdosis (Infektionsgruppe, H1N1 und Exazerbationsgruppe, OVA+H1N1) den gesamten Beobachtungszeitraum überlebten. Lediglich infizierte Tiere beider Behandlungsgruppen der hohen Infektionsdosis starben aufgrund der Infektion innerhalb des Versuches. Hierbei fällt jedoch auf, dass die Tiere der Infektionsgruppe tendenziell früher versterben als die der Exazerbationsgruppe. Dies spiegelt sich auch bei der Betrachtung der Gewichtsverläufe der Mäuse wider. Für nicht-infizierte Mäuse konnte keine Gewichtsabnahme im Beobachtungszeitraum verzeichnet werden, wohingegen die infizierten Tiere abhängig von der Infektionsdosis an Gewicht abnahmen. Dabei zeigt sich, dass die infizierten asthmatischen Mäuse tendenziell weniger Gewicht verlieren als die infizierten gesunden Mäuse. Man könnte hier vermuten, dass der Infektionsverlauf in den Mäusen der Exazerbationsgruppe gegenüber den Mäusen der Infektionsgruppe weniger schwer ist, da der Gewichtsverlauf als Maß der Schwere der Infektion betrachtet wird.

Auch in anderen Arbeitsgruppen konnte diese geringere Gewichtsabnahme in asthmatischen Mäusen gegenüber nicht-asthmatischen Mäusen beobachtet werden. Dabei zeigt sich der geringere Gewichtsverlust sowohl in unterschiedlichen Mausstämmen wie C57BL/6, BALB/c, NC/Nga und mit unterschiedlichen Asthmaauslösern, wie OVA, verschiedenen Milben oder Pilzen und auch mit saisonalen und pandemischen Influenza A-Viren des Subtyps H1N1 mit unterschiedlichen Infektionsdosen bei einer vollständig etablierten allergischen Atemwegsentzündung mit nachfolgender Infektion.^{130–132,148–151} Die Modelle von Ravanetti et

al.¹¹⁹ und Li et al.¹⁵², die sich durch die Verwendung eines anderen Influenza A-Virus Subtyps H3N2 unterscheidet, hingegen zeigen ein umgekehrtes Bild. Hier haben die infizierten asthmatischen Mäuse einen höheren Gewichtsverlust gegenüber den nicht-asthmatischen Mäusen.^{119,152}

Allerdings zeigt sich anhand der viralen Titer in der Lunge in beiden Behandlungsprotokollen, dass die vermeintlich schwerere Infektion eine bessere Immunantwort und somit die Beseitigung der Viren auslöst. Es finden sich höhere virale Titer in den asthmatischen Mäusen im Vergleich zu den nicht-asthmatischen Mäusen. Gleiche Virustiter finden sich nur in einem weiteren Modell mit einem pandemischen H1N1-Virus¹⁵³ und dem bereits oben erwähnten H3N2-Virus bei Ravanetti et al.¹¹⁹. Die meisten anderen bereits publizierten Modelle zeigen gegenteilige Daten zur Viruslast.^{130,130–132,150,151,154} Diese Modelle propagieren eine Resistenz der asthmatischen Mäuse gegenüber dem Influenza-Virus beziehungsweise einem Immunprofil in den asthmatischen Mäusen, dass die Virusbeseitigung unterstützt.^{131,132,148,150}

Die Becherzellhyperplasie und Mukusproduktion in den infizierten asthmatischen Mäusen ist reduziert gegenüber den asthmatischen Mäusen, dies findet sich für beide Behandlungsprotokolle. Hierbei können der zytopathische Effekt sowie die Neuraminidase-Aktivität¹⁵⁵ der Influenza-Viren eine Rolle spielen. Sie könnten für die veränderte Epithelzusammensetzung durch eine extensive Schädigung des Epithels und die Auflösung des Mukus durch die Spaltung von Mucinen sorgen. Eine ebenfalls reduzierte Mukusproduktion in den infizierten asthmatischen Mäusen gegenüber den asthmatischen Mäusen zeigte auch An et al.¹³⁰. Die Mukusproduktion in anderen bereits veröffentlichten Modellen zeigen jedoch eine Erhöhung durch die Influenza-Virus-Infektion.^{120,149–151}

In den hier verwendeten Modellen hingegen bilden asthmatische Mäuse eine abgeschwächte anti-virale Immunantwort gegenüber dem Influenza-Virus aus. Das zeigt sich bei der Betrachtung der Entzündung in der Lunge über die Zellinfiltration und Mediatoren. Dabei ist zu erkennen, dass nach der erneuten Exposition gegenüber OVA es zu einer erhöhten Zellinfiltration in die Atemwege bei asthmatischen infizierten Mäusen im Gegensatz zu infizierten Mäusen kommt. Wenn keine erneute Exposition gegenüber OVA stattfand, wandern gleich viele Zellen in die Lungen von infizierten und asthmatischen infizierten Mäusen ein. Dabei sind in beiden Modellen die für die Bekämpfung der Infektion wichtigen Makrophagen, Neutrophilen und Lymphozyten in ihrer Anzahl in den infizierten asthmatischen Mäusen reduziert, gegenüber den infizierten Mäusen. Jedoch befinden sich in den Lungen der asthmatischen infizierten Tiere zusätzlich, die für die Asthmapathologie typischen Eosinophile.

Die erneute Exposition gegenüber dem OVA sorgt auch für eine erhöhte Zellinfiltration in die Lunge der asthmatischen Mäuse, die die Zellinfiltration aller anderen Gruppen übersteigt. Dies zeigt sich nicht bei dem Auslassen der zweiten OVA-Behandlung. Hier liegt die Zellinfiltration unter denen der Infektions- und Exazerbationsgruppen.

Im Vergleich mit bereits veröffentlichten Modellen zeigt sich, dass auch dort die Zellinfiltrationen der infizierten asthmatischen Tiere oftmals unter denen der nur infizierten beziehungsweise asthmatischen Mäuse liegen.^{120,132,149–151,153,156,157} Eine Ausnahme hierbei bildet wieder das Asthma-Infektionsmodell von Li et al.¹⁵² und Ravanetti et al.¹¹⁹. Hier zeigt sich für alle untersuchten Zellen in der Lunge die höchsten Zellzahlen in der Exazerbationsgruppe.¹¹⁹

Die erneute Exposition der Mäuse gegenüber dem OVA führt dazu, dass die T_H2-Zytokine, die pro-inflammatorischen Zytokine und das Chemokin KC/CXCL1 jeweils die höchste Produktion in der Asthmagruppe aufweisen. Lediglich die Produktion von IFN- γ ist in der Infektionsgruppe am höchsten, gefolgt von der Exazerbationsgruppe. Bei dem Modell mit fehlender erneuter Exposition gegenüber OVA findet sich ebenfalls die höchste Expression des T_H2-Transkriptionsfaktors GATA3, der die Expression und Produktion der T_H2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 steuert^{158–160}, sowie die Produktion der T_H2-Zytokine IL-4 und IL-13 in der Asthmagruppe. IL-5 hingegen zeigt die höchste Produktion in der Exazerbationsgruppe. Die pro-inflammatorischen Zytokine und auch IFN- γ weisen die höchste Konzentration in der Infektionsgruppe gefolgt von der Exazerbationsgruppe auf. Auch der T_H1-Transkriptionsfaktor T-bet, der die Expression und Produktion von IFN- γ in T_H1-Zellen reguliert¹⁶¹, wird am meisten in der Infektionsgruppe, gefolgt von der Exazerbationsgruppe, exprimiert. IL-17A und KC/CXCL1 zeigen jeweils die höchste Konzentration in der Asthmagruppe, gefolgt von der Infektionsgruppe und der Exazerbationsgruppe. Lediglich IL-10 zeigt in diesem Modell die höchste Konzentration in der Exazerbationsgruppe. Die Expression von TGF- β unterscheidet sich nicht zwischen den Behandlungsgruppen. Und auch die Expression des T_{reg}-Transkriptionsfaktors FoxP3, Aktivator von CTLA-4 aktiviert, einem inhibitorischen Ko-Stimulationsmolekül für T-Zellen wirkt¹⁶², und Suppressor der Transkriptionsfaktoren *nuclear factor of activated T cells* (NFAT) und *nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells* (NF κ B)^{162,163}, die für die Produktion verschiedener entzündungsfördernde Zytokine und Chemokine verantwortlich sind^{164–166}, unterscheidet sich zwischen der Asthmagruppe, der Infektionsgruppe und der Exazerbationsgruppe der jeweils hohen Infektionsdosis nicht. Allerdings zeigt die Expression von FoxP3 die höchste Expression in der

Exazerbationsgruppe der niedrigen Infektionsdosis, gefolgt von der Infektionsgruppe der niedrigen Infektionsdosis und der Asthmagruppe.

Nicht alle bisher veröffentlichten Modelle untersuchen immer das hier analysierte Spektrum an Mediatoren. Dennoch zeigt sich, dass IFN- γ oftmals die höchste Produktion beziehungsweise Expression in den Infektionsgruppen aufweist.^{120,130,132,151,153,154,156} Es zeigt sich, dass die T_H2- beziehungsweise pro-inflammatorischen Zytokine erniedrigt in der Exazerbationsgruppe im Vergleich mit der Asthmagruppe beziehungsweise der Infektionsgruppe sind.^{130,131,148,151,154,156} Nur Jaspers et al.¹⁵⁷ konnten erhöhte T_H2-Zytokine in Verbindung mit einer nachfolgenden Influenza A-Virus des Subtyps H1N1 bei asthmatischen Mäusen gegenüber nicht-infizierten Mäusen nachweisen.

Im Gegensatz dazu steht das Asthma-Infektionsmodell mit dem Influenza-Virus des Subtyps H3N2 von Ravanetti et al.¹¹⁹, bei dem alle untersuchten Mediatoren, darunter T_H2-, pro-inflammatorische, T_H1- und T_H17-Zytokine, sowie neutrophilotaktische und eosinophilotaktische Chemokine, jeweils die höchste Expression beziehungsweise Produktion in der Exazerbationsgruppe aufweisen.

Die beiden hier verwendeten Behandlungsprotokolle zeigen, dass in den Mäusen der Exazerbationsgruppe sowohl eine verminderte antivirale Immunität gegenüber dem Influenza-Virus besteht, zugleich aber auch die erneute Antwort gegen das Allergen OVA vermindert ist. Der genaue Mechanismus hierfür ist nicht klar, könnte jedoch durch eine gegenseitige Suppression von T_H1-vermittelten und T_H2-vermittelten Immunantworten bedingt sein. Ebenfalls möglich wäre, dass durch den vermehrten Mukus in den asthmatischen Mäusen zum Zeitpunkt der Infektion, die Infektion mit den Influenza-Viren verzögert beziehungsweise die Infektionsdosis durch den Mukus verringert wurde, da dieser den Zugang zu den entsprechenden Entry-Rezeptoren, Sialinsäuren die über α 2,6-Bindung an einen Zucker eines Glykoproteins auf der Zelloberfläche gebunden sind¹⁶⁷, des Influenza-Virus erschwert. Zusätzlich könnten bereits rekrutierte Zellen der angeborenen Immunität in den asthmatischen Mäusen, wie zum Beispiel die Eosinophilen^{168,169}, ebenfalls für eine verringerte Infektion mit Influenza beitragen. Eine weitere Möglichkeit für eine verminderte Infektion könnte die veränderte Zusammensetzung des Epitheliums mit den verschiedenen Zelltypen bei Asthma sein.¹⁷⁰ Da zilienträgenden Zellen die hauptsächlichen Träger der mit α 2,6-gebundenen Sialinsäure-Glykoproteinen sind¹⁷¹, wäre bei einer reduzierten Zahl zilienträgender Zellen im Epithelium bei Asthma somit auch die Anzahl der Rezeptoren für die Influenza-Viren erniedrigt. Aber auch eine Suppression sowohl der T_H2-Immunantwort als auch der T_H1-Immunantwort durch T_{reg}-Zellen wäre denkbar, da eine erhöhte Expression von FoxP3

zumindest in der Exazerbationsgruppe, die mit niedriger Infektionsdosis infiziert wurden, gezeigt wurde.

Abschließend lässt sich sagen, dass lediglich das Asthma Infektionsmodell mit dem Influenza A-Virus Subtyp H3N2 ein Exazerbationsmodell darstellt, in dem eine erhöhte AHR, eine erhöhte Entzündung mit Beteiligung von Neutrophilen und erhöhter T_H2-Immunantwort in den infizierten asthmatischen Mäusen gegenüber den nicht-infizierten asthmatischen Mäusen erreicht wird. Die Mukusproduktion wurde hier jedoch nicht untersucht.¹¹⁹ Alle Modelle, die einen Influenza A-Virus des Subtyps H1N1 verwendeten, konnten dies nicht erreichen, inklusive der hier verwendeten Modelle, und werden auch oftmals nicht als Exazerbationsmodell, sondern lediglich als Komorbiditätsmodell bezeichnet. Dabei ist der genaue Mechanismus der verminderten Immunität gegenüber dem Influenza A-Virus des Subtyps H1N1 nicht klar, da verschiedene Studien unterschiedliche Anhaltspunkte, z.B. TGF- β ¹⁴⁸ oder NK Zellen¹³¹, vermuten lassen. In den hier verwendeten Modellen konnten diese Hinweise jedoch nicht verifiziert werden.

Im Gegensatz dazu stellt man fest, dass Veröffentlichungen, die ihre Modelle als Influenza-Virus-induzierte Exazerbationsmodelle bezeichnen, entweder lediglich einen Aspekt der Exazerbation darstellen, z.B. erhöhte IgE Antikörper^{172,173}, oder zwar die typischen Merkmale wie erhöhte AHR, Mukusproduktion und T_H2-vermittelte Entzündung mit Beteiligung von Neutrophilen aufweisen. Aber bei der Betrachtung des Protokolls zeigt sich, dass die Infektion vor der Etablierung der allergischen Entzündung in der Lunge stattfand, sodass die Infektion keine bereits bestehende Erkrankung verschlimmern kann^{118,133,151,174}. Dies steht im Widerspruch zu der Definition einer Exazerbation und damit wird hier der Exazerbationsbegriff fälschlicherweise verwendet.

Nachdem keine Exazerbation experimentellen Asthmas mittels des Influenza A-Virus in Mäusen ausgelöst werden konnte, wurde das Respiratorische Syncytialvirus als weiteres, wichtiges, respiratorisches Virus als Exazerbationsauslöser in der klinischen Situation verwendet, um ein Mausmodell für die Respiratorisches Syncytialvirus-induzierte Exazerbation experimentellen Asthmas zu etablieren und charakterisieren (siehe Kapitel 3.2.3). In diesem Modell wurden die Auswirkungen des Infektionsverlaufes auf die Exazerbation anhand von drei Zeitpunkten nach der Infektion untersucht. Dabei handelt es sich um einen frühen Zeitpunkt (ein Tag nach der Infektion), dem Zeitpunkt der maximalen Virusreplikation (vier Tage nach der Infektion) und dem Zeitpunkt der Viruselimination (acht Tage nach der Infektion)¹⁷⁵.

Unabhängig von der Infektionsdosis konnte an allen Analysezeitpunkten eine erhöhte Mukusproduktion in den Exazerbationsgruppen im Vergleich mit der Asthmagruppe beobachtet werden. Eine erhöhte Entzündung in der Lunge im Hinblick auf die Zellinfiltration und die Expression und Produktion von Mediatoren konnte nur in der hohen Infektionsdosis einen und acht Tage nach der Infektion verzeichnet werden. Hierbei konnte die T_H2-vermittelte Immunantwort jedoch nicht gesteigert werden. Allerdings lassen sich gesteigerte Konzentrationen für einige pro-inflammatorische Mediatoren, sowie Typ I, Typ II und Typ III Interferone einen Tag nach der Infektion beobachten. Eine AHR ließ sich in keiner der Gruppen zu keinem Zeitpunkt durch Methacholin auslösen.

Daher stellt sich nun auch, wie bereits im Influenza-Virus-Modell, hier die Frage, ob es sich also in diesem Fall um ein Mausmodell für die Respiratorisches Syncytialvirus-induzierte Exazerbation experimentellen Astmas handelt. Da keine erhöhte Mukusproduktion, Entzündung der Lunge, Beteiligung von Neutrophilen an dieser Entzündung, sowie einer Erhöhung der bereits bestehenden T_H2-vermittelten Immunantwort und einer erhöhten AHR, gezeigt werden konnte, wäre es auch hier besser von einem Mausmodell einer Asthma-RSV-Komorbidity zu sprechen.

Wie bereits in dem Mausmodell einer Asthma-Influenza-Virus-Komorbidity wurde unter anderem das Überleben und die Gewichtsentwicklung betrachtet. Dabei konnte festgestellt werden, dass es lediglich zu kleineren Gewichtsschwankungen in allen Gruppen, unabhängig von der Infektionsdosis, kam und auch alle Tiere überlebt haben. In den meisten veröffentlichten Modellen werden keine Angaben zu einer Gewichtsentwicklung gemacht. Jedoch zeigt sich bei einem weiteren Modell von Aeffner et al.¹⁷⁵ in BALB/c Mäusen, in denen ebenfalls mittels OVA eine allergische Entzündung in der Lunge etabliert wird und anschließend mit einer Infektionsdosis von 1×10^6 pfu infiziert werden, keine Gewichtsveränderungen. Im Gegensatz dazu zeigt ebenfalls das BALB/c und OVA-basiertes Modell von Peebles et al.¹⁷⁶ einen signifikanten Gewichtsverlust in der Infektionsgruppe und der Exazerbationsgruppe gegenüber der Asthmagruppe und der Gesundgruppe. In einem BALB/c und HDM-basierten Modell von Mori et al.¹²⁰ hingegen zeigt sich ein Gewichtsverlust nur für die nicht-infizierten HDM-behandelten Mäuse. In allen hier auch nachfolgend genannten Veröffentlichungen wurden hohe Infektionsdosen zwischen 1×10^5 und 1×10^7 verwendet.

Interessanterweise zeigt sich nur einen Tag beziehungsweise acht Tage nach der Infektion und nur für die Exazerbationsgruppe der hohen Infektionsdosis eine erhöhte Infiltration an Zellen in das Lungenlumen im Vergleich mit der Asthmagruppe. Jedoch sind die Zellzahlen der

infiltrierenden Zellen erwartungsgemäß acht Tage nach der Infektion etwas mehr als halbiert im Vergleich zu einem Tag nach der Infektion. Auch bei der Betrachtung der Zelltypen zeigt sich tendenziell das gleiche Bild ein Tag beziehungsweise acht Tage nach der Infektion. Dabei sind jeweils die Eosinophile und Neutrophile signifikant erhöht und die Lymphozyten zusätzlich auch tendenziell erhöht in der Exazerbationsgruppe der hohen Infektionsdosis gegenüber der Asthmagruppe. Auch das C57BL/6 und *A. fumigatus*-basierte Modell von Shibata et al.¹⁷⁷ und mehrere veröffentlichte BALB/c und OVA-basierte Modelle zeigen eine erhöhte Infiltration von Leukozyten in die Lunge von Infizierten asthmatischen Mäusen gegenüber nicht-infizierten asthmatischen Mäusen.^{176,178–185} Davon zeigen die Modelle von Mäkelä et al.¹⁸⁰ und Wang et al.¹⁸⁵ auch jeweils erhöhte Zahlen von Eosinophilen und Neutrophilen in der Exazerbationsgruppe gegenüber der Asthmagruppe. Jiang et al.¹⁷⁸ und Tourdot et al.¹⁸⁴ wiederum verzeichnen eine gleichbleibende Anzahl an Eosinophilen in der Asthmagruppe und Exazerbationsgruppe und Jiang et al.¹⁷⁸ eine steigende und Tourdot et al.¹⁸⁴ eine geringere Anzahl von Neutrophilen in der Exazerbationsgruppe gegenüber der Asthmagruppe. Geringere Eosinophilenzahlen, aber erhöhte Neutrophilenzahlen in der Exazerbationsgruppe gegenüber der Asthmagruppe finden sich bei Lai et al.¹⁷⁹, Nguyen et al.^{181,182} und Peebles et al.¹⁷⁶. In dem Modell von Mori et al.¹²⁰ zeigen sich keine Unterschiede in der Leukozyteninfiltration in die Lunge der Asthmagruppe und Exazerbationsgruppe, allerdings sind die Eosinophilenzahl erniedrigt und die Neutrophilenzahl erhöht in der Exazerbationsgruppe gegenüber der Asthmagruppe. Im Gegensatz dazu zeigen Ishioka et al.¹⁸⁶ und Ju et al.¹⁸⁷ eine erniedrigte Leukozyteninfiltration mit erniedrigter Eosinophilenzahl und unveränderter beziehungsweise erhöhter Neutrophilenzahl. Und Aeffner et al.¹⁷⁵ zeigen, dass die Infektion mit RSV die Zellinfiltration in den asthmatischen Mäusen signifikant erniedrigt ist.

Die Anzahl an Becherzellen und die Menge des produzierten Mukus in den Atemwegen ist in den Exazerbationsgruppen beider Infektionsdosen gegenüber der Asthmagruppe sowohl einen Tag als auch acht Tage nach der Infektion erhöht. Einen Unterschied in der Mukusmenge pro Becherzelle ist jedoch in allen drei Gruppen zu keinem Zeitpunkt zu verzeichnen. Eine erhöhte Mukusproduktion in infizierten asthmatischen Mäusen gegenüber nicht-infizierten asthmatischen Tieren konnte ebenfalls in OVA-, HDM- und *A. fumigatus*-basierten Modellen in der BALB/c- beziehungsweise der C57BL/6-Maus gezeigt werden^{120,129,176–178,180,185,188,189}. Keinen Unterschied hingegen in der Mukusproduktion im Vergleich der infizierten asthmatischen und nicht-infizierten asthmatischen Tiere verzeichnen Aeffner et al.¹⁷⁵ und Nguyen et al.¹⁸³.

Eine AHR, bestimmt über den spezifischen Atemwegswiderstand während einer Methacholinprovokation, konnte in keiner Behandlungsgruppe zu keinem der untersuchten Zeitpunkte gemessen werden. In der Literatur zeigt sich ein gemischtes Bild, da hier sowohl eine erniedrigte^{175,176,187} aber auch eine erhöhte^{122,177,178,180–183,185,186,188,190} AHR für die infizierten asthmatischen Mäuse im Vergleich mit nicht-infizierten asthmatischen Mäusen gezeigt wird. Dabei ist dies unabhängig vom grundlegenden Modell. Kondo et al.¹²² zeigen zusätzlich, dass eine niedrige Dosis von 5×10^3 pfu nicht für eine Auslösung einer AHR ausreicht.

Bei der Expression und Produktion von Transkriptionsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen zeigt sich ein sehr gemischtes und nicht eindeutiges Bild. So ist zwar die Expression des T_H2-Transkriptionsfaktors GATA3 erhöht, die Produktion der T_H2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, sowie die Expression von TARC/CCL17, IL-33 und TGF- β und Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α und IL-17A und IL-10 und die Chemokine Eotaxin-1/CCL11 und RANTES/CCL5 erniedrigt in der Exazerbationsgruppe im Vergleich mit der Asthmagruppe. Eine Erniedrigung der T_H2-Zytokine, allerdings in Verbindung mit einer Erhöhung von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen zeigen Hashimoto et al.¹²⁹, Ishioka et al.¹⁸⁶, Peebles et al.¹⁸⁸ und Tourdot et al.¹⁸⁴. Erhöhte T_H2- und pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine hingegen weisen die Modelle von Jiang et al.¹⁷⁸, Ju et al.¹⁸⁷, Kondo et al.¹²², Lai et al.¹⁷⁹, Mäkelä et al.¹⁸⁰, Matsuse et al.¹²³, Mori et al.¹²⁰, Nguyen et al.^{181–183}, Schaller et al.¹⁹⁰, Shibata et al.¹⁷⁷ und Wang et al.¹⁸⁵ auf.

Der T_H1-Transkriptionsfaktor T-bet ist in der Exazerbationsgruppe erhöht gegenüber der Infektionsgruppe und Asthmagruppe, aber auch hier ist die Produktion des T_H1-Zytokins IFN- γ erniedrigt in der Exazerbationsgruppe gegenüber der Infektionsgruppe, ebenso die Produktion und Expression der Chemokine KC/CXCL1 beziehungsweise IP-10/CXCL10. Die meisten publizierten Modelle zeigen ebenfalls eine erniedrigte Konzentration beziehungsweise Expression von IFN- γ . Allerdings, sofern untersucht, eine erhöhte Konzentration beziehungsweise Expression von KC/CXCL1 in der Exazerbationsgruppe im Vergleich zur Infektionsgruppe.^{120,122,123,129,178–180,182–184,186} Erhöhte Expression beziehungsweise Konzentrationen von IFN- γ in der Exazerbationsgruppe im Vergleich mit der Infektionsgruppe weisen die Modelle von Ju et al.¹⁸⁷, Peebles et al.¹⁸⁸ und Schaller et al.¹⁹⁰ auf.

Die Typ I Interferone IFN- α , IFN- β und der Transkriptionsfaktor für Typ I Interferone IRF7 hingegen sind in der Expression und Produktion erhöht in der Exazerbationsgruppe im Vergleich mit der Infektionsgruppe. Die Typ I Interferone wurden nur in einem weiteren Modell untersucht und zeigen dort eine erniedrigte Produktion in der Exazerbationsgruppe im

Vergleich mit der Infektionsgruppe auf, die Expression von IRF7 ist jedoch im Gegensatz dazu erhöht.¹⁷⁹

Der Transkriptionsfaktor der regulatorischen T-Zellen FoxP3 ist in der Exazerbationsgruppe sowohl im Vergleich mit der Infektionsgruppe als auch der Asthmagruppe erhöht. Acht Tage nach der Infektion gleicht sich die Expression in der Exazerbationsgruppe der hohen Infektionsdosis und der Asthmagruppe an.

Der Virustiter in der Lunge ließ sich nur an Tag vier, dem Tag des Replikationsmaximums, und auch nur in der hohen Infektionsdosis messen. Dabei liegt der Virustiter in der Infektionsgruppe tendenziell höher als in der Exazerbationsgruppe. Dies passt jedoch zu den erhöhten anti-viralen und pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktoren, Interferonen und Zytokinen in den infizierten asthmatischen Mäusen gegenüber den infizierten gesunden Mäusen. In der Literatur hingegen sind gegenteilige Ergebnisse zu finden. So ist bei Lai et al.¹⁷⁹, Mukherjee et al.¹⁸⁹ und Nguyen et al.¹⁸² die Viruslast in den infizierten asthmatischen Mäusen höher als die der gesunden infizierten Tiere. Aeffner et al.¹⁷⁵ und Peebles et al.¹⁷⁶ konnten keine Unterschiede in der Viruslast von infizierten gesunden und infizierten asthmatischen Mäusen aufzeigen.

All das steht im Gegensatz zu dem Zeitpunkt vier Tage nach der Infektion. Hier konnte weder für die Entzündung der Lunge im Hinblick auf die Zellinfiltration und die Expression und Produktion von Transkriptionsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen, die Becherzellhyperplasie, sowie die AHR eine Verschlimmerung in den Exazerbationsgruppen im Vergleich zur Asthmagruppe erreicht werden. Da sich bei der Zellinfiltration in die Lunge in der Asthmagruppe die höchste in diesem Modell bestimmte Zellzahl auffindet, stellt sich die Frage ob es Unterschiede in der Etablierung der OVA-vermittelten Entzündung in der Lunge gegeben hat. Es konnte eine gesteigerte Expression beziehungsweise Produktion von T-bet, Typ I und Typ II Interferonen, IP-10/CXCL10, sämtlicher untersuchter pro-inflammatorischer Zytokine (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL17A und TNF), sowie dem Chemokin KC/CXCL1 in der Asthmagruppe nachgewiesen werden. Das wirft die Frage auf, ob in einem der beiden Versuche in dieser Behandlungsgruppe Mäuse unbeabsichtigt durch eine andere Substanz (eventuell LPS) oder einen anderen nicht bekannten Erreger diese Immunantworten ausgelöst wurden.

Des Weiteren scheinen sowohl die hier verwendete geringe als auch die hohe Infektionsdosis, zu gering zu sein, um eine Erkrankung in der Maus und somit eine Exazerbation der bereits bestehenden Pathologie der asthmatischen Entzündung in der Lunge auszulösen. Dies liegt wahrscheinlich an dem generellen Problem, dass die Pathogenität des RSV für Mäuse gering ist und somit die Epithelzellen der Mäuse nur geringfügig infizieren, nur sehr limitiert in den Zellen der Mäuse replizieren, und sich auch nicht von den oberen in die unteren Atemwege

ausbreiten.^{191,192} Dennoch scheint die Infektion der Epithelzellen in den asthmatischen Mäusen geringfügig erleichtert zu sein, da dort die induzierten anti-viralen Immunantworten höher ausfallen als in den gesunden infizierten Mäusen. Dies könnte an dem bereits vorgeschädigten Epithel der asthmatischen Mäuse liegen, sodass der Eintritt trotz dickerer Mukusschicht besser möglich ist. Dennoch reicht die Infektionsdosis beziehungsweise die Pathogenität nicht aus um eine Exazerbation der bereits bestehenden allergischen Atemwegsentzündung auszulösen.

Abschließend lässt sich aber auch hier feststellen, dass es nur zwei veröffentlichte Modelle gibt, die alle Charakteristika einer virusinduzierten Asthma-Exazerbation von Patienten widerspiegelt. Dabei bezeichnen Mäkelä et al.¹⁸⁰ selbst das Modell nicht als Exazerbationsmodell im Gegensatz zu Wang et al.¹⁸⁵ die hier auch den Begriff für ihr Modell richtigerweise verwenden. Ein weiteres Modell von Nguyen et al.¹⁸¹⁻¹⁸³ zeigt prinzipiell auch alle Charakteristika der Exazerbation, außer die weiterhin erhöhten Eosinophileninfiltration in der Lunge, und bezeichnen ihr Modell ebenfalls als Exazerbationsmodell. Andere Publikationen hingegen bilden nur einige Charakteristika ab, geben über die übrigen auch keine Auskunft und nennen dennoch ihr Modell Exazerbationsmodell.^{177,189,190} Auch hier gibt es wiederum solche Publikationen, die typische Merkmale wie erhöhte AHR, Mukusproduktion und T_H2-vermittelte Entzündung mit Beteiligung von Neutrophilen aufweisen, aber bei Betrachtung des Protokolls zeigt sich, dass die Infektion vor der Etablierung der allergischen Entzündung in der Lunge stattfand, sodass die Infektion keine bereits bestehende Erkrankung verschlimmern kann.^{117,193,194} Dies steht im Widerspruch zu der Definition einer Exazerbation und damit wird der Exazerbationsbegriff hier fälschlicherweise verwendet. Die Mehrheit der veröffentlichten Modelle, die hier aufgeführt wurden, konnten nicht alle Charakteristika der virusinduzierten Asthma-Exazerbation darstellen und bezeichnen sich folgerichtig als Mausmodell einer Asthma-RSV-Komorbidität.^{120,122,123,129,175,176,178,179,184,186-188}

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass es mithilfe des poly(I:C)-vermittelten Asthma Exazerbationsmodells gelingt, eine Zeitkinetik der für die Exazerbation verantwortlichen Immunantworten darzustellen. Es zeigt sich, dass die Exazerbation in diesem Modell wohl aus einer Kombination von frühen anti-viralen und asthmatischen Immunantworten entsteht. Neben den Eosinophilen spielen demnach vor allen Dingen Neutrophile, sowie Typ I, Typ II und Typ III Interferone, T_H2-Zytokine, pro-inflammatorische Zytokine (IL-1 α , IL-1 β , IL6, IL-17A und TNF) und die Chemokine Eotaxin-1/CCL11 und KC/CXCL1 eine Rolle.

Aus diesen Daten lässt sich eine mögliche Kombination von Mediatoren, IL-6 zusammen mit TNF, KC/CXCL1, IL-5 und IFN- λ 3, bestimmen, die als Markerprofil dienen könnte, um somit eine Exazerbation frühzeitig zu erkennen oder sogar voraussagen. Dies ist jedoch nur bei regelmäßiger Überprüfung, etwa im Rhythmus des täglichen Zähneputzens, zum Beispiel im Speichel, möglich. Jedoch müssen die hier erhobenen Daten noch durch Patientendaten verifiziert werden.

Weiterhin zeigt sich, dass die hier verwendeten Protokolle zur Etablierung von Tiermodellen für die virusinduzierte Exazerbation experimentellen Asthmas sowohl bei Verwendung des Influenza A-Virus als auch des RSV nicht alle Aspekte einer virusinduzierten Exazerbation von Asthmapatienten aufweisen. Es kann somit nur eine Asthma-Virus-Komorbidität darstellen.

6 Literatur

1. Soriano, J. B. *et al.* Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet Respiratory Medicine* **5**, 691–706 (2017).
2. European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI). Global Atlas of Asthma. https://www.eaaci.org/GlobalAtlas/Global_Atlas_of_Asthma.pdf.
3. Masoli, M., Fabian, D., Holt, S., Beasley, R. & Global Initiative for Asthma (GINA) Program. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. *Allergy* **59**, 469–478 (2004).
4. Nunes, C., Pereira, A. M. & Morais-Almeida, M. Asthma costs and social impact. *Asthma Research and Practice* **3**, (2017).
5. World Health Organization. Cause-specific mortality - Global summary estimates. https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/.
6. Böcking, C., Renz, H. & Pfefferle, P. I. Prävalenz und sozioökonomische Bedeutung von Allergien in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* **55**, 303–307 (2012).
7. European Respiratory Society. European Lung White Book. <https://www.erswhitebook.org/>.
8. Barnett, S. B. L. & Nurmagambetov, T. A. Costs of asthma in the United States: 2002–2007. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **127**, 145–152 (2011).
9. Global Initiative for Asthma (GINA). Global Strategy for Asthma Management and Prevention - 2018 Update. <https://ginasthma.org/2018-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention/>.
10. Global Initiative for Asthma (GINA). Leitfaden zum Management und zur Prävention von Asthma - Die GINA-Leitlinien. <https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2016/09/WMS-German-Pocket-Guide-GINA-2016-1.pdf>.
11. Mims, J. W. Asthma: definitions and pathophysiology: Asthma: definitions and pathophysiology. *International Forum of Allergy & Rhinology* **5**, S2–S6 (2015).
12. Fehrenbach, H., Wagner, C. & Wegmann, M. Airway remodeling in asthma: what really matters. *Cell and Tissue Research* **367**, 551–569 (2017).
13. Rackemann, F. M. A working classification of asthma. *Am. J. Med.* **3**, 601–606 (1947).

14. Johansson, S. G. *et al.* A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* **56**, 813–824 (2001).
15. Kuruvilla, M. E., Lee, F. E.-H. & Lee, G. B. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* (2018) doi:10.1007/s12016-018-8712-1.
16. Lötvall, J. *et al.* Asthma endotypes: A new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **127**, 355–360 (2011).
17. Wenzel, S. E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nature Medicine* **18**, 716–725 (2012).
18. Fajt, M. L. & Wenzel, S. E. Asthma phenotypes and the use of biologic medications in asthma and allergic disease: The next steps toward personalized care. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **135**, 299–310 (2015).
19. Haldar, P. *et al.* Cluster Analysis and Clinical Asthma Phenotypes. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **178**, 218–224 (2008).
20. Moore, W. C. *et al.* Identification of Asthma Phenotypes Using Cluster Analysis in the Severe Asthma Research Program. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **181**, 315–323 (2010).
21. Anderson, G. P. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *The Lancet* **372**, 1107–1119 (2008).
22. Fahy, J. V. Type 2 inflammation in asthma — present in most, absent in many. *Nature Reviews Immunology* **15**, 57–65 (2015).
23. Hekking, P.-P. W. & Bel, E. H. Developing and Emerging Clinical Asthma Phenotypes. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* **2**, 671–680 (2014).
24. Holgate, S. T. *et al.* Asthma. *Nature Reviews Disease Primers* 15025 (2015) doi:10.1038/nrdp.2015.25.
25. Woodruff, P. G. *et al.* T-helper Type 2–driven Inflammation Defines Major Subphenotypes of Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **180**, 388–395 (2009).
26. Holt, P. G., Macaubas, C., Stumbles, P. A. & Sly, P. D. The role of allergy in the development of asthma. *Nature* **402**, B12-17 (1999).
27. Kay, A. B. Allergy and Allergic Diseases. *N Engl J Med* **344**, 30–37 (2001).
28. Holgate, S. T. Pathogenesis of Asthma. *Clin Exp Allergy* **38**, 872–897 (2008).

29. Sporik, R., Holgate, S. T., Platts-Mills, T. A. E. & Cogswell, J. J. Exposure to House-Dust Mite Allergen (*Der p I*) and the Development of Asthma in Childhood: A Prospective Study. *New England Journal of Medicine* **323**, 502–507 (1990).
30. Permaul, P. *et al.* Allergens in urban schools and homes of children with asthma: Allergens in urban schools and homes of children. *Pediatric Allergy and Immunology* **23**, 543–549 (2012).
31. Olivieri, M. *et al.* Risk factors for new-onset cat sensitization among adults: A population-based international cohort study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **129**, 420–425 (2012).
32. Jeong, S. K. *et al.* Mite and Cockroach Allergens Activate Protease-Activated Receptor 2 and Delay Epidermal Permeability Barrier Recovery. *Journal of Investigative Dermatology* **128**, 1930–1939 (2008).
33. Wan, H. *et al.* The transmembrane protein occludin of epithelial tight junctions is a functional target for serine peptidases from faecal pellets of *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy* **31**, 279–294 (2001).
34. Wan, H. *et al.* *Der p 1* facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J. Clin. Invest.* **104**, 123–133 (1999).
35. Takai, T. & Ikeda, S. Barrier Dysfunction Caused by Environmental Proteases in the Pathogenesis of Allergic Diseases. *Allergology International* **60**, 25–35 (2011).
36. Gon, Y. & Hashimoto, S. Role of airway epithelial barrier dysfunction in pathogenesis of asthma. *Allergology International* **67**, 12–17 (2018).
37. Herrick, C. A. & Bottomly, K. To respond or not to respond: T cells in allergic asthma. *Nat Rev Immunol* **3**, 405–412 (2003).
38. Galli, S. J., Tsai, M. & Piliponsky, A. M. The development of allergic inflammation. *Nature* **454**, 445–454 (2008).
39. Cookson, W. The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. *Nat Rev Immunol* **4**, 978–988 (2004).
40. Sandilands, A., Smith, F. J. D., Irvine, A. D. & Irwin McLean, W. H. Filaggrin’s Fuller Figure: A Glimpse into the Genetic Architecture of Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology* **127**, 1282–1284 (2007).
41. Allakhverdi, Z. *et al.* Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells. *J Exp Med* **204**, 253–258 (2007).

42. Ying, S. *et al.* Thymic Stromal Lymphopoietin Expression Is Increased in Asthmatic Airways and Correlates with Expression of Th2-Attracting Chemokines and Disease Severity. *J Immunol* **174**, 8183–8190 (2005).
43. Liu, Y.-J. Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation. *J Exp Med* **203**, 269–273 (2006).
44. Mitchell, P. D. & O’Byrne, P. M. Epithelial-Derived Cytokines in Asthma. *Chest* **151**, 1338–1344 (2017).
45. Kowalski, M. L. *et al.* Association of stem cell factor expression in nasal polyp epithelial cells with aspirin sensitivity and asthma. *Allergy* **60**, 631–637 (2005).
46. Reber, L., Da Silva, C. A. & Frossard, N. Stem cell factor and its receptor c-Kit as targets for inflammatory diseases. *European Journal of Pharmacology* **533**, 327–340 (2006).
47. Pease, J. E. & Williams, T. J. Eotaxin and asthma. *Curr Opin Pharmacol* **1**, 248–253 (2001).
48. Komiya, A. *et al.* Concerted expression of eotaxin-1, eotaxin-2, and eotaxin-3 in human bronchial epithelial cells. *Cellular Immunology* **225**, 91–100 (2003).
49. Claudio, E. *et al.* IL-25 Orchestrates Activation of Th Cells via Conventional Dendritic Cells in Tissue to Exacerbate Chronic House Dust Mite–Induced Asthma Pathology. *J.I. jii1900254* (2019) doi:10.4049/jimmunol.1900254.
50. Cayrol, C. & Girard, J.-P. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. *Immunol Rev* **281**, 154–168 (2018).
51. Porsbjerg, C. *et al.* IL-33 is related to innate immune activation and sensitization to HDM in mild steroid-free asthma. *Clin Exp Allergy* **46**, 564–574 (2016).
52. Barnes, P. J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nature Reviews Immunology* **8**, 183–192 (2008).
53. Sousa, A. R., Poston, R. N., Lane, S. J., Nakhosteen, J. A. & Lee, T. H. Detection of GM-CSF in Asthmatic Bronchial Epithelium and Decrease by Inhaled Corticosteroids. *Am Rev Respir Dis* **147**, 1557–1561 (1993).
54. Soloperto, M., Mattoso, V. L., Fasoli, A. & Mattoli, S. A bronchial epithelial cell-derived factor in asthma that promotes eosinophil activation and survival as GM-CSF. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **260**, L530–L538 (1991).
55. Barnes, P. Role of GATA-3 in Allergic Diseases. *CMM* **8**, 330–334 (2008).
56. Ho, I.-C. & Pai, S.-Y. GATA-3 - not just for Th2 cells anymore. *Cell. Mol. Immunol.* **4**, 15–29 (2007).

57. Kay, A. B. The Role of T Lymphocytes in Asthma. in *Chemical Immunology and Allergy* (ed. Cramer, R.) 59–75 (KARGER, 2006). doi:10.1159/000090230.
58. Marone, G., Triggiani, M., Genovese, A. & Paulis, A. D. Role of Human Mast Cells and Basophils in Bronchial Asthma. in *Advances in Immunology* vol. 88 97–160 (Elsevier, 2005).
59. Brown, J. M., Wilson, T. M. & Metcalfe, D. D. The mast cell and allergic diseases: role in pathogenesis and implications for therapy. *Clin Exp Allergy* **0**, 071124112032002-??? (2007).
60. Hogan, S. P. *et al.* Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease. *Clin Exp Allergy* **38**, 709–750 (2008).
61. Fulkerson, P. C. & Rothenberg, M. E. Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 117–129 (2013).
62. O’Sullivan, J. A. & Bochner, B. S. Eosinophils and eosinophil-associated diseases: An update. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **141**, 505–517 (2018).
63. Jacobsen, E. A., Taranova, A. G., Lee, N. A. & Lee, J. J. Eosinophils: Singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation? *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **119**, 1313–1320 (2007).
64. Barnes, P. J. Therapeutic strategies for allergic diseases. *Nature* **402**, B31-38 (1999).
65. McCracken, J. L., Veeranki, S. P., Ameredes, B. T. & Calhoun, W. J. Diagnosis and Management of Asthma in Adults: A Review. *JAMA* **318**, 279 (2017).
66. Aalbers, R., Vogelmeier, C. & Kuna, P. Achieving asthma control with ICS/LABA: A review of strategies for asthma management and prevention. *Respiratory Medicine* **111**, 1–7 (2016).
67. Bosnjak, B., Stelzmueller, B., Erb, K. J. & Epstein, M. M. Treatment of allergic asthma: Modulation of Th2 cells and their responses. *Respir Res* **12**, 114 (2011).
68. Hansbro, P. M., Kaiko, G. E. & Foster, P. S. Cytokine/anti-cytokine therapy - novel treatments for asthma?: Anti-cytokine asthma therapies. *British Journal of Pharmacology* **163**, 81–95 (2011).
69. McCracken, J. L., Tripple, J. W. & Calhoun, W. J. Biologic therapy in the management of asthma: *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **16**, 375–382 (2016).
70. Jackson, D. J., Sykes, A., Mallia, P. & Johnston, S. L. Asthma exacerbations: Origin, effect, and prevention. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **128**, 1165–1174 (2011).

71. Lane, S., Molina, J. & Plusa, T. An international observational prospective study to determine the Cost Of Asthma eXacerbations (COAX). *Respiratory Medicine* **100**, 434–450 (2006).
72. Ivanova, J. I. *et al.* Effect of asthma exacerbations on health care costs among asthmatic patients with moderate and severe persistent asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **129**, 1229–1235 (2012).
73. Rennard, S. I. Exacerbations and Progression of Disease in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proceedings of the American Thoracic Society* **1**, 88–92 (2004).
74. Reddel, H. K. *et al.* An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Asthma Control and Exacerbations: Standardizing Endpoints for Clinical Asthma Trials and Clinical Practice. *Am J Respir Crit Care Med* **180**, 59–99 (2009).
75. Bousquet, J. *et al.* The effect of treatment with omalizumab, an anti-IgE antibody, on asthma exacerbations and emergency medical visits in patients with severe persistent asthma. *Allergy* **60**, 302–308 (2005).
76. Haldar, P. *et al.* Mepolizumab and Exacerbations of Refractory Eosinophilic Asthma. *N Engl J Med* **360**, 973–984 (2009).
77. Singh, A. M. & Busse, W. W. Asthma exacerbations {middle dot} 2: Aetiology. *Thorax* **61**, 809–816 (2006).
78. Sears, M. R. Epidemiology of asthma exacerbations. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **122**, 662–668 (2008).
79. Gautier, C. & Charpin, D. Environmental triggers and avoidance in the management of asthma. *JAA Volume10*, 47–56 (2017).
80. Murphy, V. E. Managing asthma in pregnancy. *Breathe* **11**, 258–267 (2015).
81. Vatti, R. R. & Teuber, S. S. Asthma and Pregnancy. *Clinic Rev Allerg Immunol* **43**, 45–56 (2012).
82. Ulrik, C. & Ali. Incidence and risk factors for exacerbations of asthma during pregnancy. *JAA* 53 (2013) doi:10.2147/JAA.S43183.
83. Chen, E. & Miller, G. E. Stress and inflammation in exacerbations of asthma. *Brain, Behavior, and Immunity* **21**, 993–999 (2007).
84. Joachim, R. A. *et al.* Stress Enhances Airway Reactivity and Airway Inflammation in an Animal Model of Allergic Bronchial Asthma: *Psychosomatic Medicine* **65**, 811–815 (2003).

85. Johnston, S. L. *et al.* Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ* **310**, 1225–1229 (1995).
86. Nicholson, K. G., Kent, J. & Ireland, D. C. Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *BMJ* **307**, 982–986 (1993).
87. Iikura, M. *et al.* The Importance of Bacterial and Viral Infections Associated with Adult Asthma Exacerbations in Clinical Practice. *PLoS ONE* **10**, e0123584 (2015).
88. Edwards, M. R., Bartlett, N. W., Hussell, T., Openshaw, P. & Johnston, S. L. The microbiology of asthma. *Nat Rev Microbiol* **10**, 459–471 (2012).
89. Costa, L. D. C., Costa, P. S. & Camargos, P. A. M. Exacerbation of asthma and airway infection: is the virus the villain? *Jornal de Pediatria* **90**, 542–555 (2014).
90. Dunn, J. J. & Miller, M. B. Emerging Respiratory Viruses Other than Influenza. *Clinics in Laboratory Medicine* **34**, 409–430 (2014).
91. Jacobs, S. E., Lamson, D. M., St. George, K. & Walsh, T. J. Human Rhinoviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**, 135–162 (2013).
92. Brown, E. G. Influenza virus genetics. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **54**, 196–209 (2000).
93. Fehr, A. R. & Perlman, S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. in *Coronaviruses* (eds. Maier, H. J., Bickerton, E. & Britton, P.) vol. 1282 1–23 (Springer New York, 2015).
94. Branche, A. & Falsey, A. Parainfluenza Virus Infection. *Semin Respir Crit Care Med* **37**, 538–554 (2016).
95. Borchers, A. T., Chang, C., Gershwin, M. E. & Gershwin, L. J. Respiratory Syncytial Virus—A Comprehensive Review. *Clinic Rev Allerg Immunol* **45**, 331–379 (2013).
96. Kim, J. I. *et al.* Genome-Wide Analysis of Human Metapneumovirus Evolution. *PLoS ONE* **11**, e0152962 (2016).
97. Karpus, O. N., Heutinck, K. M., Wijnker, P. J. M., Tak, P. P. & Hamann, J. Triggering of the dsRNA Sensors TLR3, MDA5, and RIG-I Induces CD55 Expression in Synovial Fibroblasts. *PLoS ONE* **7**, e35606 (2012).
98. Wang, Q. *et al.* Role of double-stranded RNA pattern recognition receptors in rhinovirus-induced airway epithelial cell responses. *J. Immunol.* **183**, 6989–6997 (2009).
99. Fahy, J. V., Kim, K. W., Liu, J. & Boushey, H. A. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **95**, 843–852 (1995).

100. Friedlander, S. L. & Busse, W. W. The role of rhinovirus in asthma exacerbations. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **116**, 267–273 (2005).
101. Corne, J. M. *et al.* The Relationship between Atopic Status and IL-10 Nasal Lavage Levels in the Acute and Persistent Inflammatory Response to Upper Respiratory Tract Infection. *Am J Respir Crit Care Med* **163**, 1101–1107 (2001).
102. Papadopoulos, N. G. A defective type 1 response to rhinovirus in atopic asthma. *Thorax* **57**, 328–332 (2002).
103. Wark, P. A. B. *et al.* Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. *J Exp Med* **201**, 937–947 (2005).
104. Aoyagi, M., Shimojo, N., Sekine, K., Nishimuta, T. & Kohno, Y. Respiratory syncytial virus infection suppresses IFN-gamma production of gammadelta T cells. *Clin Exp Immunol* **131**, 312–317 (2003).
105. Dahl, M. E., Dabbagh, K., Liggitt, D., Kim, S. & Lewis, D. B. Viral-induced T helper type 1 responses enhance allergic disease by effects on lung dendritic cells. *Nature Immunology* **5**, 337–343 (2004).
106. Teran, L. M. *et al.* RANTES, Macrophage-Inhibitory Protein 1 α , and the Eosinophil Product Major Basic Protein Are Released into Upper Respiratory Secretions during Virus-Induced Asthma Exacerbations in Children. *J INFECT DIS* **179**, 677–681 (1999).
107. Kawaguchi, M. *et al.* Expression of Eotaxin by Normal Airway Epithelial Cells after Influenza Virus A Infection. *Int Arch Allergy Immunol* **122**, 44–49 (2000).
108. Jiang, D., Schaefer, N. & Chu, H. W. Air–Liquid Interface Culture of Human and Mouse Airway Epithelial Cells. in *Lung Innate Immunity and Inflammation* (eds. Alper, S. & Janssen, W. J.) vol. 1809 91–109 (Springer New York, 2018).
109. Holmes, A. M., Solari, R. & Holgate, S. T. Animal models of asthma: value, limitations and opportunities for alternative approaches. *Drug Discovery Today* **16**, 659–670 (2011).
110. Nials, A. T. & Uddin, S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Disease Models and Mechanisms* **1**, 213–220 (2008).
111. Kumar, R. K., Herbert, C. & Foster, P. S. The “classical” ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Current drug targets* **9**, 485–494 (2008).
112. Bartlett, N. W. *et al.* Mouse models of rhinovirus-induced disease and exacerbation of allergic airway inflammation. *Nature Medicine* **14**, 199–204 (2008).
113. Domachowske, J. B., Bonville, C. A. & Rosenberg, H. F. Animal Models for Studying Respiratory Syncytial Virus Infection and Its Long Term Effects on Lung Function: *The Pediatric Infectious Disease Journal* **23**, S228–S234 (2004).

114. Bem, R. A., Domachowske, J. B. & Rosenberg, H. F. Animal models of human respiratory syncytial virus disease. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* **301**, L148–L156 (2011).
115. Matsuoka, Y., Lamirande, E. W. & Subbarao, K. The Mouse Model for Influenza. in *Current Protocols in Microbiology* (eds. Coico, R., McBride, A., Quarles, J. M., Stevenson, B. & Taylor, R. K.) 15G.3.1-15G.3.30 (John Wiley & Sons, Inc., 2009). doi:10.1002/9780471729259.mc15g03s13.
116. John, A. E., Berlin, A. A. & Lukacs, N. W. Respiratory syncytial virus-induced CCL5/RANTES contributes to exacerbation of allergic airway inflammation. *Eur. J. Immunol.* **33**, 1677–1685 (2003).
117. Khaitov, M. R. *et al.* Small Interfering RNAs Targeted to Interleukin-4 and Respiratory Syncytial Virus Reduce Airway Inflammation in a Mouse Model of Virus-Induced Asthma Exacerbation. *Human Gene Therapy* **25**, 642–650 (2014).
118. Marsland, B. J., Scanga, C. B., Kopf, M. & Le Gros, G. Allergic airway inflammation is exacerbated during acute influenza infection and correlates with increased allergen presentation and recruitment of allergen-specific T-helper type 2 cells. *Clin Exp Allergy* **34**, 1299–1306 (2004).
119. Ravanetti, L. *et al.* An early innate response underlies severe influenza-induced exacerbations of asthma in a novel steroid-insensitive and anti-IL-5-responsive mouse model. *Allergy* **72**, 737–753 (2017).
120. Mori, H. *et al.* Differences in respiratory syncytial virus and influenza infection in a house-dust-mite-induced asthma mouse model: consequences for steroid sensitivity. *Clinical Science* **125**, 565–574 (2013).
121. Traub, S. *et al.* An Anti-Human ICAM-1 Antibody Inhibits Rhinovirus-Induced Exacerbations of Lung Inflammation. *PLoS Pathog* **9**, e1003520 (2013).
122. Kondo, Y. *et al.* Effects of primary and secondary low-grade respiratory syncytial virus infections in a murine model of asthma. *Clin Exp Allergy* **34**, 1307–1313 (2004).
123. Matsuse, H. *et al.* Effects of anti-inflammatory therapies on recurrent and low-grade respiratory syncytial virus infections in a murine model of asthma. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* **97**, 55–60 (2006).
124. Lunding, L. P. *et al.* Poly(inosinic-cytidylic) Acid-Triggered Exacerbation of Experimental Asthma Depends on IL-17A Produced by NK Cells. *The Journal of Immunology* **194**, 5615–5625 (2015).

125. Otte, A. *et al.* Differential Host Determinants Contribute to the Pathogenesis of 2009 Pandemic H1N1 and Human H5N1 Influenza A Viruses in Experimental Mouse Models. *The American Journal of Pathology* **179**, 230–239 (2011).
126. Mattfeldt, T., Mall, G., Gharehbaghi, H. & Möller, P. Estimation of surface area and length with the orientator. *J Microsc* **159**, 301–317 (1990).
127. Hsia, C. C. W., Hyde, D. M., Ochs, M., Weibel, E. R. & ATS/ERS Joint Task Force on Quantitative Assessment of Lung Structure. An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **181**, 394–418 (2010).
128. Beale, J. *et al.* Rhinovirus-induced IL-25 in asthma exacerbation drives type 2 immunity and allergic pulmonary inflammation. *Sci Transl Med* **6**, 256ra134 (2014).
129. Hashimoto, K. *et al.* Respiratory Syncytial Virus in Allergic Lung Inflammation Increases Muc5ac and Gob-5. *Am J Respir Crit Care Med* **170**, 306–312 (2004).
130. An, S. *et al.* Initial Influenza Virus Replication Can Be Limited in Allergic Asthma Through Rapid Induction of Type III Interferons in Respiratory Epithelium. *Front. Immunol.* **9**, 986 (2018).
131. Ishikawa, H. *et al.* Mice with Asthma Are More Resistant to Influenza Virus Infection and NK Cells Activated by the Induction of Asthma Have Potentially Protective Effects. *J Clin Immunol* **32**, 256–267 (2012).
132. Samarasinghe, A. E. *et al.* The immune profile associated with acute allergic asthma accelerates clearance of influenza virus. *Immunol Cell Biol* **92**, 449–459 (2014).
133. Nazir, R., Khanna, M. & Kulshrestha, R. Time course of pulmonary pathology, cytokine influx and their correlation on augmentation of antigen challenge by influenza A virus infection. *Indian J. Exp. Biol.* **46**, 151–158 (2008).
134. De Alba, J. *et al.* Double-stranded RNA evokes exacerbation in a mouse model of corticosteroid refractory asthma. *Clinical Science* **129**, 973–987 (2015).
135. Hansel, T. T. *et al.* A Comprehensive Evaluation of Nasal and Bronchial Cytokines and Chemokines Following Experimental Rhinovirus Infection in Allergic Asthma: Increased Interferons (IFN- γ and IFN- λ) and Type 2 Inflammation (IL-5 and IL-13). *EBioMedicine* **19**, 128–138 (2017).
136. Jackson, D. J. *et al.* IL-33–Dependent Type 2 Inflammation during Rhinovirus-induced Asthma Exacerbations *In Vivo*. *Am J Respir Crit Care Med* **190**, 1373–1382 (2014).

137. Zambrano, J. C. *et al.* Experimental rhinovirus challenges in adults with mild asthma: Response to infection in relation to IgE. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **111**, 1008–1016 (2003).
138. Kondo, S. & Abe, K. The Effects of Influenza Virus Infection on FEV1 in Asthmatic Children. *Chest* **100**, 1235–1238 (1991).
139. Morjaria, J. B. *et al.* Sputum IL-6 concentrations in severe asthma and its relationship with FEV1. *Thorax* **66**, 537–537 (2011).
140. Peters, M. C. *et al.* Plasma interleukin-6 concentrations, metabolic dysfunction, and asthma severity: a cross-sectional analysis of two cohorts. *The Lancet Respiratory Medicine* **4**, 574–584 (2016).
141. Yokoyama, A. *et al.* Circulating interleukin-6 levels in patients with bronchial asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**, 1354–1358 (1995).
142. Ghebre, M. A. *et al.* Severe exacerbations in moderate-to-severe asthmatics are associated with increased pro-inflammatory and type 1 mediators in sputum and serum. *BMC Pulm Med* **19**, 144 (2019).
143. Bauer, R. N. *et al.* Influenza enhances caspase-1 in bronchial epithelial cells from asthmatic volunteers and is associated with pathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **130**, 958-967.e14 (2012).
144. Teran, L. M., Johnston, S. L., Schröder, J. M., Church, M. K. & Holgate, S. T. Role of nasal interleukin-8 in neutrophil recruitment and activation in children with virus-induced asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **155**, 1362–1366 (1997).
145. Johnston, S. L. *et al.* Low grade rhinovirus infection induces a prolonged release of IL-8 in pulmonary epithelium. *J. Immunol.* **160**, 6172–6181 (1998).
146. Ying, S. *et al.* TNF alpha mRNA expression in allergic inflammation. *Clin. Exp. Allergy* **21**, 745–750 (1991).
147. Bradding, P. *et al.* Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **10**, 471–480 (1994).
148. Furuya, Y. *et al.* Prevention of Influenza Virus-Induced Immunopathology by TGF- β Produced during Allergic Asthma. *PLoS Pathog* **11**, e1005180 (2015).
149. LeMessurier, K. S. *et al.* Allergic inflammation alters the lung microbiome and hinders synergistic co-infection with H1N1 influenza virus and *Streptococcus pneumoniae* in C57BL/6 mice. *Sci Rep* **9**, 19360 (2019).

150. Lee, D. C. P. *et al.* Prior exposure to inhaled allergen enhances anti-viral immunity and T cell priming by dendritic cells. *PLoS ONE* **13**, e0190063 (2018).
151. Kawaguchi, A. *et al.* Impacts of allergic airway inflammation on lung pathology in a mouse model of influenza A virus infection. *PLoS ONE* **12**, e0173008 (2017).
152. Li, B. W. S. *et al.* T cells and ILC2s are major effector cells in influenza-induced exacerbation of allergic airway inflammation in mice. *Eur. J. Immunol.* **49**, 144–156 (2019).
153. Okada, S. *et al.* Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. *Cytokine* **63**, 194–200 (2013).
154. Hasegawa, S. *et al.* Cytokine profile of bronchoalveolar lavage fluid from a mouse model of bronchial asthma during seasonal H1N1 infection. *Cytokine* **69**, 206–210 (2014).
155. Zanin, M., Baviskar, P., Webster, R. & Webby, R. The Interaction between Respiratory Pathogens and Mucus. *Cell Host & Microbe* **19**, 159–168 (2016).
156. Kim, H. S. *et al.* Effect of Influenza Virus Infection in a Murine Model of Asthma. *Iran J Allergy Asthma Immunol* **14**, 392–401 (2015).
157. Jaspers, I. *et al.* Exacerbation of allergic inflammation in mice exposed to diesel exhaust particles prior to viral infection. *Part Fibre Toxicol* **6**, 22 (2009).
158. Zhu, J., Yamane, H., Cote-Sierra, J., Guo, L. & Paul, W. E. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res* **16**, 3–10 (2006).
159. Lee, G. R., Fields, P. E. & Flavell, R. A. Regulation of IL-4 Gene Expression by Distal Regulatory Elements and GATA-3 at the Chromatin Level. *Immunity* **14**, 447–459 (2001).
160. Zaidan, N. & Ottersbach, K. The multi-faceted role of Gata3 in developmental haematopoiesis. *Open Biol.* **8**, 180152 (2018).
161. Szabo, S. J. *et al.* A Novel Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell* **100**, 655–669 (2000).
162. Kim, C. H. FOXP3 and Its Role in the Immune System. in *Forkhead Transcription Factors* (ed. Maiese, K.) vol. 665 17–29 (Springer New York, 2009).
163. Wu, Y. *et al.* FOXP3 Controls Regulatory T Cell Function through Cooperation with NFAT. *Cell* **126**, 375–387 (2006).
164. Lawrence, T. The Nuclear Factor NF- B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **1**, a001651–a001651 (2009).
165. Macian, F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* **5**, 472–484 (2005).

166. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S.-C. NF- κ B signaling in inflammation. *Sig Transduct Target Ther* **2**, 17023 (2017).
167. Ramos, I. & Fernandez-Sesma, A. Cell Receptors for Influenza A Viruses and the Innate Immune Response. *Front. Microbio.* **3**, (2012).
168. Lamichhane, P. P. & Samarasinghe, A. E. The Role of Innate Leukocytes during Influenza Virus Infection. *Journal of Immunology Research* **2019**, 1–17 (2019).
169. Samarasinghe, A. E. *et al.* Eosinophils Promote Antiviral Immunity in Mice Infected with Influenza A Virus. *J.I.* **198**, 3214–3226 (2017).
170. Lambrecht, B. N. & Hammad, H. The airway epithelium in asthma. *Nature Medicine* **18**, 684–692 (2012).
171. Couceiro, J. N. S. S., Paulson, J. C. & Baum, L. G. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Research* **29**, 155–165 (1993).
172. Chirkova, T., Petukhova, G., Korenkov, D., Naikhin, A. & Rudenko, L. Immunization with live influenza viruses in an experimental model of allergic bronchial asthma: infection and vaccination. *Influenza and Other Respiratory Viruses* **2**, 165–174 (2008).
173. Doorley, L. A., LeMessurier, K. S., Iverson, A. R., Palipane, M. & Samarasinghe, A. E. Humoral immune responses during asthma and influenza co-morbidity in mice. *Immunobiology* **222**, 1064–1073 (2017).
174. Wohlleben, G. *et al.* Influenza A Virus Infection Inhibits the Efficient Recruitment of Th2 Cells into the Airways and the Development of Airway Eosinophilia. *J Immunol* **170**, 4601–4611 (2003).
175. Aeffner, F. & Davis, I. C. Respiratory Syncytial Virus Reverses Airway Hyperresponsiveness to Methacholine in Ovalbumin-Sensitized Mice. *PLoS ONE* **7**, e46660 (2012).
176. Peebles, R. S., Sheller, J. R., Johnson, J. E., Mitchell, D. B. & Graham, B. S. Respiratory syncytial virus infection prolongs methacholine-induced airway hyperresponsiveness in ovalbumin-sensitized mice. *J. Med. Virol.* **57**, 186–192 (1999).
177. Shibata, T. *et al.* Axl Receptor Blockade Ameliorates Pulmonary Pathology Resulting from Primary Viral Infection and Viral Exacerbation of Asthma. *J.I.* **192**, 3569–3581 (2014).
178. Jiang, X. *et al.* Respiratory syncytial virus infection differentiates airway dysfunction in the central and peripheral airways in OVA-sensitized mice. *Experimental Lung Research* **38**, 453–462 (2012).

179. Lai, S.-H., Liao, S.-L., Wong, K.-S. & Lin, T.-Y. Defective innate immune responses to respiratory syncytial virus infection in ovalbumin-sensitized mice. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* **50**, 17–25 (2017).
180. Mäkelä, M. J. *et al.* Prior airway exposure to allergen increases virus-induced airway hyperresponsiveness. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **112**, 861–869 (2003).
181. Nguyen, T. H., Maltby, S., Eyers, F., Foster, P. S. & Yang, M. Bromodomain and Extra Terminal (BET) Inhibitor Suppresses Macrophage-Driven Steroid-Resistant Exacerbations of Airway Hyper-Responsiveness and Inflammation. *PLoS ONE* **11**, e0163392 (2016).
182. Nguyen, T. H. *et al.* TNF- α and Macrophages Are Critical for Respiratory Syncytial Virus-Induced Exacerbations in a Mouse Model of Allergic Airways Disease. *J.I.* **196**, 3547–3558 (2016).
183. Nguyen, T. H. *et al.* Identification of IFN- γ and IL-27 as Critical Regulators of Respiratory Syncytial Virus-Induced Exacerbation of Allergic Airways Disease in a Mouse Model. *J.I.* **200**, 237–247 (2018).
184. Tourdot, S. *et al.* Respiratory syncytial virus infection provokes airway remodelling in allergen-exposed mice in absence of prior allergen sensitization. *Clin Exp Allergy* **38**, 1016–1024 (2008).
185. Wang, J. *et al.* BuShenYiQi Formula strengthens Th1 response and suppresses Th2-Th17 responses in RSV-induced asthma exacerbated mice. *Journal of Ethnopharmacology* **154**, 131–147 (2014).
186. Ishioka, T. *et al.* Elevated Macrophage Inflammatory Protein 1a and Interleukin-17 Production in an Experimental Asthma Model Infected with Respiratory Syncytial Virus. *Int Arch Allergy Immunol* **161**, 129–137 (2013).
187. Ju, Y. *et al.* Effect of respiratory syncytial virus infection on regulated on activation, normal T-cells expressed and secreted production in a murine model of asthma. *Korean J Pediatr* **54**, 456 (2011).
188. Peebles, R. S. *et al.* Respiratory syncytial virus infection does not increase allergen-induced type 2 cytokine production, yet increases airway hyperresponsiveness in mice. *J. Med. Virol.* **63**, 178–188 (2001).
189. Mukherjee, S. *et al.* IL-17-Induced Pulmonary Pathogenesis during Respiratory Viral Infection and Exacerbation of Allergic Disease. *The American Journal of Pathology* **179**, 248–258 (2011).

190. Schaller, M. A., Kallal, L. E. & Lukacs, N. W. A Key Role for CC Chemokine Receptor 1 in T-Cell-Mediated Respiratory Inflammation. *The American Journal of Pathology* **172**, 386–394 (2008).
191. Mohapatra, S. S. & Boyapalle, S. Epidemiologic, Experimental, and Clinical Links between Respiratory Syncytial Virus Infection and Asthma. *Clinical Microbiology Reviews* **21**, 495–504 (2008).
192. Maltby, S., Tay, H. L., Yang, M. & Foster, P. S. Mouse models of severe asthma: Understanding the mechanisms of steroid resistance, tissue remodelling and disease exacerbation: Mouse models of severe asthma. *Respirology* **22**, 874–885 (2017).
193. Hu, X. *et al.* Respiratory Syncytial Virus Exacerbates OVA-mediated asthma in mice through C5a-C5aR regulating CD4⁺T cells Immune Responses. *Sci Rep* **7**, 15207 (2017).
194. Petersen, B. C., Dolgachev, V., Rasky, A. & Lukacs, N. W. IL-17E (IL-25) and IL-17RB promote respiratory syncytial virus-induced pulmonary disease. *Journal of Leukocyte Biology* **95**, 809–815 (2014).

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AHR	Atemwegshyperreagibilität
AK	Antikörper
ALI	<i>air-liquid-interface</i>
Alum	Aluminiumhydroxid
BAL	Broncho-alveoläre Lavage
BSA	Bovines Serum Albumin
CBA	<i>Cytometric Bead Assay</i>
CCL	CC-Chemokinligand
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>)
CXCL	CXC-Chemokinligand
cys-LT	Cysteinyl-Leukotriene
DC	Dendritische Zellen (<i>dendritic cells</i>)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure (<i>double stranded ribonucleic acid</i>)
EBP	<i>eosinophilic basic protein</i>
ECP	<i>eosinophilic cationic protein</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FBS	Fetales Kälberserum (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FcεRI	hochaffiner IgE Rezeptor
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
GATA3	GATA-bindendes Protein 3
GINA	Globale Initiative für Asthma
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (<i>granulocyte colony stimulating factor</i>)

GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>)
H1N1	Influenza A-Virus H1N1 (Bezeichnung des Virus-Subtyps)
HDM	Hausstaubmilben-Extrakt (<i>house dust mite</i>)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horseradish peroxidase</i>)
HRV	Humanes Rhinovirus
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
IAV	Influenza A-Virus
ICAM	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül (<i>intercellular adhesion molecule</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILCs	<i>innate lymphoid cells</i>
IP-10	<i>interferon γ-induced protein 10</i>
IRF	Interferon-regulierender Faktor
I-TAC	<i>Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant</i>
IU	Infektiöse Einheit (<i>infectious unit</i>)
IVC	individuell ventilierten Käfigen (<i>individual ventilated cage</i>)
KC	<i>keratinocyte chemoattractant</i>
LTB ₄	Leukotrien B ₄
LTC ₄	Leukotrien C ₄
MBP	<i>major basic protein</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MDA-5	<i>melanoma differentiation-associated gene-5</i>
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>
MEM	<i>minimum essential medium</i>
MHCII	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II (<i>major histocompatibility complex class II</i>)
MIG	<i>monokine induced by gamma-interferon</i>
MIP-1	<i>macrophage inflammatory protein-1</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>

NAL	Nasale Lavage
NAM	<i>Non-Invasive Airway Mechanics</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NFκB	<i>nuclear factor k-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NGF	Nervenwachstumsfaktor (<i>nerve growth factor</i>)
NP	Nukleoprotein
n.s.	nicht signifikant
OVA	Ovalbumin
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor (<i>platelet activating factor</i>)
PAS	Periodsäure-Schiff (<i>periodic acid-Schiff</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (<i>phosphate-buffered saline</i>)
pDC	plasmacytoide Dendritische Zellen
PEF	<i>peak expiratory flow</i>
PES	Polyethersulfon
PFA	Paraformaldehyd
pfu	Plaques-bildende Einheit (<i>plaque-forming unit</i>)
PGD2	Prostaglandin D ₂
poly(I:C); pIC	<i>polyinosinic:polycytidylic acid</i>
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RIG-I	<i>retinoic acid inducible gene I</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RPL32	<i>ribosomal protein L32</i>
RSV	Respiratorisches Syncytialvirus
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Echtzeit quantitative Polymerase Kettenreaktion (<i>real time quantitative polymerase chain reaction</i>)
SCF	Stammzellfaktor (<i>stem cell factor</i>)
SEM	Standardfehler (<i>Standard error of the mean</i>)
STAT	<i>Signal transducers and Activators of Transcription</i>
TARC	<i>thymus- and activation-regulated chemokine</i>
TCID ₅₀	<i>50% tissue culture infective dose</i>
TCR	T Zellrezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TE	Tris-EDTA
TGF	<i>Transforming growth factor</i>

T _H Zelle	T Helfer Zelle
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (<i>toll-like receptor</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor
TPCK	<i>Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone</i>
T _{reg} Zelle	regulatorische T Helferzelle
TSLP	<i>thymic stromal lymphopietin</i>
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organisation</i>)

7.2 **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1.1: Einordnung verschiedener Subtypen des Asthmas anhand des Zeitpunkts des Auftretens und dem Vorhandensein einer Eosinophilie.....	3
Abb. 3.1: Behandlungsschema zur Auslösung einer akuten Exazerbation von experimentellem Asthma mittels poly(I:C).....	21
Abb. 3.2: Behandlungsschema zur Auslösung einer akuten Exazerbation von experimentellem Asthma mittels Influenza A-Virus (H1N1).....	22
Abb. 3.3: Behandlungsschema zur Auslösung einer akuten Exazerbation von experimentellem Asthma mittels Respiratorisches Syncytialvirus	23
Abb. 3.4: Komponenten und Aufbau des Buxco FinePoint Non-Invasive Airway Mechanics (NAM) von DSI.	24
Abb. 3.5: Funktionsprinzip des Cytometric Bead Arrays	33
Abb. 3.6: Funktionsprinzip eines Sandwich-ELISA	34
Abb. 4.1: Untersuchung von infiltrierenden Immunzellen in das Lungenlumen.....	40
Abb. 4.2: Untersuchung der Expression von Immunmediatoren im Lungengewebe.	42
Abb. 4.3: Proteinkonzentrationen von Interferonen im Lungenlumen.	44
Abb. 4.4: Proteinkonzentrationen von TH ₂ -Zytokinen im Lungenlumen.	45
Abb. 4.5: Proteinkonzentrationen von pro-inflammatorischen Zytokinen im Lungenlumen. .	46
Abb. 4.6: Proteinkonzentrationen von Chemokinen und pro-inflammatorischen Mediatoren im Lungenlumen.....	47
Abb. 4.7: systemische Proteinkonzentrationen von Zytokinen und Chemokinen.	50
Abb. 4.8: Proteinkonzentrationen von Zytokinen und Chemokinen in den oberen Atemwegen.	51
Abb. 4.9: Überleben und Gewichtsverlust.	54
Abb. 4.10: Infiltrierende Immunzellen in das Lungenlumen.	56
Abb. 4.11: Becherzellhyperplasie, Mukusproduktion und infiltrierende Immunzellen in den Atemwegen.....	57
Abb. 4.12: Expression von Immunmediatoren im Lungengewebe.....	59
Abb. 4.13: Proteinkonzentrationen von TH ₂ -Zytokinen im Lungenlumen.....	60
Abb. 4.14: Proteinkonzentrationen von pro-inflammatorischen Zytokinen im Lungenlumen.	61
Abb. 4.15: Proteinkonzentrationen von verschiedenen Immunmediatoren im Lungenlumen.	62
Abb. 4.16: Virusreplikation im Lungengewebe.	63
Abb. 4.17: Überleben und Gewichtsverlust.	64

Abb. 4.18: Infiltrierende Immunzellen in das Lungenlumen.	66
Abb. 4.19: Becherzellhyperplasie, Mukusproduktion und infiltrierende Immunzellen in den Atemwegen.....	67
Abb. 4.20: Expression von Immunmediatoren und Transkriptionsfaktoren im Lungengewebe.	69
Abb. 4.21: Proteinkonzentrationen von T _H 2-Zytokinen im Lungenlumen.	71
Abb. 4.22: Proteinkonzentrationen von pro-inflammatorischen Zytokinen im Lungenlumen.	72
Abb. 4.23: Proteinkonzentrationen verschiedener Immunmediatoren im Lungenlumen.	73
Abb. 4.24: Virusreplikation im Lungengewebe.	74
Abb. 4.25: Überleben und Gewichtsverlust.	76
Abb. 4.26: Infiltrierende Immunzellen in das Lungenlumen 1 Tag nach der RSV-Infektion.	77
Abb. 4.27: Infiltrierende Immunzellen in das Lungenlumen 4 Tage nach der RSV-Infektion.	79
Abb. 4.28: Infiltrierende Immunzellen in das Lungenlumen 8 Tage nach der RSV-Infektion.	81
Abb. 4.29: Becherzellhyperplasie und Mukusproduktion in den Atemwegen 1 Tag nach der RSV-Infektion.	82
Abb. 4.30: Becherzellhyperplasie und Mukusproduktion in den Atemwegen 4 Tage nach der RSV-Infektion.	83
Abb. 4.31: Becherzellhyperplasie und Mukusproduktion in den Atemwegen 8 Tage nach der RSV-Infektion.	84
Abb. 4.32: Lungenfunktionsmessung 1 Tag nach der RSV-Infektion.	85
Abb. 4.33: Lungenfunktionsmessung 4 Tage nach der RSV-Infektion.	86
Abb. 4.34: Lungenfunktionsmessung 8 Tage nach der RSV-Infektion.	86
Abb. 4.35: Expression von Transkriptionsfaktoren und Immunmediatoren im Lungengewebe 1 Tag nach der RSV-Infektion.	88
Abb. 4.36: Expression von Transkriptionsfaktoren und Immunmediatoren im Lungengewebe 4 Tage nach der RSV-Infektion.	90
Abb. 4.37: Expression von Transkriptionsfaktoren und Immunmediatoren im Lungengewebe 8 Tage nach der RSV-Infektion.	92
Abb. 4.38: Proteinkonzentrationen von T _H 2-Zytokinen im Lungenlumen 1 Tag nach der RSV-Infektion.	93
Abb. 4.39: Proteinkonzentrationen von T _H 2-Zytokinen im Lungenlumen 4 Tage nach der RSV-Infektion.	94

Abb. 4.40: Proteinkonzentrationen von T _H 2-Zytokinen im Lungenlumen 8 Tage nach der RSV-Infektion.	95
Abb. 4.41: Proteinkonzentrationen von Interferonen im Lungenlumen 1 Tag nach der RSV-Infektion.	96
Abb. 4.42: Proteinkonzentrationen von Interferonen im Lungenlumen 4 Tage nach der RSV-Infektion.	97
Abb. 4.43: Proteinkonzentrationen von Interferonen im Lungenlumen 8 Tage nach der RSV-Infektion.	98
Abb. 4.44: Proteinkonzentrationen von pro-inflammatorischen Zytokinen im Lungenlumen 1 Tag nach der RSV-Infektion.	99
Abb. 4.45: Proteinkonzentrationen von pro-inflammatorischen Zytokinen im Lungenlumen 4 Tage nach der RSV-Infektion.	100
Abb. 4.46: Proteinkonzentrationen von pro-inflammatorischen Zytokinen im Lungenlumen 8 Tage nach der RSV-Infektion.	101
Abb. 4.47: Proteinkonzentrationen von Chemokinen im Lungenlumen 1 Tag nach der RSV-Infektion.	102
Abb. 4.48 Proteinkonzentrationen von Chemokinen im Lungenlumen 4 Tage nach der RSV-Infektion.	103
Abb. 4.49: Proteinkonzentrationen von Chemokinen im Lungenlumen 8 Tage nach der RSV-Infektion.	104
Abb. 4.50: Proteinkonzentrationen verschiedener Immunmediatoren im Lungenlumen 1 Tag nach der RSV-Infektion.	105
Abb. 4.51: Proteinkonzentrationen verschiedener Immunmediatoren im Lungenlumen 4 Tage nach der RSV-Infektion.	106
Abb. 4.52: Proteinkonzentrationen verschiedener Immunmediatoren im Lungenlumen 8 Tage nach der RSV-Infektion.	106
Abb. 4.53: Virusreplikation im Lungengewebe 4 Tage nach der RSV-Infektion.....	107
Abb. 5.1: Sortierung der gemessenen Mediatoren zur Untersuchung der frühen Exazerbation von experimentellem Asthma.....	115

8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die hier vorliegende Arbeit, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer Dr. Michael Wegmann, meine eigene Arbeit ist und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln verfasst wurde.

Weiterhin versichere ich, dass die hier vorliegende Arbeit weder ganz noch in Teilen einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen hat und auch nicht veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht wurde.

Ich erkläre, dass die hier vorliegende Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist.

Ich versichere, dass mir kein akademischer Grad entzogen wurde.

Hamburg, den _____

(Rebecca E. H. Bodenstein-Sgró)

9 Danksagung

Hiermit möchte ich allen Personen danken, die zu dem Gelingen dieser Arbeit in unterschiedlichster Weise beigetragen haben.

Zu Beginn möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas Roeder danken, dass er sich dazu bereit erklärt hat die Arbeit als Erstgutachter zu begutachten.

Weiterhin möchte ich PD Dr. Michael Wegmann danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Darüber hinaus möchte ich mich für seine Betreuung und Unterstützung während der gesamten Zeit bedanken.

Auch Dr. Christoph Hölscher möchte ich als Zweitbetreuer für die halbjährlichen Diskussionen und Anregungen und für den Kontakt von Prof. Dr. S. Ehl vom Universitätsklinikum Freiburg danken.

Ein besonderer Dank gilt außerdem Linda Lang, Juliane Artelt, Franziska Beyersdorf und Patricia Prilla für die exzellente technische Unterstützung, sowie die Bereitschaft ihr Wissen und Können geduldig zu teilen. Ohne euch wären die Tierversuche und insbesondere die Tierversuche mit Virusinfektionen so nicht möglich gewesen.

Ebenso danke ich Dr. Lars Lunding und Dr. Alexandra Schröder für die Diskussionen und aufmunternden Worte.

Für die angenehme, freundliche und herzliche Arbeitsatmosphäre möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Asthma-Regulation und -Exazerbation, Experimentelle Pneumologie und Invertebratenmodelle danken.

Außerdem gilt mein Dank Nancy Mounogou Kouassi, Dr. Swantje Thiele und Prof. Dr. Gülsah Gabriel für die Einarbeitung in den Umgang und die Arbeit mit Influenza-Viren, sowie Diskussionen und Anregungen und das zur Verfügung stellen des hier verwendeten Influenza-Virus.

Meinem Mann Paolo danke ich, dass er mich immer unterstützt, an mich glaubt und immer für mich da ist. Deine Geduld und Hilfe während dieser Arbeit war unendlich. Danke!

Meinen Eltern danke ich, dass sie immer hinter mir stehen und mich bedingungslos unterstützen. Das ist nicht selbstverständlich und dafür Danke, Mama und Papa!

Für das Anfachen des gesunden geschwisterlichen Ehrgeizes danke ich meinem Bruder, denn ohne ihn hätte ich wohl so manches Mal schneller aufgegeben (auch wenn er sich dessen wohl nicht unbedingt bewusst ist).

DANKE!