

**Charakterisierung der
immunsuppressiven Wirkung von
humanem Choriongonadotropin in einem
murinen Asthma Modell**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

Nataliya Zhivkova

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
des Universitätsklinikums der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung: 07.08.2015

Ich erkläre, dass ich die vorgelegte Thesis selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Thesis angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der Satzung der Johannes Gutenberg - Universität Mainz zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis niedergelegt sind, eingehalten.

Mainz, den

Nataliya Zhivkova

Zusammenfassung

Das humane Choriongonadotropin (hCG) ist durch seine gut erforschte therapeutische Wirksamkeit auf den Reproduktionstrakt bekannt. Seit seiner Entdeckung, die Anfang des 20. Jahrhunderts liegt, ist aber der gegenwärtige Wissensstand über seine immunregulatorischen Effekte sowie weitere therapeutische Optionen in diversen Erkrankungen mangelhaft.

Asthma ist eine schwerwiegende Erkrankung des Respirationstraktes, die durch ein Ungleichgewicht zwischen der Th1- und Th2-Immunantwort charakterisiert ist. Ein Th2-Phänomen wird ebenfalls während der Schwangerschaft beobachtet. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die immunologische Bedeutung von hCG in einem akuten Mausmodell für allergisches Asthma untersucht. Einer der wichtigsten asthmatischen Parameter stellt die bronchiale Hyperreagibilität dar, die durch die hCG-Behandlung signifikant reduziert wurde. Fernerhin ließ sich eine niedrige Konzentration des Zytokins IL-13, das eine wesentliche Rolle in der Entstehung der Atemwegshyperreagibilität spielt, in der bronchoalveolären Lavage der mit hCG behandelten Tieren nachweisen. Allerdings konnten keine eindeutigen Unterschiede in den weiter ermittelten Entzündungsindikatoren, wie die Infiltration eosinophiler Granulozyten, die allergenspezifische IgE Produktion, sowie die CD4⁺T-Zellzahl und die Th2-Zytokinfreisetzung in der Lunge, nach hCG-Gabe ermittelt werden. Spezifische histologische Untersuchungen zeigten jedoch einen niedrigen Influx von Makrophagen ins Lungengewebe der mit hCG behandelten Tiere. Es ist bekannt, dass hCG einen Einfluss auf die Funktion von Makrophagen hat. Des Weiteren spielt das umgebende Milieu für das Makrophagenverhalten im Bezug auf die Überempfindlichkeit der Atemwege und der Zytokinsekretion eine entscheidende Rolle.

Um den direkten Effekt von hCG auf diese Immunzellen untersuchen zu können, wurden *in vitro* generierte Makrophagen, aus hämatopoetischen Zellen stammend, verwendet. Hierbei wurden morphologische und phänotypische Zellveränderungen analysiert. Die beobachtete Aktin- und Tubulinumstrukturierung wies weder eine Polarisation zu dem klassisch aktivierten (MΦ1) noch zu dem alternativ aktivierten Makrophagentyp (MΦ2) auf. Weitere *in vitro* Studien zeigten, dass hCG die Oberflächenexpression von costimulatorischen Molekülen wie CD40 und CD80 in

Makrophagen regulieren kann. Fernerhin löste hCG die Synthese und Freisetzung des pleiotropischen Zytokins IL-10, das anti-inflammatorische und immunsuppressorische Eigenschaften zugeschrieben werden, in Makrophagen aus. Mittels kinetischer Untersuchungen wurde die Aktivierung der Signalproteine Erk1/2, NF- κ B und Creb, die in die IL-10 Kaskade involviert sind, bestätigt.

In wenigen T-Zell-vermittelten Immunmodellen wurde bereits über die immunsuppressive Wirkung von hCG durch die Regulation der Deacetylase Sirt1 berichtet, sodass die Rolle von Sirt1 in einem weiteren akuten Asthmodell untersucht wurde. Hierfür wurden Sirt1^{F/F} CD4^{Cre/+} Mäuse eingesetzt, die die Expression eines defekten Sirt1-Proteins spezifisch in T-Lymphozyten aufwiesen. Eine Sensibilisierung und Provokation mit Ovalbumin führte bei diesen Tieren zu einer erhöhten Hyperreagibilität verbunden mit strukturellen Modifikationen im Lungengewebe, infolge der verstärkten Entzündung im Gegensatz zu den Sirt1^{F/F}-Kontrolltieren. Des Weiteren wurde ein signifikanter Anstieg der allergenspezifischen IgE-Antikörper und der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 sowie IL-17 in den Sirt1^{F/F} CD4^{Cre/+}- gegenüber den Sirt1^{F/F}-Mäusen nachgewiesen. Zusätzlich wurde gezeigt, dass ein defektes Sirt1 weder an der T-Zellentwicklung beteiligt ist noch zu einer spontanen Th2-Immunantwort führt. Eine Prädisposition ist dennoch vorhanden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo* und *in vitro* Experimente führen zu der Annahme, dass hCG das Immunsystem modulieren kann. Zur detaillierten Aufklärung seiner Wirkung in Asthma bronchiale werden jedoch weitere Untersuchungen erfolgen.

Summary

The human chorionic gonadotrophin (hCG) has been well studied and it is known to have a therapeutic effect on the reproductive system. Although it was discovered at the beginning of the 20th century, the state of knowledge about hCG and about its immunoregulatory properties as well as other therapeutically options are still inadequate.

The human chorionic gonadotropin is a peptide hormone which is produced during pregnancy by human syncytiotrophoblast and is responsible for the maintenance of pregnancy. Pregnancy has been described as a physiological condition promoting a Th2 immune response. Asthma is a severe disease of the respiratory tract and it is also characterized by an imbalance between the Th1 and Th2 type immune response. Therefore, the purpose of this study was to analyze the immunological function of hCG in a mouse model of acute allergic asthma. The airway hyperresponsiveness is one of the main asthmatic parameters which was significantly reduced after hCG treatment. Further, the hCG treatment led to lower concentration of IL-13 in the bronchial lavage which is known to have a major role in the development of the airway hyperresponsiveness. However, there were no significant differences regarding the other known inflammatory factors like eosinophil infiltration, IgE antibody production, number of CD4⁺ T-cells and the Th2 cytokine secretion in the lung of the hCG treated mice. It is known that hCG has an effect on the function of macrophages. In addition, the lung microenvironment can influence macrophage behavior and its cytokineprofile.

To study the direct effect of hCG on these immune cells, murine bone marrow cells were isolated and differentiated to macrophages. Morphological and phenotypical cell changes were monitored and analyzed. The observed actin and tubulin reorganization had neither the classically activated (MΦ1) nor the alternatively activated (MΦ2) macrophage phenotype. Further *in vitro* studies did show that hCG can regulate the expression of costimulatory molecules like CD40 and CD80 on macrophages. Moreover, the syntheses and the release of IL-10, a pleiotropic cytokine that has both anti-inflammatory and immunosuppressive properties, were activated by hCG. The activation of Erk1/2, NF-κB and Creb, was also proved by kinetical experiments. These cell signal proteins are directly involved in the IL-10 cascade.

There are some reports about the immunosuppressive effect of hCG due to the regulation of the deacetylase Sirt1. Hence, the role of Sirt1 was examined in a further murine model of acute allergic asthma. Mice with Sirt1-deficient CD4 T cells ($Sirt1^{F/F} CD4^{Cre/+}$) were used for this purpose. Loss of Sirt1 resulted in hyperresponsiveness and morphological changes in the lung of mice treated with Ovalbumin. Furthermore, the analysis of the allergen-specific IgE antibodies and the Th2 cytokines IL-4, IL5, IL-13 as well as IL-17 were significantly increased in $Sirt1^{F/F} CD4^{Cre/+}$ mice compared to $Sirt1^{F/F}$ mice. In addition, the conditional deletion of Sirt1 using transgenic CD4-Cre mice did not affect neither the T cell development nor the spontaneous Th2 immune response. Nevertheless, there is an existing predisposition.

The in vivo and in vitro experiments of this study lead to the assumption that hCG can modulate the immune system. However, further studies are needed for a detailed elucidation of its effects in asthma bronchiale.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Grundlagen des Asthma bronchiale	1
1.2	Immunologische Mechanismen von allergischem Asthma	3
1.3	T-Effektorzellen in Asthma bronchiale.....	7
1.3.1	Die Th2-Immunantwort.....	8
1.3.2	Die Th1-Immunantwort.....	13
1.3.3	Die Th17-Immunantwort.....	14
1.4	Makrophagen	15
1.5	Interleukin-10	18
1.6	Das humane Choriongonadotropin (hCG).....	19
1.7	Der LH/CG Rezeptor	21
1.8	Die NAD-abhängige Deacetylase Sirtuin1 (Sirt1).....	23
1.9	Therapien, Asthma und Schwangerschaft.....	27
1.10	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	28
2	Material und Methoden	29
2.1	Material	29
2.1.1	Antikörper	29
2.1.2	Oligonukleotid-Primer	30
2.1.3	Chemikalien, Reagenzien.....	30
2.1.4	Puffer.....	33
2.1.5	Kits	38
2.1.6	Geräte	38
2.1.7	Gebrauchsmaterialien	39
2.1.8	Software	41
2.2	Methoden	42
2.2.1	Versuchstiere	42

2.2.2	Genotypisierung	42
2.2.3	Tierbehandlung	42
2.2.4	Nicht-Invasive Lungenfunktions-Messung	45
2.2.5	Invasive Messung: Messung des Atemwegwiderstandes.....	46
2.2.6	Bronchoalveolar Lavage (BAL).....	47
2.2.7	Cytospin	48
2.2.8	Serumgewinnung	49
2.2.9	Organentnahme und Organpräparation.....	49
2.2.10	Histologische Methoden und Färbungen.....	50
2.2.11	Zellisolierung	55
2.2.12	Generieren von Makrophagen.....	58
2.2.13	Behandlung von <i>in vitro</i> generierten Makrophagen	59
2.2.14	Bestimmung der Zellzahl	61
2.2.15	Zellkultur.....	62
2.2.16	FACS-Analyse.....	63
2.2.17	Enzymed Linked Immuno Sorbant Assay (ELISA)	66
2.2.18	Western Blot.....	67
2.2.19	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	70
2.2.20	Statistische Auswertung	72
3	Ergebnisse.....	73
3.1	HCG–Effekt bei Asthma bronchiale.....	73
3.1.1	Wirkung von hCG auf die Atemwegshyperreagibilität	73
3.1.2	Effekt von hCG auf die humorale Immunantwort.....	76
3.1.3	Einfluss von hCG auf die Entzündung in der Lunge	78
3.1.4	Bestimmung der Th2-Zytokinproduktion in der Lunge.....	80
3.1.5	Bestimmung der Effektorzellen.....	83
3.1.6	Einfluss von hCG auf die Makrophageninfiltration in der Lunge.....	84

3.2	Zelluläre Effekte von hCG	86
3.2.1	Einfluss von hCG auf die Differenzierung von Makrophagen aus hämatopoetischen Stammzellen.....	86
3.2.2	Makrophagen Phänotypisierung.....	88
3.2.3	Morphologische Veränderungen infolge der hCG-Stimulation.....	93
3.2.4	Makrophagen produzieren IL-10 nach Zugabe von hCG.....	99
3.3	Generierung konditioneller Sirt1 Mäuse (Sirt1 ^{F/F} CD4 ^{Cre/+})	104
3.3.1	Charakterisierung von T-Lymphozyten im Thymus und der Milz konditioneller Sirt1 Mäuse (Sirt1 ^{F/F} CD4 ^{Cre/+}).....	106
3.3.2	Bestimmung des Atemwiderstandes von Sirt1 ^{F/F} CD4 ^{Cre/+} Mäusen ..	110
3.3.3	Charakterisierung der humoralen Immunantwort in Sirt1 ^{F/F} CD4 ^{Cre/+} Mäusen	111
3.3.4	Quantifizierung der Eosinophilie in Sirt1 ^{F/F} CD4 ^{Cre/+} Mäusen.....	113
3.3.5	Inflammation in der Lunge von Sirt1 ^{F/F} CD4 ^{Cre/+} Mäusen	114
3.3.6	Bestimmung der Th-Zytokinproduktion in der Lunge von Sirt1 ^{F/F} CD4 ^{Cre/+} Mäusen.....	117
4	Diskussion	121
4.1	HCG reduziert die bronchiale Hyperreaktivität	121
4.2	HCG hat keinen Effekt auf die Th2-vermittelte-Immunglobulin-sekretion ...	122
4.3	HCG hat keinen Einfluss auf die Eosinophilie	123
4.4	HCG beeinflusst die Immunantwort.....	124
4.5	Die Wirkung von hCG auf Makrophagen.....	126
4.6	HCG fördert die Expression von Aktivierungsmolekülen auf Makrophagen	127
4.7	HCG hat einen starken Einfluss auf die Aktinpolymerisierung	130
4.8	HCG induziert die Synthese und Produktion von IL-10 in Makrophagen....	131
4.9	Sirt1 hat keinen Einfluss auf die Entwicklung von CD4 ⁺ T-Zellen.....	132

4.10	Sirt1 besitzt eine antiinflammatorische Wirkung in einem Mausmodell des Asthma bronchiale.....	133
4.11	Sirt1 hemmt die T-Zell-Aktivierung	136
4.12	Fazit und Ausblick	138
5	Literatur.....	140
6	Lebenslauf	164

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der Atemwege.	2
Abbildung 2: Pathogenese des allergischen Asthma.	5
Abbildung 3: T-Zelllinien beteiligt an einem allergischen Phänotyp.	7
Abbildung 4: Darstellung der Makrophagentypen.	17
Abbildung 5: Sirt1 moduliert die Immunantwort.	26
Abbildung 6: Behandlungsprotokoll.	43
Abbildung 7: Behandlungsprotokoll.	44
Abbildung 8: Darstellung des Ganzkörperplethysmographen-Systems der Firma BUXCO®.	45
Abbildung 9: Darstellung des invasiven Systems der Firma BUXCO®.	47
Abbildung 10: Verschiedene Darstellungstechniken.	65
Abbildung 11: Bildliche Darstellung des Sandwich-ELISA.	67
Abbildung 12: Einfluss von hCG auf die oberen Atemwege.	74
Abbildung 13: Einfluss von hCG auf die unteren Atemwege.	75
Abbildung 14: Bestimmung des Antikörpertiters im Blutserum nach hCG-Behandlung.	77
Abbildung 15: Histologische Untersuchung der Lunge nach hCG-Behandlung.	78
Abbildung 16: Quantifizierung der Eosinophilie in der Lunge.	79
Abbildung 17: Analyse des Th2-Profiles in der Bronchoalveolarflüssigkeit.	81
Abbildung 18: Bestimmung des Th2-Zytokinprofils primärer Lungenzellen.	82
Abbildung 19: Quantifizierung von aktivierten CD4-T-Zellen in der Lunge.	84
Abbildung 20: Immunhistologischer Nachweis von F4/80 ⁺ Zellen in murinen Lungenpräparaten.	85
Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbung für CD11b und F4/80 in <i>in vitro</i> differenzierten Makrophagen.	87
Abbildung 22: Expression von CD40 nach hCG Stimulation.	90
Abbildung 23: Expression von CD80 und CD86 nach hCG Stimulation.	91
Abbildung 24: Expression von MHC-II nach hCG Stimulation.	92
Abbildung 25: Morphologische Veränderungen in Makrophagen nach hCG (150U) Stimulation.	95
Abbildung 26: Morphologische Veränderungen in Makrophagen nach hCG (300U) Stimulation.	96

Abbildung 27: Morphologische Veränderungen in Makrophagen nach OVA und OVA/hCG Stimulation.....	97
Abbildung 28: Morphologische Veränderungen in Makrophagen nach LPS und LPS/hCG Stimulation	98
Abbildung 29: HCG fördert die IL-10 Produktion in Makrophagen.....	99
Abbildung 30: Aktivierung des IL-10 Signalwegs nach hCG Behandlung	100
Abbildung 31: Phosphorylierung von Erk1/2 in Makrophagen nach hCG Behandlung	102
Abbildung 32: Expression des LH/CG-Rezeptors in murinen Makrophagen	103
Abbildung 33: Mutagenese-strategie zur Generierung konditioneller Sirt1 ^{F/F} CD4 ^{Cre/+} (Sirt1 Δ und Sirt1 F) Mäuse.....	105
Abbildung 34: Expression von CD4 und CD8 auf T-Zellen.....	106
Abbildung 35: Untersuchung der Lymphozytenpopulationen in der Milz	107
Abbildung 36: Anteil regulatorischer CD4-Zellen in der Milz	108
Abbildung 37: Anteil naiver CD4-Zellen in der Milz	109
Abbildung 38: Darstellung der bronchialen Hyperreagibilität.....	110
Abbildung 39: Analyse des spezifischen IgE-, IgG1- und IgG2b-Titers im Serum von Sirt 1 Δ und Sirt 1 F Mäusen	112
Abbildung 40: Morphologische Charakterisierung der Entzündungszellen im asthmatischen Respirationstrakt von Sirt 1 Δ und Sirt 1 F Mäusen.....	113
Abbildung 41: Nachweis inflammatorischer Zellen in Lungengewebeschnitten.....	115
Abbildung 42: Bestimmung der Mukusproduktion in den asthmatischen Atemwegen von Sirt1 Δ und Sirt1 F Mäusen.....	116
Abbildung 43: Bestimmung des Th2-Zytokinprofils in der Lunge von Sirt 1 Δ und Sirt 1 F Mäusen	118
Abbildung 44: Bestimmung der IFN- γ Konzentration in der Lunge von Sirt 1 Δ und Sirt 1 F Mäusen	119
Abbildung 45: Bestimmung der IL-17 Konzentration in der Lunge von Sirt 1 Δ und Sirt 1 F Mäusen	120

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
AHR	Atemwegshyperreagibilität
AK	Antikörper
Alum	Aluminiumpotassiumsulfat
APC	Antigen Presenting Cell
Aqua dest	Aqua destillata
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSA	Bovines Serum Albumin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxy-Nukleosid Triphosphate
DC	Dendritic Cells
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
et al.	et alteri
FACS	Fluorescence Activated Cell Scan/Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FoxP3	Forkhead box protein 3
GATA	Trans-acting T-cell-specific transcription factor
GITR	Glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor-related Protein
GR	Glykokortikoid-Rezeptor
hCG	human Choriongonadotropin
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LH/CGR	Luteinisierend/Choriongonadotropin Rezeptor
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MCh	Methacholin
MHC	Major Histocompatibility Complex
mRNA	messenger RNA

NFκB	nuclear factor `kappa-light-chain-enhancer` of activated B-cells
NO	Stickstoffoxid
n.s.	nicht signifikant
OVA	Ovalbumin
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphate buffered saline
Penh	enhanced pause
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
Th	T-Helferzelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Treg	regulatorische T-Zelle
TGF-β	transforming growth factor-β
TZR	T-Zell-Rezeptor
vs.	versus
WT; (+/+)	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Grundlagen des Asthma bronchiale

Asthma wurde das erste Mal im Jahr 1859 von dem Engländer Henry Hyde Salter, als Erkrankung mit reversierbarer Verkrampfung der Atemwege beschrieben. Jahre später erweiterte er die Definition mit dem Begriff der bronchialen Hyperreaktivität (BHR). Um eine Erklärung dieser Symptomatik zu finden, fokussierte er seine Arbeit auf neuronale Mechanismen und inflammatorische vaskuläre Veränderungen in der Lunge. Der Mediziner selbst litt sein ganzes Leben unter dieser Krankheit und starb daran [1, 2].

Asthma ist eine schwerwiegende chronische Erkrankung des Respirationstraktes, deren Inzidenz in den letzten zwei Jahrzehnten stark zugenommen hat. Seit 1980 hat sich die Verbreitung von Asthma bronchiale in den westlichen, industriell stark entwickelten Nationen, sowie in den USA, fast verdoppelt. Schätzungsweise 300 Millionen Menschen weltweit leiden an dieser Krankheit und voraussichtlich wird sich die Zahl auf 400 Millionen im Jahre 2025 erhöhen. Asthma bronchiale ist mit erhöhter Mortalität assoziiert. Geschätzt sterben 250000 Patienten pro Jahr an dieser Krankheit [3, 4]. Die Bilanz zeigt, dass Asthma in den letzten Jahren epidemische Dimensionen erreichte. Der Krankheitsbeginn liegt bei 50 % der Betroffenen vor dem 10. Lebensjahr und bei einem weiteren Drittel vor dem 40. Lebensjahr. Dies führte zur Erstellung der sogenannten Hygienehypothese, hinweisend auf den verstärkten Hygienestandard und das verbesserte Gesundheitswesen mittels Impfungen und Antibiotika [5, 6]. Die genaue Ursache bleibt aber umstritten. Verschiedene Faktoren, wie genetische Prädisposition, Umwelteinflüsse, Lebensstil usw. beeinflussen diese Krankheit.

Asthma bronchiale stellt ein komplexes Syndrom dar, welches durch eine chronische pulmonale Entzündung charakterisiert wird und in einer bronchialen Hyperreagibilität (Empfindlichkeit der Atemwege), einer gesteigerten Bronchokonstriktion (Verkrampfung der Bronchialmuskulatur), einer Hypersekretion von zähem Schleim und ödematöser Schwellung der Bronchialwand resultiert [7-9]. Das klinische Bild manifestiert sich in unterschiedlich verlaufende und immer wieder auftretende

Atemnotanfälle, bedingt durch die Verengung der Atemwege, begleitet von Husten und Keuchen, die überwiegend nachts und/oder frühmorgens auftreten [10].

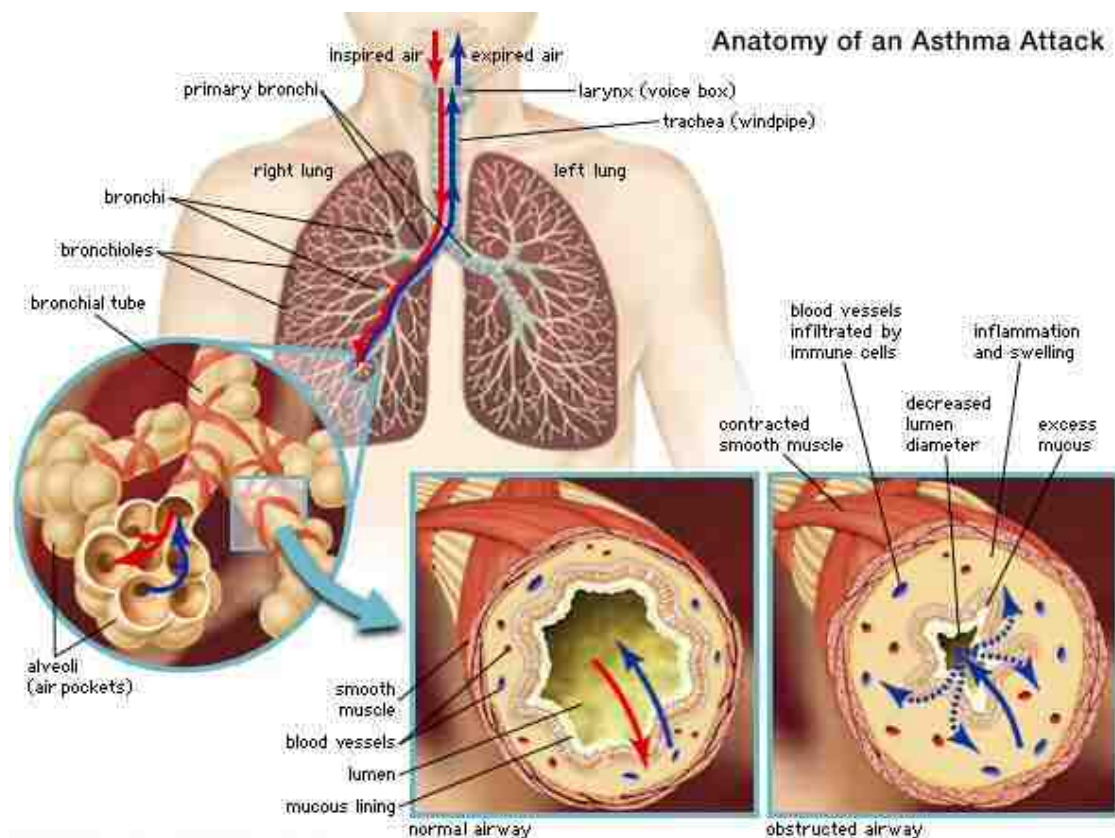


Abbildung 1: Übersicht der Atemwege.

Bei einer normalen Atmung wird die Luft mit einem möglichst geringen Widerstand zu den Alveolen geleitet. Die inspirierte Luft gelangt über die zwei Hauptbronchien, in die sich vielfach aufteilenden Bronchien und Bronchiolen, weiter in die Bronchioli terminales und erst nach mehreren Verzweigungen in die Alveolen, wo der Gasaustausch stattfindet. Bei einem Asthmaanfall werden Bronchospasmen, Ödeme der Bronchialschleimhaut, vermehrte Schleimproduktion und Infiltration von Immunzellen beobachtet. Dadurch verengt sich das Lumen der Atemwege, was zur Erhöhung des Atemwegwiderstandes führt. Die Expiration wird erschwert, die sich durch die Atemnot bemerkbar macht. Quelle:[11]

Asthma ist eine multifaktorielle Erkrankung, die bedingt durch den Auslöser in zwei Typen unterteilt wird. Die atopische Form von Asthma, bekannt als allergisches oder extrinsisches Asthma, tritt vor allem bei Kindern und Jugendlichen auf. Der Kontakt mit einem Allergen, wie Blüten- und Gräser Polle, Hausstaubmilben, Tierhaare, Schimmelpilze und verschiedenen Nahrungsmittel, stellt die häufigste Ursache dar. Im Gegensatz dazu dominiert das nichtallergische Asthma bronchiale, auch

intrinsisches Asthma genannt, im Erwachsenenalter. Diese Form wird von einer Vielzahl anderer Stimuli hervorgerufen. Dazu gehören Stress (Ängste, Depressionen), virale Infektionen, chemische Reizstoffe (Ozon, Zigarettenrauch), physikalische Noxen (kalte und trockene Luft, körperliche Belastung, berufsbedingte Auslöser), Medikamente (Aspirin, β -Blocker) sowie hormonelle Störungen (Menopause, Übergewicht). Beide Formen weisen die gleichen Symptome auf sowie mehr Gemeinsamkeiten als Unterschiede in den immunpathologischen Mechanismen, die durch mehrere klinische Studien bewiesen wurden. Sie sind charakterisiert durch verstärkte Infiltration eosinophiler Granulozyten und T-Lymphozyten, sezernierend IL-4, IL-5 und IL-13, im Respirationstrakt, einschließlich der bronchialen Hyperreagibilität und Mukusproduktion. Allerdings wurde nur im allergischen Asthma ein erhöhter IgE-Spiegel im Serum ermittelt. Asthmatiker, die an intrinsischem Asthma leiden, zeigten nur lokal erhöhte IgE-Werte, nicht aber im Serum. In den Lungenbiopsien der gleichen Patienten wurde eine deutlich stärkere Ansammlung von Makrophagen (CD68⁺, GM-CSFR α) gegenüber dem Allergiker gezeigt. Diese deutet auf eine Funktionsstörung der Makrophagen, mit fortschreitendem Alter, hin [12-14]. Die Heterogenität von Asthma bronchiale zeigte sich auch in Subtypen, die durch Neutrophilie und Th-17 Immunantwort gekennzeichnet sind [15]. In den meisten Fällen wird eine Mischform beobachtet und nur 10 % der Betroffenen leiden an der Reinform.

1.2 Immunologische Mechanismen von allergischem Asthma

Der Begriff Allergie, welcher aus dem altgriechischen stammt und „Fremdreaktion“ bedeutet, bezieht sich auf abnormale erworbene Immunreaktionen infolge von harmlosen Substanzen.

Der Ablauf von allergischem Asthma verläuft in drei Phasen, die Induktionsphase, die Frühphase und die Spätphase. Eine vierte chronische Phase ist nach einer dauerhaften Entzündung zu beobachten. Jede Phase ist charakterisiert durch die Produktion und das Zusammenspiel von verschiedenen Zellmediatoren. Die Induktionsphase wird durch die Exposition zum Allergen hervorgerufen. Verschiedene Faktoren beeinflussen die Entwicklung einer klinisch relevanten Sensibilisierung. Dies schließt den Wirtgenotyp, Art des Allergenauslösers, die

Allergenkonzentration und andere Faktoren ein, welche die Sensibilisierungsreaktion fördern. Gelangt das Allergen über die Atemwege in den Körper wird es von phagozytischen Zellen, überwiegend von professionell antigenpräsentierenden dendritischen Zellen aber auch von Makrophagen erkannt, aufgenommen und über MHC-II-Moleküle auf der Zelloberfläche exponiert. Im Anschluss migrieren die reifen dendritischen Zellen zu den regionalen Lymphknoten, wo sie mit naiven T-Zellen in Kontakt treten. Das Erkennen des Komplexes aus MHC-II-Molekül und präsentiertem Peptid durch den T-Zell-Rezeptor führt zur Aktivierung und Stimulation dieser T-Zellen, die für diesen MHC-Peptidkomplex den entsprechenden T-Zell-Rezeptor auf ihrer Oberfläche tragen. In Gegenwart von Interleukin-4, welches sehr früh von basophilen und eosinophilen Granulozyten, Mastzellen, sowie von NK T-Zellen und T-Zellen sezerniert wird, differenzieren naive T-Zellen (Th0-Zellen) zu T-Helfer Zellen vom Typ 2 und bilden vielfältige Zytokine. Sowohl die Produktion von IL-4 und IL-13 durch die aktivierten T-Zellen, als auch die Expression von verschiedenen costimulatorischen Oberflächenmolekülen stimulieren B-Zellen und veranlassen den Immunglobulinklassenwechsel von IgM zu IgG1 und IgE. Die freigesetzten IgE Antikörper binden an hochaffine IgE-Rezeptoren (FcεRI-Rezeptor) auf Mastzellen, eosinophile und basophile Granulozyten, Monozyten, Thrombozyten und an niederaffinen FcεRII-Rezeptoren, welche auf Lymphozyten und Makrophagen exprimiert werden [9, 16-19]. Bei der Sensibilisierungsreaktion, welche symptomfrei verläuft, spielt die Aktivierung der T-Zellen eine essentielle Rolle in der Entstehung von Asthma.

Die Frühphasenreaktion tritt später nach einem wiederholten Kontakt mit dem selben Allergen ein. Dabei kommt es zur Quervernetzung der mit IgE beladenen FcεRI-Rezeptoren und des Antigens. Dies löst eine komplexe intrazelluläre Kaskade in Mastzellen aus und steuert die Ausschüttung von verschiedenen Mediatoren, welche in der zytoplasmatischen Granula gespeichert sind, und fördert zugleich die Synthese von neuen Produkten. In dieser Phase spielen die Mastzellen, welche drei Klassen von verschiedenen biologisch aktiven Botenstoffe produzieren, die ausschlaggebende Rolle [17]. Zu den in der Granula gespeicherten Mediatoren gehören Histamine, Proteasen und Proteoglykane. Histamine wirken auf die glatte Muskulatur, indem sie Kontraktionen auslösen. Sie wirken auch auf Endothelialzellen, Nervenendungen und stimulieren die Mukussekretion. *In vitro* wurde die Aktivität der Trypase auf Fibroblasten nachgewiesen [20, 21]. Die

Lipidmediatoren wie Prostaglandine und Leukotriene rufen Bronchokonstriktion, Gefäßkongestion, Ödembildung hervor und rekrutieren die Entzündungszellen. Das profibrogene Zytokin TGF- β , VEGF und einige Chemokine (IL-16, IL-8 und andere) werden auch von Mastzellen sezerniert. Neben den Mastzellen haben auch die basophilen Granulozyten durch die Ausschüttung von verschiedenen entzündungsfördernden Mediatoren einen Effekt auf die Frühreaktion [22, 23]. Falls in dieser Frühphase keine medikamentöse Behandlung erfolgt, kann der Anfall bis zu zwei Stunden dauern. Solche Reaktionen ereignen sich, wenn inflammatorische Botenstoffe lokal freigesetzt werden. Im Fall einer systemischen Freigabe erfolgt ein anaphylaktischer Schock.

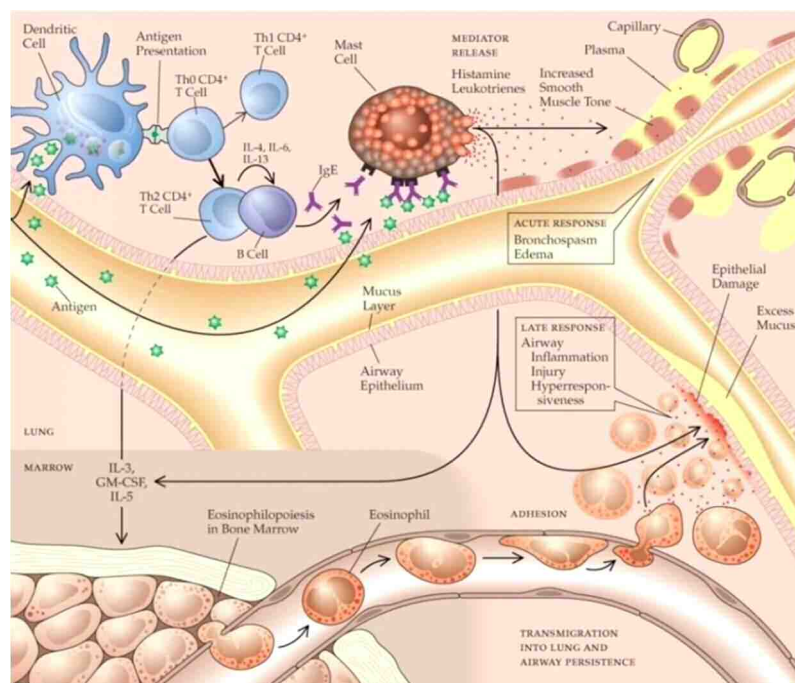


Abbildung 2: Pathogenese des allergischen Asthma.

Inhalierete Antigene werden von APCs (DCs) erkannt, prozessiert und CD4⁺ T-Zellen präsentiert. Die T-B-Zellinteraktion veranlasst die IgE-Synthese sowie die Freisetzung und Bindung auf Mastzellen. Diese erste Phase wird als Sensibilisierungsreaktion bezeichnet. Erneute Exposition mit dem gleichen Antigen (Allergen) löst die frühe allergische Reaktion aus. Dabei bindet das Antigen an IgE und bewirkt die Abgabe verschiedener Mediatoren, die eine Obstruktion und Schwellung der Bronchien verursachen. Die Spätphase ist durch verstärkte Mukusproduktion, Influx inflammatorischer Zellen, Gewebsschädigung und Hyperreagibilität gekennzeichnet. Quelle: [24]

Der Peak der Spätreaktion liegt zwischen 6 und 9 Stunden. Diese Phase ist durch eine exzessive Inflammation des Respirationstraktes charakterisiert und mit morphologischen Veränderungen verbunden. Dafür ist der übermäßige Influx von Entzündungszellen, wie Eosinophilen, Neutrophilen, Basophilen, T-Zellen, Makrophagen und Dendritischen Zellen und die von ihnen sezernierten Stoffen in der Lunge ausschlaggebend. Mastzellen leiten den Übergang von der Früh- zur Spätphase ein, indem sie den Einstrom inflammatorischer Leukozyten fördern. Das Hauptzytokin, welches von Mastzellen sezerniert wird, ist TNF- α . Es beeinflusst die Hochregulation von endothelialen und epithelialen Adhäsionsmolekülen und induziert die AHR. Interleukin-3, -4, -5 und GM-CSF werden ebenfalls von Mastzellen freigesetzt, die ihrerseits Eosinophile anlocken und die Th2-Immunantwort verstärken. Die von eosinophilen Granulozyten freigesetzten toxischen Produkte schädigen die Epithelzellen [25, 26]. Weiterhin produzieren Neutrophile proinflammatorische Zytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β), Proteasen (Elastase, Matrixmetalloproteinasen, Collagenase), NO und weitere Moleküle, die das Lungengewebe zerstören. Da die Spätphase ein Zusammentreffen von angeborenem und erworbenem Immunsystem darstellt, üben T-Zellen eine wichtige Funktion aus. Sowohl Th2- als auch Th1-Zellen sind in der Pathogenese von Asthma involviert. Die von Th2-Zellen freigesetzten Zytokine IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 führen zu einer anhaltenden Immunreaktion. Dieser Cocktail aus mannigfaltigen Mediatoren in den Atemwegen schädigt nicht nur Endothelzellen, Epithelzellen und Zellen der glatten Muskulatur, sondern veranlasst diese Zellen auch proinflammatorische Stoffe freizusetzen, was eine Steigerung der Entzündung bewirkt [9]. Eine grundlegende Eigenschaft dieser Erkrankung assoziiert mit allergischer Sensibilisierung besteht in der Fähigkeit des Immunsystems übliche umweltbedingte Allergene zu erkennen und eine Th2-spezifische Immunantwort zu erzeugen [27].

1.3 T-Effektorzellen in Asthma bronchiale

Zur Aufklärung der Asthmapathogenese wurde in den letzten 30 Jahren eine Reihe von Untersuchungen, überwiegend in Tiermodellen, durchgeführt. Die Heterogenität dieser Erkrankung liegt nicht nur in der Interaktion zwischen verschiedenartigen Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Allein die erworbene Immunität bei allergischem Asthma bronchiale wird durch unterschiedliche T-Lymphozytenpopulationen charakterisiert. Insgesamt lassen sich mehrere Untergruppen von T-Helfer-Zellen, wie Th1-, Th2-, Th9-, Th17-Zellen, wie auch andere T-Zelltypen wie CD8⁺-, γδ-, Treg- und NKT-Zellen, unterscheiden. Dabei ist der erste Kontakt mit dem spezifischen Antigen und das Zytokinmilieu für die Differenzierung einer naiven T-Zelle in eine Effektorzelle entscheidend [28].

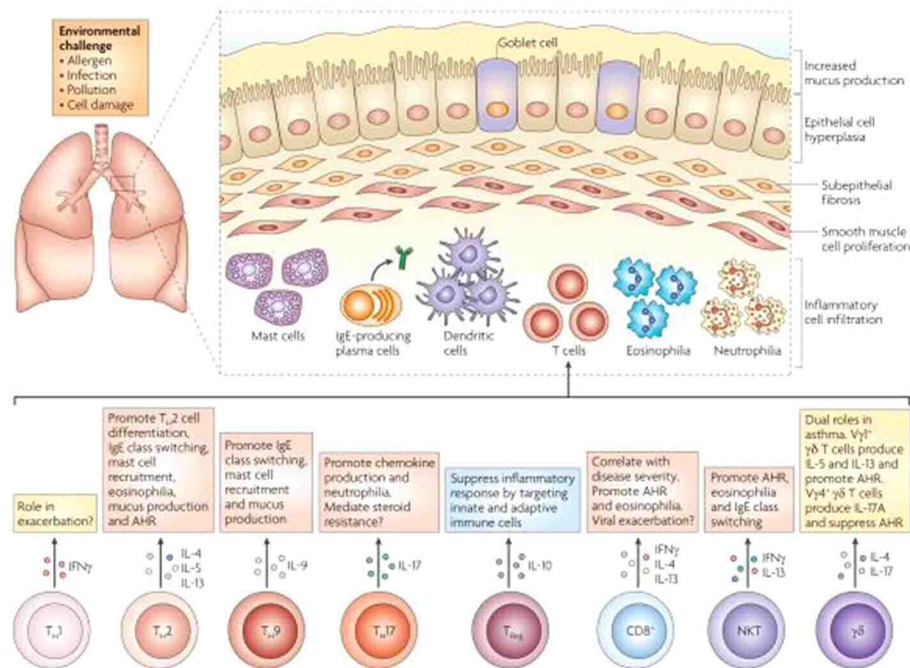


Abbildung 3: T-Zelllinien beteiligt an einem allergischen Phänotyp.

Je nach Komplexität und Heterogenität des Krankheitsbildes wurde eine Vielzahl verschiedener T-Zellpopulationen in Asthma Bronchiale identifiziert, die Unterschiede in ihrer Funktionalität aufweisen. Durch die freigesetzten Zytokine modulieren sie die Art und das Ausmaß der allergischen Reaktion. Quelle:[28]

1.3.1 Die Th2-Immunantwort

Interleukin-4

IL-4 ist das wichtigste Effektormolekül der Th2-Zellen und zugleich verantwortlich für die Bildung von den Typ2 Helferzellen [29]. Das zur Differenzierung der Th2-Zellen benötigte IL-4 stammt möglicherweise aus aktivierten NK1.1⁺ T-Zellen, Mastzellen, Basophilen und Eosinophilen, aber keine einzelne dieser IL-4 Quellen erwies sich als unerlässlich [30]. Die größte Beachtung finden allerdings NK1.1⁺ T-Zellen, denen sowohl eine rapide Freisetzung von IL-4 nach *in vivo* Stimulation mit anti-CD3, als auch eine Glykokortikoidresistenz nachgewiesen wurde [31, 32]. Andere Studien zeigten aber auch, dass IL-6, sezerniert von APC, die IL-4 Expression in naiven CD4⁺ T-Zellen fördert. Das wenig produzierte IL-4 leitet seine eigene Genexpression und die von IL-4R durch autokrine Wirkung ein, was zur Proliferation und Differenzierung von Th2-Effektorzellen führt [33]. Eine weitere wichtige Funktion besteht in der Induktion des Immunglobulinwechsels von IgM/D zu IgG1 und IgE Isotypen, welche eine allergische Reaktion vermitteln [34, 35]. Humane Studien zeigten in atopischen Individuen einen hohen Gesamt-IgE-Titer assoziiert mit einer übermäßigen Amplifikation von Th2-Zellen. Als Ursache hierfür wurden einige der multiplen Allelformen des humanen IL-4 Promotors diskutiert, die mit einer Überexpression des IL-4 Gens in Verbindung stehen [36, 37]. IL-4, bekannt auch als B-Zell stimulierender Faktor (BSF-1), regt die Expression von MHC-II, CD23 (FC_εRII) Molekülen auf B-Lymphozyten an [38]. Dieses Zytokin hat ein breites Wirkungsspektrum, unter anderem auch auf viele Stammzellen [39]. Der IL-4 Rezeptor Typ I ist ein Komplex, bestehend aus einer α -Kette (p140, IL-4R α) und eine γ -Kette (γ c-Kette), der nur auf hämatopoetischen Zellen exprimiert wird. Der IL-4R α und der IL-13R α 1 bilden den IL-4 Rezeptor Typ II, der sowohl IL-4 als auch IL-13 bindet und auf hämatopoetisch- und nicht hämatopoetisch- stammenden Geweben (Endothelialzellen, Epithelzellen, Fibroblasten und Muskelzellen) zu finden ist [40]. Es wurde gezeigt, dass die Expression von IL-4R α auf Zellen der glatten Muskulatur nicht zur Hyperreagibilität beiträgt [41]. Lungenbiopsien von asthmatischen atopischen Patienten wiesen eine verstärkte mRNA und Proteinsynthese von IL-4R α in Epithel- und Endothelialzellen auf [42]. Das Auslösen vieler pulmonaler Erkrankungen durch die Th2-Immunantwort wurde mehrfach bewiesen. In

verschiedenen experimentellen Tiermodellen, wie IL-4^{-/-} defizienten oder transgenen Tieren oder durch eine Blockade von IL-4 durch sIL-4R, wurde belegt, dass die späte Th2-Immunreaktion, sowie die Eosinophilie und die IgE-Produktion beeinträchtigt werden, aber nicht die AHR [43, 44].

Interleukin-5

Ursprünglich wurde IL-5 als T-Zell-ersetzender Faktor (TRF = T cell-replacing factor) Anfang der 1980er identifiziert, der das Wachstum und die Differenzierung von murinen B-Zellen unterstützt [45, 46]. Die ersten *in vitro* Studien mit humanem und murinem rIL-5 bewiesen seinen chemoattraktorischen Effekt auf eosinophile Granulozyten [47]. Mittels *in vivo* Experimenten konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass die IL-5 Genexpression essentiell für die Induktion von eosinophilen Zellen ist. Zum einen wurden retrovirale Konstrukte in Knochenmarkzellen inseriert, die eine chronische Produktion von IL-5 in dem Mausmodell aufwies. Dabei wurde eine rapide Vermehrung von Eosinophilen im Blut und verschiedenen Geweben wie Knochenmark, Milz, Leber, Lunge und Peritoneum, als auch von B-Zellen beobachtet [48-50]. Zum anderen wurde gezeigt, dass IL-5 ein entscheidender Differenzierungsfaktor für eosinophile Granulozyten und ihre Langlebigkeit darstellt [51]. Es spielt auch eine wichtige Rolle bei dem Überleben, der Proliferation und der Immunglobulinproduktion von reifen B-1 Zellen [52]. Interleukin-5 wird sowohl von hämatopoetischen Zellen, wie T-Zellen (Th2-Zellen, Tc2-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen, NK-T-Zellen), Mastzellen, Granulozyten, NK-Zellen, als auch von nicht-hämatopoetischen Zellen einschließlich Epithelialzellen sezerniert [53, 54]. Die konstitutive Überexpression von IL-5 in Lungenepithelzellen führte zur dramatischen Akkumulation von Eosinophilen in den Atemwegen und erhöhte die AHR begleitet von mehreren pathologischen Veränderungen. Dazu gehörten die Bildung von B- und T-Zellaggregaten, übermäßige Vermehrung von Gobletzellen, epitheliale Hyperplasie und Hypertrophie sowie die Kollagen Disposition [55]. Durch den Verlust von IL-5R α wurde die Rolle von IL-5 in Atemwegsveränderungen, wie subepitheliale und peribronchiale Fibrose in asthmatischen Lungen nachgewiesen [56]. In Biopsien und Serum von Asthmatikern wurde eine erhöhte IL-5 mRNA-Expression und -Produktion dokumentiert] und eine zusätzliche IL-5 Provokation induzierte und

verstärkte die bronchiale Hyperreaktivität und Eosinophilie [58]. Eine mangelnde IL-5 Produktion infolge von Mutationen im IL-5 Locus oder das Fehlen des IL-5 Rezeptors führten zu Entwicklungs- und Funktionsbeeinträchtigungen der Eosinophilen und B-Lymphozyten [54, 59, 60].

Interleukin-13

Das T-Helper Typ2 Zytokin, Interleukin-13 wurde in humanen aktivierten T-Lymphozyten entdeckt. Anfängliche Forschungen zeigten seine direkte Wirkung auf die Proliferation und Differenzierung von humanen Monozyten und B-Zellen sowie die Induktion des Klassenwechsels von IgM zu IgE [61]. Um eine Antwort über weitere Eigenschaften von IL-13 zu bekommen, wurden viele unterschiedliche Mausmodelle generiert. Die IL-13 transgene Überexpression in der Lunge induzierte die Infiltration von verschiedenartigen inflammatorischen Zellen, bronchiale Überempfindlichkeit und morphologische Veränderungen der Atemwege, wie epitheliale Hypertrophie, Hyperplasie, Mukushypersekretion, Fibrose usw. [62]. Zur Induktion einer bronchialen Hyperreagibilität genügt sogar nur die direkte Wirkung von IL-13 auf respiratorische Epithelzellen [63]. Allerdings führte eine Abnahme von IL-13 lediglich zum Abklingen der Eosinophilie und der Mukusproduktion in der Lunge [64]. Erst eine Blockade von IL-13 in asthmatischen Tieren bewirkte eine vollständige Aufhebung der AHR und der Schleim sezernierenden Goblet-Zellen [65]. Es wurde publiziert, dass in der Lunge IL-13 durch Kalziumabhängige und – unabhängige Wege die Kontraktilität der glatten Muskulatur induziert [66]. Weiterhin wurde *in vitro* nachgewiesen, wie IL-13 bronchiale Epithelzellen zur Proliferation anregt [67], aber einen apoptotischen Effekt auf alveolare Epithelzellen Typ II hat [56]. In Fibroblasten stimuliert dieses Th2 Zytokin die Expression profibrotischer Gene, Integrine und Adhäsionsmoleküle und reguliert die Expression seines eigenen Rezeptors (IL-13 R α 1) [68, 69]. Bis heute wurden zwei Typen von IL-13 Rezeptoren identifiziert: IL-13 α 1 und IL-13R α 2. Der lösliche IL-13R α 2 wird als negativer Inhibitor betrachtet, der infolge verstärkter IL-13 Produktion sezerniert wird und freie IL-13 Moleküle mit hoher Affinität bindet. Während der membrangebundene IL-13 α 1 das IL-13 mit niedriger Affinität bindet und anschließend mit IL-4R α heterodimerisiert, wobei verschiedene Signalkaskaden ausgelöst werden. Der IL-13R (IL-4 α /IL-13 α 1) wird sowohl auf hämatopoetischen (hB-Zellen, Monozyten, Makrophagen,

Dendritische Zellen, Eosinophilen, Basophilen), als auch auf nicht-hematopoetischen (Fibroblasten, Epithelzellen, glatte Muskelzellen) Zellen exprimiert [70-72]. Wichtige Quellen dieses Zytokins stellen T-Zellen (CD4⁺, CD8⁺, NKT-Zellen), Mastzellen, eosinophile und basophile Granulozyten dar [73].

Eosinophilie

Der eosinophile Granulozyt, beobachtet das erste Mal von Wharton Jones 1846 in ungefärbten Blutpräparaten, bekam seine Benennung durch Paul Ehrlich im Jahr 1879 [74]. Von diesem Zeitpunkt an folgten intensive Untersuchungen an diesem granulären Leukozyt, der heutzutage durch vielfältige biologische Eigenschaften charakterisiert ist. Unter anderem ist er ein pleiotropischer mannigfaltiger Leukozyt, der sowohl in dem angeborenen als auch in dem erworbenen Immunsystem an der Aktivierung und Weitergabe von verschiedenen entzündlichen Reaktionen beteiligt ist. Der Lebenszyklus von eosinophilen Zellen ist in drei Phasen gegliedert. Nach dem sie von pluripotenten Stammzellen im Knochenmark gebildet werden, zirkulieren sie im Blut und setzen sich anschließend ins Gewebe [75]. In gesunden Individuen sind Eosinophile in Darm, Milchdrüse, Uterus, Thymus und Knochenmark zu finden und spielen bei der Homöostase eine Rolle [76, 77]. Diese Granulozyten sezernieren vier basische Proteine: MBP (major basic protein), ECP (eosinophilic cationic protein), EDN (eosinophil-derived neurotoxin) und EPO (eosinophil-derived peroxidase). MBP, EPO, ECP wirken toxisch auf das Bronchialepithel. Die Freisetzung von MBP und EPO induziert zusätzlich eine Bronchokonstriktion und eine bronchiale Hyperreagibilität. MBP agiert direkt mit der glatten Muskulatur der Lunge und beeinträchtigt die Kontraktionen infolge der Dysregulation von Muskarinrezeptoren (M2 und M3) [78]. Zugleich stimuliert es die Degranulation von Mastzellen, Basophilen und Neutrophilen, was die inflammatorische Antwort verstärkt. Die nicht toxische Aktivität von ECP beeinflusst die Mukussekrektion und die Immunglobulinsynthese [16, 25]. Es wurde gezeigt, dass respiratorische eosinophile Granulozyten verschiedene immunregulatorische Funktionen ausüben. Sie besitzen die Fähigkeit für Internalisation, Prozessierung und Präsentation von Antigenen (MHC-II) sowie die Expression der costimulatorischen Oberflächenmarker CD80, CD86 und CD40, was das Interagieren mit CD4⁺ T-Zellen ermöglicht [79, 80]. Eosinophile stellen die Quelle von mindestens 35 regulatorischen und

proinflammatorischen Zytokinen (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, TNF- α , GM-CSF [81, 82], TGF- β usw.), die sie nach ihrer Rekrutierung in die Atemwege freisetzen, dar [83]. So fördern sie die Proliferation, Aktivierung und Polarisation von T-Zellen, was zu einer verstärkten Entzündung führt. Im Weiteren sezernieren sie Chemokine (Eotaxin-1, RANTES) sowie Leukotriene und Prostaglandine [77].

B-Zellen und Immunglobulinwechsel

In Asthma Bronchiale wird die humorale Immunantwort, die mit der Aktivierung und Differenzierung von naiven B-Zellen zu antikörpersezernierenden Plasmazellen assoziiert wird, durch Antigen-induzierte Th2-Zellen ausgelöst. Alle naiven B-Lymphozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche IgM und IgD, die ersten schweren Ketten im Immunglobulinloкус. Erst der direkte B-T-Zellkontakt vermittelt durch Bindung an den B-Zell-Rezeptor (BZR) und an CD40, sowie den zusätzlichen Einfluss von Interleukinen, induziert die B-Zellproliferation und später deren Differenzierung. Es gibt fünf Immunglobulinklassen im Säugergenom: IgM, IgD, IgG (Human-IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), (Maus-IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3), IgA (IgA1, IgA2) und IgE [84, 85]. Studien bewiesen die Wichtigkeit der CD40-CD40L Interaktion, die für den Isotypwechsel notwendig ist. Auch einige Zytokine wie IL-4, IFN- γ , TGF- β und IL-10 modulieren den Klassenwechsel, der mit der Zellteilung gekoppelt und somit ein langsamer Prozess ist. Die Gegenwart von IL-4 und/oder IL-13 fördert die IgG1 und IgE Synthese und unterdrückt die Expression von IgG2a, IgG2b und IgG3. Der Wechsel zu IgG1 benötigt drei Zellteilungen und steht in Korrelation mit der früheren Produktion dieses Antikörpers. Im Gegensatz dazu werden fünf Zellteilungen zum IgE-Switch benötigt. *In vitro* und *in vivo* Daten bestätigen die Expression von IgE an der B-Zelloberfläche circa 6 Tage später, gefolgt von der B-Zelldifferenzierung und die IgE-Freisetzung an Tag 10. Zur Synthese von IgE und IgG1 werden jedoch verschiedene regulatorische Mechanismen infolge der IL-4 Stimulation vermutet, die auch abhängig von der Zytokinkonzentration sein können [86-88]. IgE stellt den wichtigsten Antikörper für die Induktion einer allergischen Reaktion dar. Die Halbwertszeit von IgE im Serum beträgt 3 Tage im Vergleich zur IgG-Halbwertszeit von 20 Tagen. Der Grund dafür liegt an der Interaktion von IgE mit Mastzellen und basophilen Zellen im Gewebe [89]. Atopische Individuen weisen

einen 10fach erhöhten IgE-Level gegenüber nicht atopischen Individuen auf [90]. Allerdings wurde bei bronchoskopischen Untersuchungen eine konstitutive Expression von ϵ -Transkripten sowohl in atopischen als auch nicht atopischen Probanden detektiert [91]. IgE bindet am hochaffinen Fc ϵ RI, der sehr stark (ca. 200.000 Moleküle/Zelle) auf Mastzellen und Basophilen und weniger auf Langerhanszellen, Monozyten, dendritischen Zellen und Eosinophilen exprimiert wird. Der niedrigaffine Fc ϵ RII (CD23) ist auf Lymphozyten zu finden [92].

1.3.2 Die Th1-Immunantwort

IFN- γ ist das Hauptzytokin sezerniert von Th1-Zellen, das gewöhnlich als Gegenspieler und Suppressor der Th2-Immunantwort im allergischen Asthma betrachtet wird [93]. Allerdings stellen die stärksten IFN- γ -Produzenten im Körper nicht ausschließlich CD4⁺ Th1-Lymphozyten, sondern auch zytotoxische CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen dar. Außerdem wird IFN- γ in vergleichbar geringeren Mengen von $\gamma\delta$ -T-Zellen, NK T-Zellen, Makrophagen, Dendritischen Zellen und sogar von B-Zellen sezerniert [94-96]. Die hemmende Wirkung von IFN- γ auf allergische Reaktionen wird durch verschiedene Mechanismen vermittelt. Eine der wichtigsten Funktionen von IFN- γ ist die Förderung der Expression von MHC-I und MHC-II Molekülen auf unterschiedlichen Zelltypen, besonders auf Makrophagen. Im Vergleich dazu unterdrückt IFN- γ die Antigenpräsentation sowohl auf Dendritischen Zellen als auch auf Mastzellen und unterbindet so die Aktivierung, Proliferation und Zytokinproduktion von CD4⁺Th2-Zellen [97, 98]. Es wurde gezeigt, dass IFN- γ die Aktivierung, Differenzierung und Ansammlung von Eosinophilen reguliert, indem die Expression des Eotaxinrezeptors (CCR3) reduziert wird [99]. Die IFN- γ induzierte NO-Synthese verhindert die Degranulation von Mastzellen und zudem wirkt NO als Bronchodilatator, als auch antiproliferativ auf glatte Muskelzellen [93, 100]. IFN- γ inhibiert den Immunglobulinklassenwechsel zu IgG1 und IgE. Es hemmt die durch IL-4 vermittelte B-Zellproliferation sowie die Degranulation von Mastzellen, Basophilen und Eosinophilen. Stattdessen steigert es die IgG2a und IgG3 Produktion, ein IFN- γ konzentrationsabhängiger Prozess [35, 94, 101]. IFN- γ beeinflusst ebenfalls die IL-13 Immunantwort durch die verstärkte Expression der IL-13R α 2, der die IL-13 Kaskade in Th2-Zellen vermindert [102]. Eine Reihe von Experimenten zeigte die Rolle von IFN- γ in der T-Zell-Homöostase. Es wurde bewiesen, dass IFN- γ die T-Zell-

Expansion durch Verringerung der Lebensfähigkeit der T-Zellen und nicht durch die Hemmung des Zellzyklus reduziert [103]. In Asthma Bronchiale spielt die Th1/Th2 Balance eine entscheidende Rolle, die eher auf eine gestörte IFN- γ -Produktion und weniger auf eine Th2-Zytokinproduktion zurückzuführen ist [104, 105]

1.3.3 Die Th17-Immunantwort

Th17 Lymphozyten sezernieren eine Vielzahl von Zytokinen, aber überwiegend IL-17A und IL-17F [106]. IL-17 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das für die Eliminierung verschiedener Pathogene verantwortlich ist [107, 108]. *in vivo* Daten zeigten den Einfluss von IL-17 auf hämatopoetische Zellen (Granulopoese) und die daraus resultierende Expansion, Reifung und Chemotaxis neutrophiler Zellen [109]. IL-17 wird mit vielen Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis, multiple Sklerose, systemischer Lupus Erythematoses, sowie Asthma und COPD in Verbindung gebracht [110]. Eine Reihe von Studien konnten signifikant hohe IL-17A und IL-17F Werte im Sputum und Blutserum von Patienten mit mittelschwerem bis schwerem allergischem Asthma sowie auch eine erhöhte Expression beider Zytokine im Bronchialgewebe zeigen [111, 112]. Fibroblasten, welche aus asthmatischen Lungen isoliert wurden, produzierten profibrotische Zytokinen (IL-6, IL-8, IL-11) unter dem Einfluss von IL-17 [113]. Zusätzlich aktiviert IL-17 andere Zelltypen in der Lunge, wie Epithelzellen, Endothelzellen, Zellen der glatten Muskulatur, Keratinozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen [114]. In nicht atopischen Asthmatikern wurde eine starke Neutrophilie in Korrelation mit dem Schweregrad der Erkrankung gefunden [115, 116]. Dagegen wurde in murinen Modellen beschrieben, dass eine IL-17 Behandlung inhibitorische Wirkung auf die lokale Freisetzung der Th2 Zytokine, IL-4, IL-5 und IL-13 hat [117]. IL-17 wird nicht ausschließlich von CD4⁺ T-Lymphozyten produziert, sondern auch von anderen Zellpopulationen, wie CD8⁺ T-Zellen, NK T-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen, Neutrophilen, Eosinophilen, Basophilen und Mastzellen [118]. Allerdings ist die Rolle von IL-17 in Asthma bronchiale immer noch umstritten und erfordert noch weitere intensive Forschungen.

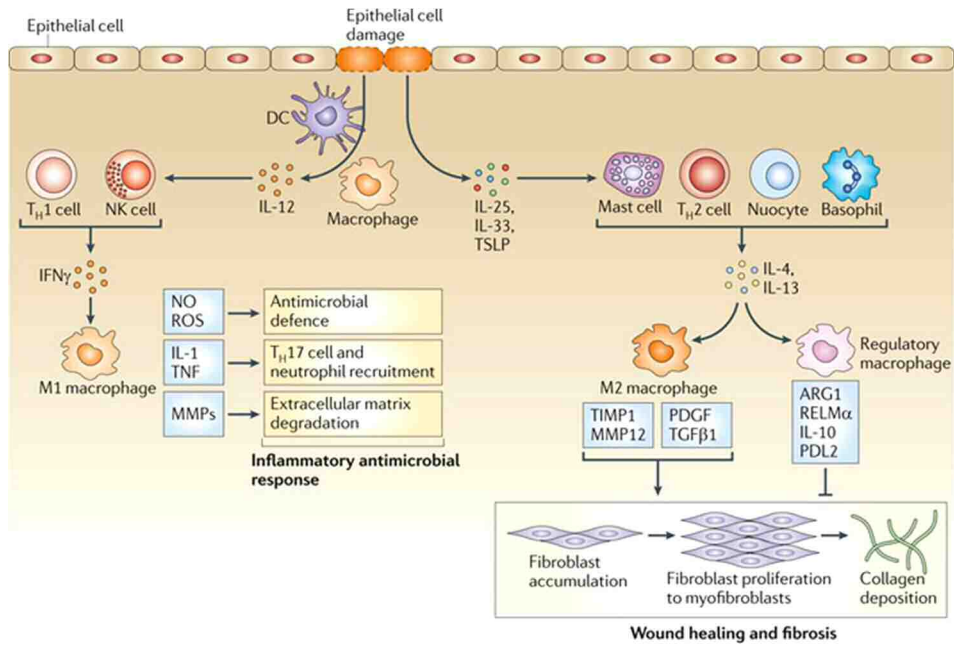
1.4 Makrophagen

Der Begriff Makrophage wurde von dem ukrainischen Biologen Élie Metchnikoff geprägt, der als erster im Jahr 1883 die Theorie über phagozytierende weiße Blutkörperchen veröffentlichte. Seine Hypothese wurde 1892 durch experimentelle Erkenntnisse, in Invertebraten und Vertebraten, belegt [119, 120].

Die Entwicklung von Makrophagen beginnt bereits im Knochenmark (Stammzellen -> Monoblasten -> Promonozyten -> Monozyten). Die Differenzierungsschritte stehen unter dem Einfluss verschiedener Faktoren, wie IL-3, GM-SCF und M-SCF. Pro Tag werden 5×10^9 Monozyten produziert und in den Blutkreislauf sezerniert. Periphere Blutmonozyten migrieren nach einer kurzen Zirkulationsphase von circa 18 Stunden in extravaskuläre Targetgewebe und differenzieren anschließend zu Makrophagen. Die angesiedelten Phagozyten verfügen über eine Lebensdauer von wenigen Tagen bis mehreren Wochen [120, 121]. Diese so genannten mobilen Makrophagen werden nach Bedarf infolge einer Entzündungsreaktion gebildet. Jedoch machen die ortsständigen langlebigen Gewebemakrophagen, mit proliferativen Eigenschaften, die größte Makrophagenpopulation aus. Sie stellen sowohl morphologisch, als auch funktionell, eine sehr heterogene Population dar, basierend auf ihrer anatomischen Lokalisation und das umgebende Zytokin- und Wachstumsmilieu. In der Leber werden sie als Kupfer-Sternzellen, im Bindegewebe als Histozyten, im Knochen als Osteoklasten, in der Niere als Mesangialzellen, im Gehirn als Mikrogliazellen, in der Serosa als Pleural- und Peritonealmakrophagen definiert [120, 122]. In der Lunge selbst wurden drei verschiedene Makrophagentypen (alveolare, interstitielle und intravaskuläre Makrophagen) identifiziert [123]. Diese lokalen Makrophagen spielen eine zentrale Rolle beim Erhalt der immunologischen Homöostase [124]. Sie gehören zum angeborenen Immunsystem und bilden zusammen mit anderen Zellen im Respirationstrakt eine erste Verteidigungslinie gegen viele unterschiedliche harmlose und infektiöse Erreger. Alveolare Makrophagen, die 80-95 % der alveolaren Leukozytenpopulation ausmachen, adhären unter homöostatischen Bedingungen an Alveolar-Epithelzellen [125] und stehen so kontinuierlich in Kontakt mit inhalieren Substanzen [124, 126]. Durch pharmakokinetische Studien mit Peptiden und Proteinen wurde belegt, dass Makrophagen eine primäre Barriere zur Aufnahme von Stoffen in die Blutbahn darstellen [127, 128].

Ihre Funktion in Asthma Bronchiale, die kontrovers betrachtet wird [129], wurde in den letzten Jahren verstärkt erforscht. *In vivo* Forschungen ergaben, dass die pulmonale Immunantwort infolge der Depletion alveolarer Makrophagen mittels Cl₂MDP-Liposomen-Behandlung, beeinflusst wurde [130, 131]. Eine verstärkte Infiltration eosinophiler Granulozyten und Lymphozyten, sowie ein erhöhter Th2 Zytokinlevel in der BAL wurde ermittelt. Allerdings konnte der Transfer unsensibilisierter Makrophagen, nicht aber der von sensibilisierten Makrophagen, die induzierte Entzündung reduzieren, dies ist auf die unterschiedlichen funktionellen und phänotypischen Eigenschaften dieser Zellen zurückzuführen [131]. Alveolare Makrophagen sind durch die Expression von F4/80⁺CD11c⁺ und ihre hohe phagozytäre Aktivität charakterisiert. Allerdings fungieren sie als schwache APCs und somit als schwache T-Zellaktivatoren. Im Gegensatz dazu weisen, die sich im Parenchym befindenden interstitiellen Lungenmakrophagen (F4/80⁺CD11c⁻), ein niedriges phagozytisches Potenzial auf. Ihnen wurde jedoch eine erhöhte MHC-II Expression vergleichbar der von Dendritischen Zellen nachgewiesen, sowie ihre stimulierende Wirkung auf die T-Zellproliferation, *in vitro* [132].

Makrophagen wird eine pleiotropische Rolle in allen Geweben und Organen zugeschrieben. Abhängig von dem umgebenden Milieu werden sie in drei Haupttypen klassifiziert – die klassisch aktivierten Makrophagen, die alternativ aktivierten Makrophagen und die regulatorischen Makrophagen. Das klassisch aktivierte Makrophagenprofil (MΦ1) wird sowohl durch exogene (bakterielle Teile wie Lipopolisaccharide, Viren) als auch durch endogene Stimuli wie IFN-γ ausgelöst. Hingegen erfolgt die alternative MΦ2-Polarisation ausschließlich über die Th2 Zytokine IL-4 und IL-13, Glykokortikoide und Prostaglandine. Viele Botenstoffe und apoptotische Zellen induzieren das regulatorische immunosuppressive MΦ-Profil [134-139]. Mittels Rezeptoren an der Zelloberfläche erkennen Makrophagen pathogene sowie harmlose Erreger und können zwischen körpereigenen und körperfremden Oberflächenstrukturen unterscheiden. Zu diesen Rezeptoren gehört der Scavenger-Rezeptor, der Mannoserezeptor, CD14, Komplementrezeptor (CR1-CR3), Chemokin- und Zytokinrezeptoren [140-143], G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (F4/80), Toll-like Rezeptoren [123].



Nature Reviews | Immunology

Abbildung 4: Darstellung der Makrophagentypen.

Das Zytokinmilieu bestimmt den Makrophagenphänotyp. Man unterscheidet zwischen klassisch und alternativ aktivierten Makrophagen sowie regulatorischen Makrophagen. Die Ersten bekannt als Effektor- oder M1-Makrophagen differenzieren unter dem Einfluss von IFN- γ . Sie sind an Entzündungsreaktionen durch die Freisetzung von NO, reaktive ROS, IL-1, TNF und MMPs beteiligt. Makrophagen, die sich in einem IL-4/IL-13 Milieu befinden, entwickeln sich zu M2-Makrophagen. Sie spielen eine Schlüsselrolle in der Wundheilung, indem sie TIMP1, PDGF, TGF- β sezernieren. Verschiedene Faktoren führen zur Differenzierung und Aktivierung regulatorischer Makrophagen, die durch die erhöhte Expression von Kostimulatoren, (CD80/CD86) und MHC-Peptid-Komplexen als professionelle APCs fungieren. Sie setzen IL-10 und einige weitere Proteine, die den Heilungsprozess fördern und die Homöostase wiederherstellen. Quelle: [133].

1.5 Interleukin-10

Interleukin-10 gehört zu einer Familie bestehend aus 9 Mitgliedern (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28A, IL-28B und IL-29), die in drei Gruppen, basierend in erster Linie auf ihre biologischen Funktionen, unterteilt werden [144]. IL-10, anfangs beschrieben als „Cytokine Synthesis Inhibitor Factor“ (CSIF) von IL-2 und IFN- γ , ist der Erste in dieser Familie [145]. IL-10 ist ein pleiotropisches Zytokin mit anti-inflammatorischen und immunsuppressorischen Eigenschaften. Eine sehr wichtige Quelle für IL-10 stellen Monozyten und Makrophagen dar, sowie Th2- und Treg-Zellen [146]. Ferner wird es von B-Zellen, dendritische Zellen, $\gamma\delta$ T-Zellen, zytotoxischen T-Zellen, NK-Zellen, Mastzellen und nicht zuletzt von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten synthetisiert [147-152]. Studien belegten, dass mononukleäre Zellen und Makrophagen von asthmatischen Patienten einen niedrigen mRNA-Level und Sekretion von IL-10 aufweisen, im Gegensatz zu der konstitutiven Expression in der Lunge gesunder Probanden. Als Ursache wurde eine relativ große Zahl genetischer Polymorphismen, hauptsächlich Single-Nukleotid-Polymorphismen, im IL-10 Locus gefunden [153]. In einem murinen Asthmodell erwies sich die IL-10 Behandlung zu verschiedenen Zeitpunkten als sehr effizient. Vor der Sensibilisierungsreaktion führte die IL-10 Zugabe zu einer niedrigen Th2-Zytokinantwort, in der Lunge und der Milz. Des Weiteren wurde eine signifikante Erniedrigung der IgE-Synthese beobachtet. Während der Effektorphase führte die IL-10 Therapie sogar zu einer reduzierten Bronchialhyperreaktivität und Eosinophilie in der Lunge, die auf eine Suppression der MHC-II-Peptide, CD40, CD80, CD86 auf CD11c⁺(DCs) und ihre Migrationsunfähigkeit zu den Lymphknoten zurückzuführen ist [154]. Verschiedene exogene Stimuli wie das bakterielle Endotoxin Lipopolysaccharide, wie auch viele endogene Mediatoren (Katecholamine, Zelltrümmer), regulieren durch den Toll-like-Rezeptor einige Signalwege (NF- κ Bp65/p50, ERK, PI3K/Akt) in Makrophagen, die die IL-10 Produktion induzieren [155-157]. Die Beseitigung von früh apoptotischen Zellen durch IL-10 sezernierende Makrophagen ist essentiell für die zelluläre Homöostase und die Verhinderung von Autoimmunität [158, 159]. Zudem werden viele Funktionen von Makrophagen, wie die Zytokinsynthese, die Antigenpräsentation (MHC-II) und die Expression von costimulatorischen Molekülen (CD80/CD86) durch die immunsuppressorische Wirkung von IL-10 beeinträchtigt [160]. Zugleich fungiert IL-10 als wirksamer

Wachstumsfaktor für B-Lymphozyten. Es fördert die Proliferation der B-Zellen, deren Antikörperproduktion und MHC-II-Expression. Auf der anderen Seite spielt die IL-10 Synthese durch regulatorische B-Zellen eine entscheidende Rolle in der Kontrolle von Autoimmunerkrankungen [161]. Ursprünglich wurde IL-10 als Th2 Zytokin identifiziert und seine Coexpression mit IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 in Asthma ist bekannt. Forschungsergebnisse zeigten allerdings, dass IL-10 sezernierende regulatorische T-Zellen die allergenspezifische Th2 Immunantwort regulieren [162, 163]. IL-10 inhibiert die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , GM-CSF und IFN- γ durch direkte und indirekte Mechanismen. Der IL-10 Rezeptor besteht aus zwei Ketten, IL-10R α und IL-10R β . IL-10R α bindet IL-10 und IL-10R β löst die Zellkaskade aus. Der IL-10R α , der hauptsächlich auf Immunzellen zu finden ist, weist grundsätzlich eine niedrige Expression, circa 100-800 Moleküle pro Zelle, auf [164]. Der höchste IL-10R α -Level wurde auf Gedächtnis- und naiven CD4⁺ T-Zellen detektiert [165]. Es ist anzumerken, dass auf Monozyten und Makrophagen die höchste IL-10R Expression beider Ketten gezeigt wurde [166]. Im Gegensatz dazu wird der IL-10R β , der gleichzeitig Teil anderer Rezeptorkomplexe ist (bindend IL-22, IL-26, IL-28 und IL-29), stark auf allen anderen Zellen exprimiert [167, 168].

1.6 Das humane Choriongonadotropin (hCG)

Das humane Choriongonadotropin ist ein Glykoprotein, dessen Wirkung zum ersten Mal im Jahr 1912 vom Arzt und Physiologen Bernhard Aschner beschrieben wurde. Zu diesem Zeitpunkt war noch unbekannt, welche Substanz in dem Plazentaextrakt das Wachstum des Uterus bei den Versuchstieren stimulierte. 1927 konnten Aschheim und Zondek das Hormon im Urin von Schwangeren nachweisen und ein Jahr später wurde die erste sichere Methode für die Feststellung einer Frühschwangerschaft etabliert. 10 Jahre danach gab Ernst Philipp den ersten Hinweis, dass dieses Gonadotropin aus der Plazenta stammt. Das Hormon selbst wurde erst später isoliert [169].

HCG ist ein heterodimeres Gonadotropin mit einem Molekulargewicht von 38 kDa bestehend aus 237 Aminosäuren. Weiter besteht es aus einer α - und einer β -Untereinheit, die durch nicht-kovalente hydrophobe und ionische Wechselwirkungen miteinander verbunden sind. Beide Untereinheiten werden getrennt synthetisiert. Ein

einziges Gen kodiert die kleine α -Subeinheit mit 92 Aminosäuren. Im Gegensatz dazu ist eine Familie aus mindestens sechs Genen für die Synthese der großen β -Subeinheit mit 145 Aminosäuren zuständig. Die hypophysären Glykoproteine, bestehend aus dem Thyreoidea-stimulierenden Hormon (TSH), das luteinisierende Hormon (LH) und das follikelstimulierende Hormon (FSH), besitzen die gleiche α -Untereinheit wie das humane Choriongonadotropin, unterscheiden sich aber in der hormonspezifischen β -Untereinheit [170]. Des Weiteren gehört hCG zusammen mit den oben genannten Proteinen zur Familie der Cysteinoknoten-Wachstumsfaktoren, die durch eine Disulfidverbindung, an der sechs Cystine beteiligt sind, charakterisiert ist [171]. Die alpha Untereinheit ist für die Rezeptorbindung und die beta Untereinheit für die Signalkaskade zuständig [172]. Das humane Choriongonadotropin ist ein ungewöhnliches Molekül, weil 25-41 % von seinem Molekulargewicht auf Zuckerseitenketten zurückzuführen ist (25-30 % im regulären hCG und 35-41 % im hyperglykolysierten hCG). Die aktuellen Forschungen belegen, dass 5 Varianten von hCG existieren, die jeweils von verschiedenen Zellen mit unterschiedlichen biologischen Funktionen produziert werden. Dies sind das reguläre hCG, das hyperglykolysierte hCG, das β -hCG und die hyperglykolysierte freie β -Form sowie das pituitäre sulfatierte hCG [173]. Das Choriongonadotropin wird überwiegend von villösen Trophoblasten in der Plazenta gebildet und sezerniert. Seine physiologische endokrine Wirkung besteht darin, den Abbau von Corpus luteum zu verhindern. Zugleich fördert es die Produktion von Progesteron und bereitet die Gebärmutterschleimhaut auf eine Schwangerschaft vor [174]. Weiterhin ist hCG ein wichtiger autokriner und parakriner Regulator von EGF, TGF und LIF, welche die Blastozystenimplantation begünstigen [175]. HCG hat einen direkten Einfluss auf die Angiogenese und Vaskulogenese in der Gebärmutter [176]. Ebenso wurde bewiesen, dass hCG die Kontraktilität der glatten Muskelzellen mittels verschiedener Mechanismen beeinflussen kann. Zum einen inhibiert hCG die Kontraktionen, indem es die intrazelluläre Konzentration von freiem Kalzium in den Muskelzellen senkt. Zum anderen moduliert hCG die Expression etlicher Phosphodiesterasen (PDE), die cAMP und cGMP hydrolysieren. Eine Inhibierung von cAMP spezifischen PDEs führt zur Muskelrelaxation. Zusätzlich induziert hCG die iNOS-Synthese was zu einer erhöhten Produktion von NO, das als Vasodilator und Relaxans wirkt, führt [177, 178]. Neben den endokrinen, parakrinen und autokrinen Eigenschaften des Schwangerschaftshormons wurde auch teilweise seine immunologische Wirksamkeit

untersucht. Mehrere Forschungsgruppen zeigten unabhängig voneinander, dass hCG die Synthese des Makrophagen-Migrations-inhibitorischen Faktors (MIF) fördert [179]. Außerdem verbessert hCG die phagozytäre Aktivität sowie einige weitere Funktionen von Makrophagen, die das angeborene Immunsystem verstärken [180]. Es wurde ferner die Sekretion des biologisch-aktiven hCG von mononukleären Zellen des peripheren Blutes nachgewiesen [181]. Weiterhin bewirkt das Choriogonadotropin die Produktion des Chemoattractant IL-8 von Monozyten [182], sowie die Migration von regulatorischen T-Zellen ins fetomaternale Interface [183]. Zu dem induziert hCG bei Dendritischen Zellen einen tolerogenen Phänotyp [184]. Die hyperglykolytierte Form von hCG (hCG-H) wird von extravillösen Zytotrophoblasten produziert und fördert das Wachstum von Trophoblastzellen. Diese Form hat im Vergleich zum regulären hCG ein Molekulargewicht von ca. 40-41 kDa, was mit dem Grad der Glykolysierung zusammen hängt. Die zusätzlichen Zuckergruppen beeinträchtigen die Faltung des α/β -Dimers und dies führt zur Entfaltung anderer Bindungsstellen des Hormons mit der Folge seiner antagonistischen Wirkung auf den TGF- β Rezeptor [185, 186]. Mehrere Studien demonstrierten, dass hCG-H, hCG- β und hCG- β H von verschiedenen Tumoren, wie das Chorionkarzinom, Nieren-, Hoden- und Brusttumoren, Prostata-, Lungen-, Ovarialkarzinome, endometriale Adeno- und einige Pankreas- und Magenkarzinome produziert und sezerniert werden. Gleichzeitig wirken sie autokrin und beeinflussen die Invasion und das Wachstum des Tumors [187]. Die sulfatierte Variante wird in geringen Mengen von der Hypophyse während des menstrualen Zyklus produziert. Zusammen mit LH fördert es die Produktion von Androstendion in der Follikelphase des weiblichen Zyklus und unterstützt zugleich den Eisprung und die Entstehung des Corpus luteum und die damit verbundene Progesteronbildung [173].

1.7 Der LH/CG Rezeptor

Die ersten Forschungen über den LH/CGR (Luteinisierendes Hormon/Choriogonadotropin Rezeptor) liegen etwa 40 Jahre zurück und begannen bald nach der Entwicklung markierter Tyrosinreste an humanes CG und LH mit radioaktivem Iod (I^{125}). So konnten die Wechselwirkungen von beiden Hormonen, welche am gleichen Rezeptor binden, untersucht werden [188]. Anfangs wurde die

cDNA des Glykoproteinrezeptors aus der Ratte und dem Schwein kloniert [189-191]. Später wurde der LH Rezeptor von verschiedenen Spezies einschließlich der des Menschen kloniert und erforscht [192-194]. Dieser Rezeptor ist ein Sialoglykoprotein das zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört, die eine der größten und mannigfaltigsten Superfamilien von Oberflächenrezeptoren im Säugergenom (ca. 1 % im menschlichen Genom) darstellen [195]. LHR ist ein einkettiges Protein, gegliedert in eine hormonbindende extrazelluläre Domäne, eine heptahelikale Transmembrandomäne und eine intrazelluläre signalinduzierende Domäne. Der lange N-terminale extrazelluläre Teil mit circa 340 Aminosäuren (Maus) bindet mit hoher Affinität das intakte heterodimere Hormon CG und LH, aber nicht die freien Untereinheiten, die keine spezifische biologische Aktivität besitzen. Die sieben membrandurchspannenden Domänen, verbunden durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Loops, sind für die Verankerung des Rezeptors in der Zellmembran verantwortlich. Der kurze C-terminale Schwanz verfügt über Bindungsstellen für G-Proteine [189, 196]. Es wurden drei verschiedene Formen des Choriongonadotropin-Rezeptors mit einer Molekularmasse von 65-75 kDa, 85-95 kDa und 165-200 kDa mittels Western Blot nachgewiesen. Die reife Form des Rezeptors, welche auf der Zelloberfläche mit einem Molekulargewicht von 85-95 kDa präsentiert wird, entsteht aus dem 65-75 kDa großen Vorläuferglykoprotein, welches im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Die größte Form wurde als oligomeres Aggregat des unreifen Rezeptors beschrieben [192, 197]. Vor einigen Jahren vermutete man noch, dass dieser Rezeptor überwiegend auf der Membran von Leydig-Zellen in den Hoden und Granulosa- und Theka-Zellen in den Ovarien lokalisiert ist. Der hCG/LH-Rezeptor wurde inzwischen außerhalb der Geschlechtsdrüsen, wie Uterus, Ovidukt, Plazenta, Milchdrüse, uterine Makrophagen usw. nachgewiesen [198-201]. Auf plazentalen Makrophagen wurde allerdings eine 9-Exon-Splice-Variante des LH/CG Rezeptors nachgewiesen [201, 202].

Des weiteren wurde seine Expression in bestimmten Arealen im peripheren und zentralen Nervensystem (z.B. Thalamus, Hypothalamus, Hippokampus) belegt, was in Verbindung mit der Neuronalentwicklung gebracht wird [199]. Mittels Immunhistochemie und *in situ* Hybridization wurde der LHR in fast allen Geweben unter anderem in humanen fötalen Nieren, Leber, Lunge, Pankreas, Dünndarm, Dickdarm und Nebennieren nachgewiesen [203]. Es wurden auch mRNA-Transkripte

und eine gewisse Expression des hCG/LH-Rezeptors in peripheren T-Lymphozyten, isoliert aus Schwangeren, detektiert [204].

1.8 Die NAD-abhängige Deacetylase Sirtuin1 (Sirt1)

Entzündliche Lungenerkrankungen wie Asthma Bronchiale, Mukoviszidose, akutes Atemnotsyndrom, chronische obstruktive Bronchitis (COPD) und interstitielle Lungenerkrankungen sind durch eine verstärkte Expression von proinflammatorischen Genen charakterisiert, die für verschiedene entzündungsfördernde Zytokine, Chemokine, Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle und weitere Faktoren kodieren. Es ist bekannt, dass diese Gene durch inflammatorische Transkriptionsfaktoren, zu denen der Nuklearfaktor (NF-) κ B, das Aktivator Protein1 (AP-1), die STATs, GATA1-3 und der T-Zell spezifische Nuklearfaktor (NF-AT) gehören, reguliert werden. Im Vergleich dazu wird die Transkriptionsrepression mittels Histondeacetylasen und anderen Corepressoren vermittelt [205, 206].

Histon-Deacetylasen (kurz HDACs) werden in vier Klassen unterteilt: Klasse I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8), Klasse IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9) und Klasse IIb (HDAC6, HDAC10), Klasse III (Sirtuin1-7) und Klasse IV (HDAC11). Sie weisen Unterschiede in ihrer Struktur, ihrer enzymatischen Funktion, ihrer zellulären Lokalisation und ihrem Expressionsmuster auf [207].

Sirtuine sind evolutionär hoch konservierte Enzyme, die über eine Nikotinamid (NAD⁺)-abhängige Deacetylase Aktivität verfügen. Das erste Mitglied dieser Familie, gefunden in *Saccharomyces cerevisiae*, wurde als Sir2 bezeichnet. Sir2 steht für die englische Bezeichnung „silent information regulator two“. Studien in Hefemutanten führten zur Identifizierung dieses zellulären Proteins, das für die Stilllegung transkriptioneller Aktivitäten durch die Deacetylierung von Histonen sorgte [208]. Das erste Sirtuin-Gen, Sir2, wurde ursprünglich MAR1 (mating-type regulator 1) genannt, weil Mutationen in diesem Genrepressor zur Sterilität führten [209, 210]. In den Jahren danach wurden weitere Funktionen dieser Genregulatoren, verbunden mit Telomeren-DNA, DNA-Reparaturen und deren lebensverlängerndem Effekt, entdeckt [211]. Ferner zeigten Studien an Würmern (*C. elegans*) und Fliegen (*Drosophila melanogaster*), dass eine Sir2 chromosomale Duplikation eine Erhöhung der Sirtuin-Aktivität und eine Verlängerung der Lebensspanne bewirkte. Im Gegensatz dazu beeinträchtigt ein Ausknocken dieses Gens die Lebensdauer [212, 213]. Sirtuine

wurden in allen Lebewesen von Bakterien und Archebakterien bis hin zu Säugern gefunden [214, 215]. Im Säuger genom wurden bis heute sieben Sirtuinproteine (Sirt1-Sirt7) identifiziert. Sie sind in verschiedenen Zellkompartimenten lokalisiert. Sirt1, Sirt6 und Sirt7 sind weitestgehend nukleäre Proteine, die subnukleäre Unterschiede aufweisen. Abhängig von Spezies und Zelltyp ist eine partielle oder temporäre zytoplasmatische Lokalisation von Sirt1 zu beobachten. Sirt2 ist nur im Zytoplasma zu finden. Und Sirt3, Sirt4 und Sirt5 sind mitochondriale Proteine, die mit dem Energiestoffwechsel der Zelle in Verbindung stehen [215, 216]. Die Familie der Sirtuine wurde hinsichtlich ihrer Gensuppression als Typ III Histon-Deacetylasen klassifiziert. Die acetylierten Histone H1, H3 und H4 waren die ersten bekannten Substrate von Sirtuinen. Später erwies sich, dass auch eine große Anzahl Nicht-Histonproteine (Transkriptionsfaktoren, Strukturproteine, Enzymen) von Sirtuinen deacetyliert wird. Alle Mitglieder dieser Familie sind charakterisiert durch eine aus 275 Aminosäuren hochkonservierte katalytische Domäne. Die meisten Sirtuine besitzen eine enzymatische Deacetylaseaktivität. Im Vergleich zu den HDACs, die Acetylgruppen von Targetproteinen in einer einfachen Ein-Schritt-Reaktion abspalten, verläuft die Sirtuin-Deacetylierung in einem Zwei-Schritt-Prozess [215, 217]. Das Säugetier-Ortholog SIRT1 ist das best erforschte Sirtuin dieser Gruppe. Sirt1 verhindert die DNA-Instabilität durch Aktivierung vieler Reparaturmechanismen. Es wirkt als Pro- und Gegenspieler bei der stressinduzierten Apoptose mittels Hemmung des p53 Gens. Sirt1 spielt auch eine entscheidende Rolle in der hepatischen Glukoneogenese und reguliert die pankreatische Insulinproduktion. Angesichts dieser und weiterer Funktionen von Sirt1 in Säugertierspezies wird vermutet, dass Sirt1 auch beim Menschen entsprechende Wirkungen in der Verzögerung von Alterungsprozessen, besitzen könnte [218, 219].

Das Gehirn, das Herz und die Skelettmuskulatur weisen eine starke Sirt1 Expression auf. Niedrige Sirt1 Levels wurden in der Lunge und den Nieren gefunden [220]. Es wurde ebenfalls eine sehr hohe Sirt1 Expression in CD4⁺CD8⁺ Thymozyten dokumentiert. In vivo Experimente zeigten, dass der Verlust von Sirt1 in T-Zellen zum Zusammenbruch der peripheren T-Zelltoleranz führt. Eine Sirt1 Hochregulation wurde auf Transkriptions- und Proteinebene in anergischen CD4⁺T-Zellen ermittelt. Parallel dazu wurde in gleichen Zellen die suppressorische Wirkung von Sirt1 auf den Transkriptionsfaktor AP-1 bewiesen [221]. Wie Studien demonstrierten, wirkt Sirt1 nicht nur als wichtiger anergischer Faktor in T-Zellen, sondern durch die direkte

Interaktion zwischen Sirt1 und Foxp3 auch als wichtiger Foxp3 Regulator [222, 223]. In Asthma bronchiale wurde eine erhöhte HAT- und leicht erniedrigte HDAC-Aktivität nachgewiesen. Hingegen wurde in Patienten, welche an COPD leiden, deutlich reduzierte HDAC-Werte im Lungenparenchym detektiert, die mit der Schwere der Erkrankung in Zusammenhang stehen [224-226]. Allerdings zeigten Forschungsergebnisse von *in vivo* durchgeführten Experimenten in murinen Modellen einen erhöhten Sirt1-Level nach OVA-Provokation, was in Korrelation mit der verstärkten Entzündungsreaktion und bronchialer Hyperreaktivität steht, die durch Sirt1 Inhibitoren (Sirtinol, Cambinol) aufgehoben wurden. In isoliertem asthmatischem Lungengewebe und primären Epithelzellen wurde gezeigt, dass Sirt1 seine eigene Expression durch den PI3K-Signalweg reguliert und zugleich HIF-1 α aktiviert, was wiederum VEGF aktiviert und es so zur Vasodilation kommt [227]. Die Suppression von Sirt1 in DC beeinträchtigt deren Reifung und Migration, sodass sie als ineffiziente APCs die Th2-Immunantwort dämpfen konnten [228]. Allerdings führte das Ausknocken von Sirt1 in Makrophagen zu einer übermäßigen Expression inflammatorischer Proteine wie TNF- α [229].

Sirt1 reguliert durch seine Deacetylasefunktion eine Vielzahl von Proteinen (FOXOs, PGF-1 α , HIF-1 α , p53, PPAR- γ usw.) und seine Funktionsfähigkeit selbst wird durch Phosphorylierung, bis jetzt bekannte 13 Phosphorylierungsreste, reguliert [230, 231]. Zu den effektiven synthetisch hergestellten Sirt1 Aktivatoren gehört Resveratrol und einige kleine Moleküle genannt SRT1720, SRT2104, SRT2379 [232, 233].

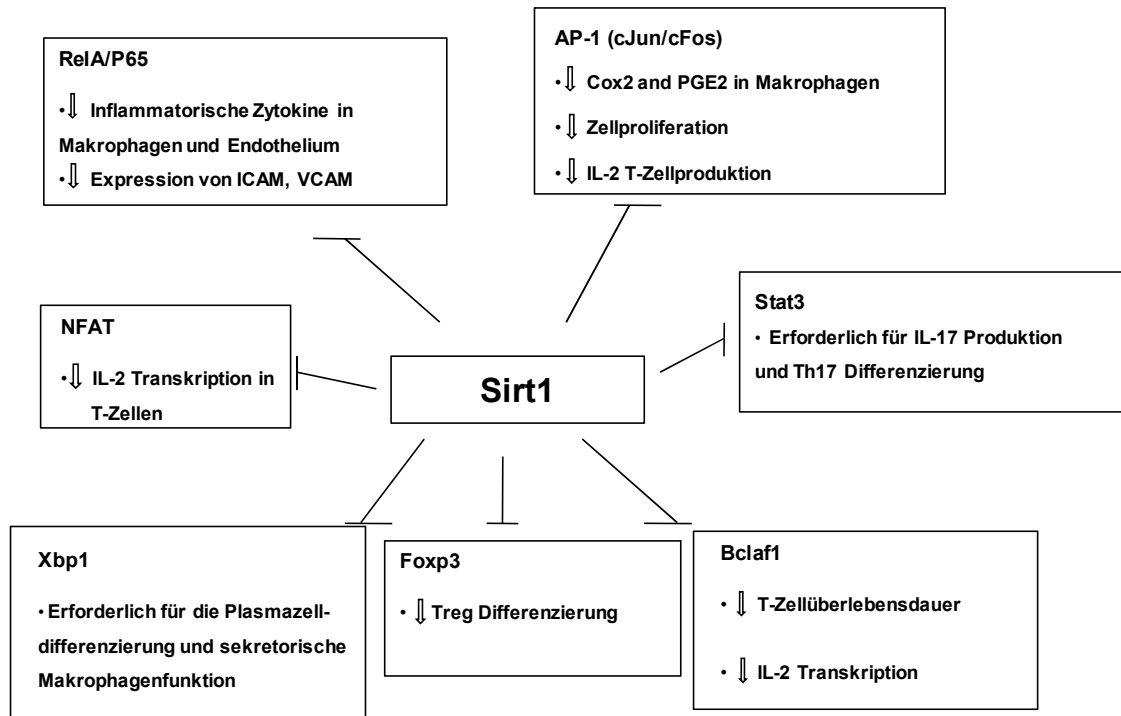


Abbildung 5: Sirt1 moduliert die Immunantwort.

Sirt1 inhibiert die Aktivität multipler Substrate mittels Deacetylierung. AP-1 und NF-kB sind TF, die eine Schlüsselrolle bei der Expression inflammatorischer Zytokine und der Leukozytenaktivierung spielen. Foxp3 und Stat3 sind jeweils entscheidende Faktoren für die Differenzierung von Tregs und Th17. Kürzlich wurde entdeckt, dass der NF-kB: p300: Sirt1-Komplex die Transkription von Bclaf1 reguliert. Dieser ist erforderlich für die T-Zellexpansion. Xbp1 übt eine wichtige Funktion in der Plasmazelldifferenzierung aus. Verändert nach Quelle: [234]

1.9 Therapien, Asthma und Schwangerschaft

Die Therapie von Asthma Bronchiale richtet sich nach der Ursache und dem Schweregrad, welcher in vier Stufen eingeteilt wird. Diese sind intermittierendes, geringgradig persistierendes, mittelgradig persistierendes und schwergradig persistierendes Asthma. Für die medikamentöse Behandlung werden Präparate mit entzündungshemmender (Kortikosteroide) und bronchodilatatorischer (β_2 -Sympathomimetika: SABA und LABA) Wirkung in Kombination eingesetzt [235]. Bei allergischem Asthma wird zusätzlich eine Allergenkarenz empfohlen, die durch die Verminderung der IgE-Rezeptoren auf Mastzellen eine temporäre Verbesserung der Symptome erzielt [236]. Eine subkutane Therapie mit Omalizumab ist erforderlich bei schwergradig persistierendem allergischen Asthma [235]. Ferner stellt die spezifische Immuntherapie eine weitere effiziente Option zur Behandlung von atopischem Asthma bronchiale dar [235]. Weitere Therapiemöglichkeiten bieten Zytokininhibitoren in Form von monoklonalen Antikörpern, Oligonukleotiden, Vakzinen usw. [237, 238]. Asthma ist eine der häufigsten Atemwegserkrankungen, die bei Schwangeren auftritt. Es ist bekannt, dass die Asthmapathogenese durch eine Dysbalance des Th1/Th2 Profils charakterisiert ist. Ein Th2-Phänomen wird ebenfalls während der Schwangerschaft beobachtet. Diese spezifische Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichts und die verstärkte Produktion von Th2-Zytokinen in der Plazenta dient der maternalen Immuntoleranz [239]. Andererseits wirkt sich eine Schwangerschaft unterschiedlich auf eine bereits bestehende Asthma Erkrankung aus. Studien zeigten eine Verschlechterung der Asthmasymptomatik in einem Drittel, eine Verbesserung ebenfalls in einem Drittel und keine Veränderung des Schweregrads in einem weiteren Drittel der schwangeren Frauen. Dabei spielen zum einen physiologische und zum anderen hormonelle Veränderungen eine wesentliche Rolle [240]. Ferner ist die Behandlung von Asthma bronchiale in der Schwangerschaft gleich.

1.10 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Bis heute ist nicht ganz aufgeklärt inwiefern die weiblichen Hormone, zu denen das Schwangerschaftshormon hCG gehört, eine Wirkung auf die Th2-Polarisation und demzufolge auf Asthma bronchiale haben. Hier stellt sich nun die Frage, ob das Schwangerschaftshormon, hCG, die Immunantwort in allergischem Asthma modulieren kann. Es wurden sowohl immunsuppressive als auch immunstimulatorische Wirkungen von hCG beschrieben. Um den immunologischen Effekt von hCG in dieser Erkrankung zu untersuchen, wurde ein Ovalbumin-Mausmodell verwendet. Die experimentelle Untersuchung beinhaltet die Analyse der oberen und unteren Atemwege, der Antikörperproduktion von IgE, IgG1 und IgG2a sowie der Inflammation in der Lunge. Da CD4-T-Zellen in der Entzündungsreaktion von Asthma Bronchiale eine essentielle Rolle spielen, sollte das Th2-Zytokinprofil bestimmt werden. Des Weiteren stellen CD4-T-Zellen ein Bindeglied zwischen der angeborenen und erworbenen Immunantwort dar, indem sie zum einen mit Zellen des angeborenen Immunsystems interagieren und zum anderen die zelluläre oder humorale Immunantwort einleiten.

In T-Zell-vermittelten Autoimmunmodellen wurde bereits die immunsuppressive Wirkung von hCG durch die Regulation der Deacetylase Sirt1 dokumentiert. Ferner stellt Sirt1 ein wichtiger T-Zell-Modulator dar, dessen Verlust im Zusammenhang mit der peripheren T-Zelltoleranz in Verbindung gebracht wird. Sodass ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit in der Analyse des Ausmaßes der Asthmasymptomatik infolge der Sirt1-Deacetylasedisfunktion liegt. Zu diesem Zweck wurden Sirt1^{F/F} CD4^{Cre/+} Mäuse generiert, die durch die Expression eines defekten Sirt1 Proteins in Lymphozyten gekennzeichnet sind. Hierbei werden unterschiedliche Methoden zur Bestimmung des Atemwegwiderstandes, der ausgelösten Entzündungs- und Gewebeveränderungen, der Immunoglobulinsekretion und dem Zytokinprofil verwendet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

CD3 (L3T4) APC	BD Biosciences Pharmingen
CD3 (L3T4) PE	BD Biosciences Pharmingen
CD4 (L3T4) APC	BD Biosciences Pharmingen
CD4 (L3T4) APC	BD Biosciences Pharmingen
CD4 (L3T4) FITC	BD Biosciences Pharmingen
CD4 (L3T4) PE	BD Biosciences Pharmingen
CD4 (L3T4) PerCp	BD Biosciences Pharmingen
CD8 (Ly-2) APC	BD Biosciences Pharmingen
CD8 (Ly-2) FITC	BD Biosciences Pharmingen
CD11b (Mac-1) APC	BD Biosciences Pharmingen
CD25 (IL-2R α) PE-Cy5.5	BD Biosciences Pharmingen
CD25 (IL-2R α) PE	BD Biosciences Pharmingen
CD44 (Pgp-1, Ly-24) PE-Cy5.5	BD Biosciences Pharmingen
CD44 (Pgp-1, Ly-24) PerCp	BD Biosciences Pharmingen
CD40PE	BD Biosciences Pharmingen
CD45R (B220) PerCp	BD Biosciences Pharmingen
CD62L FITC	BD Biosciences Pharmingen
CD69 (H1.2F3) PE	BD Biosciences Pharmingen
CD80 PerCp	BD Biosciences Pharmingen
CD86 PE	BD Biosciences Pharmingen
Foxp3 (FJK-16a) APC	eBioscience GmbH
MHC-II FITC	BD Biosciences Pharmingen
ISO IgG2a (KLH) FITC	BD Biosciences Pharmingen
ISO IgG2b (eB149/10H5) FITC	BD Biosciences Pharmingen
ISO IgG2a (KLH) PE	BD Biosciences Pharmingen
ISO IgG2b (eB149/10H5) PE	BD Biosciences Pharmingen

FACS-Antikörper

Primärantikörper

Anti-mouse CD28	BD Biosciences Pharmingen
Anti-mouse CD3ε	BD Biosciences Pharmingen
Anti-mouse M-CSF	eBioscience GmbH
Ratte-anti-mouse F4/80	BD Biosciences Pharmingen
Maus- anti-mouse Aktin	Invitrogen
Maus-anti-mouse Erk1/2	R&D Systems
Kaninchen-anti-mouse p65 NFκB	Cell Signaling
Kaninchen-anti-mouse phospho- Creb	Cell Signaling
Kaninchen-anti-mouse phospho-Erk1/2	R&D Systems
Kaninchen-anti-mouse phosphor-p65 NFκB	Cell Signaling

Sekundärantikörper

Alexa-Fluor-488 Phalloidin	Invitrogen
Kaninchen IgG-Alexa Fluor 488	Invitrogen
Ratte IgG-Alexa Fluor 555	Invitrogen
Hoechst 33342	Invitrogen
Ziege anti-Ratte Alexa 555	Invitrogen

2.1.2 Oligonukleotid-Primer

Sirt1	5' - CGT CCC TTG TAA TGT TTC CC - 3'
Sirt1	5' - CGT CCC TTG TAA TGT TTC CC - 3'
Sirt1	5' - GGT AAA AAG TTG TAC CTA CTT - 3'

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien

2,2,2-Tribromethanol	Fluka, Buchs, Schweiz
3,3,5,5-Tetramethylbenzidin	Fluka, Buchs, Schweiz
Aceton	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Acrylamid	Merck, Darmstadt
Agarose	Calbiochem, Darmstadt

Albumin bovine Fraction V pH7.0	Calbiochem, Bad Soden
Aluminium potassium sulfate	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumchlorid NH ₄ Cl	Riedel-de Haen, Seelze
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Aprotinin from bovine lung	Sigma, Taufkirchen
Aqua dest.	B. Braun, Melsungen
Assay Diluent für Elisa	BD Biosciences Pharmingen
Benzonase	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Merck Biosciences, Darmstadt
Casy Ton	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Casy clean	Schärfe System GmbH, Reutlingen
CDP-Star®	Tropix, Bedford, USA
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Collagenase Typ I	Sigma, Taufkirchen
Diethanolamin (DEA)	Tropix, Bedford, USA
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich, München
Disodium-EDTA	Gerbu Biotechnik, Gaiberg
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dulbecco's modified eagle medium-F12 (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
DNase I	Quiagen, Hilden
Eosin G-Lösung	Sigma Aldrich, München
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
Fötales Bovines Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin
Glycerin wasserfrei	Merck, Darmstadt
Glycin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
HRP Streptavidin	Dako, Glostrup, Dänemark
I-Block.™	Applied Biosystems, Foster City, USA
iCycler Absolute QPCR SYBR Green Mix	ABgene, Blenheim, UK
Igepal (NP-40)	Sigma-Aldrich, München
Kaliumchlorid (KCl)	Merck Biosciences, Darmstadt

Kaliumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Merck Biosciences, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat KHCO_3	Sigma, Taufkirchen
Kaliumhydroxid KOH	Merck, Darmstad
Ketamine-HCl	Ratiopharm, Ulm
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methacholinchlorid	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED)	AppliChem, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, München
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck Biosciences, Darmstadt
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Sigma-Aldrich, München
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Nitroblock II TM	Applied Biosystems, Foster City, USA
Nonidet P 40	Fluka, Buchs, Schweiz
Paraformaldehyd (PFA, 4%)	Sigma-Aldrich, München
PBS	Dulbecco Biochrom KG, Berlin
PBS Dulbecco	Biochrom AG, Berlin
PBS EDTA pH 7,5 BioWhittaker	Cambrex Bio Science, Verviers
PCR-Reaktionspuffer (10-fach)	Qiagen, Hilden
Penicillin/Streptavidin	Invitrogen TM, Karlsruhe
PermaFluor TM Aqueous Mounting	Thermo Fisher Scientific, Lafayette, USA
Primer: Sirt1	MWG Biotech, Ebersberg
Proteinase K	Applichem, Darmstadt
Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI-1640)	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Predalon 5000 I.E.	Essex Pharma GmbH
Protease Inhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim

Rompun	Bayer HealthCare, Leverkusen
Roti-Nanoquant	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Salzsäure 25%	Merck, Darmstadt
Saponin	Sigma-Aldrich, München
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
SDS	Sigma-Aldrich, München
TEMED	Roth, Karlsruhe
Trihydroxymethylaminomethane (Tris)	AppliChem, Darmstadt
Trypan blue stain 0,4%	Gibco, Invitrogen Corp, Grand Island, NY
Triton X100	Sigma-Aldrich, München
Tween20 TM	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Trypsin-Inhibitor	Sigma, Taufkirchen
Trypsin/EDTA, 1% in PBS	PAA, Cölbe
Tween 20	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt

2.1.4 Puffer

ELISA Lösungen und Puffer

Carbonat Coating Puffer:	0,356 g Na_2CO_3 + 0,84 g NaHCO_3 ad 100 ml Aqua dest. auf pH 9,5 einstellen
Phosphat Coating Puffer:	1,8 g Na_2HPO_4 + 1,61 g NaH_2PO_4 ad 100 ml Aqua dest. auf pH 6,5 einstellen
Substratpuffer:	6,3 g Citronensäure-Monohydrat ad 1000ml Aqua dest., pH 4,1 mit 4NKOH einstellen

TMB-Lösung:	120 mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in 2,5 ml Aceton gelöst 22,5 ml Ethanol. +150 µl H ₂ O ₂ 30%
Abstopplösung:	28 ml H ₂ SO ₄ (97%) ad 500 ml Aqua dest.
Waschpuffer:	0,005% Tween 20 in PBS

FACS Lösungen und Puffer

FACS-Puffer:	1x PBS, 5% FCS, 0,1% NaN ₃
Saponin-Puffer:	0,5% Saponin, 0,5% FCS 0,1% NaN ₃ in PBS
PFA 4%:	40 g Paraformaldehyd ad 800 ml PBS, pH 7,0-7,4 einstellen über Nacht bei 60°C lösen, auf RT abkühlen lassen und ad 1l PBS auffüllen

Western-Blot-Puffer

SDS-Page Laufpuffer :	30,25 g Tris 144 g Glycin 100 ml SDS (10%) auf 1 L dH ₂ O
Transferpuffer:	3 g Tris 14,4 g Glycin in 1 L dH ₂ O vor Gebrauch versetzt mit 20% (v/v) Methanol

Blockpuffer:	I-Block 2 g I-Block in 1 L PBS
Assay-Puffer:	10,6 g DEA 500 µl MgCl ₂ in 1 L dH ₂ O
Entwicklungslösung:	Nitroblock II., 1:200 in Assay-Puffer CDP-Star, 1:1000 in Assay-Puffer
Trenngel (10%):	13,3 ml 30% Polyacrylamid 8 ml 1,8 mol/l Tris-HCl (pH 8,8) 18,1 ml dH ₂ O 400 µl SDS (10%) 200 µl APS (10%) 8 µl TEMED
Trenngel (12%):	15,5 ml 30% Polyacrylamid 8 ml 1,8 mol/l Tris-HCl (pH 8,8) 15,9 ml dH ₂ O 400 µl SDS (10%) 200 µl APS (10%) 8 µl TEMED
Sammelgel:	3 ml 30% Polyacrylamid 4 ml 0,8 mol/l Tris-HCl (pH 6,8) 12,7 ml dH ₂ O 200 µl SDS (10%) 100 µl APS (10%) 4 µl TEMED

Lyse-Puffer:

NP-40 Lysepuffer:

1% (v/v) Igepal (NP-40)
1,6 mM Protease-Inhibitor (PI)
25 mM NaF
1 mM Na₃VO₄
in PBS

Protein-Probenpuffer:

2X 40 ml SDS (10%)
10 ml Tris/HCl (1M, pH 6,8)
10 ml β-Mercaptoethanol
20 ml Glycerol
0,2 mg Bromphenolblau

Weitere Puffer und Lösungen

ACK-Lyse Puffer:

8,29 g NH₄Cl, 1,0g KHCO₃, 0,367g Na₂EDTA an 1l H₂O, einstellen mit NaOH auf 7 pH 2-7,4 und anschließender Sterilfiltration

Erythrozyten-Lysepuffer:

0,127 mM EDTA
10 mM KHCO₃
155 mM NH₄Cl
in deionisiertem Wasser und anschließender Sterilfiltration

Coating Puffer:

NaHCO₃, pH 8,2

Kollagenaselösung:	2700 Units Kollagenase Typ IA, 1,5 mg Dnase I in 10ml PBS lösen
Zellkulturmedium 1:	5% bzw. 10 % FCS in RPMI-Medium, 1% Penicillin/Streptomycin
Zellkulturmedium 2:	10 % FCS in DMEM-F12-Medium, 1% Penicillin/Streptomycin
Zellkulturmedium 3:	10% FCS in DMEM-F12-Medium, 1% Penicillin/Streptomycin, 20ng/ml rmm-CSF
OVA/Alum:	500 µg/ml OVA in 0,9% NaCl im Verhältnis 1:1 mischen mit 10% Aluminiumkaliumsulfat (Alum) mit NaOH auf pH 6,5 einstellen, 1h bei RT unter Lichtausschluss inkubieren, für 5 Minuten bei RT zentrifugieren (1500 rpm). Pellet ad 10 ml 0,9% NaCl resuspendieren
Saline/Alum:	0,9% NaCl zu gleichen Teilen mit 10% Aluminiumkaliumsulfat mischen, weitere Vorgehensweise wie unter OVA/Alum beschrieben
Lyse-Puffer für Ohrbiopsie:	100 mM Tris pH 8,0; 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,2% SDS, A.dest

2.1.5 Kits

IL-13 Elisa mouse Kit (DuoSet®):	R&D Systems, Wiesbaden
IL-17 Elisa mouse Kit (DuoSet®):	R&D Systems, Wiesbaden
Mouse IgE Elisa Set (BD OptEIA TM):	BD Biosciences Pharmingen
Mouse IL-4 Elisa Set (BD OptEIA TM):	BD Biosciences Pharmingen
Mouse IL-5 Elisa Set (BD OptEIA TM):	BD Biosciences Pharmingen
Mouse IL-10 Elisa Set (BD OptEIA TM):	BD Biosciences Pharmingen
Mouse IFN- γ Elisa Set (BD OptEIA TM):	BD Biosciences Pharmingen

2.1.6 Geräte

4°C Kühlschrank	Bosch,
-20°C Tiefkühlschrank	Bosch,
-80°C Ultratiefkühlschrank	Ultra-Low Technology of Laboratory Equip-ment, USA
Cell Harvester 1295-001	LKB, Freiburg
ChemiDoc Geldokumentationssystem	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Cytospin	Shandon, Pittsburgh, PA
Elektrophorese-Kammer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Elektrophoresis Power Supply	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
FACS Calibur (Durchflußzytometer)	BD Pharmingen, Heidelberg
Feinwaage (AG 204 Delta Range)	Mettler Toledo, Gießen
Filmentwicklermaschine	Fujitsu, Japan
Heizblock (thermomixer compact)	Eppendorf, Hamburg
Inkubator (WTB Binder CB 210)	Binder GmbH, Tuttlingen
Inkubator	
Konfokales Laserscanmikroskop	Zeiss, Oberkochen (CLSM 510-UV)
Kreisschüttler (Heidolph unimax 1010)	Brinkmann Instruments, NY, USA
Lichtmikroskop	Leica, Portugal

Mikroplattenlesegerät	Safire Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Mikroplattenlesegerät Spectrafluorplus MyCycler (Thermocycler)	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach
Nanodrop Spektrophotometer ND-1000	Nanodrop, Wilmington, USA
pH-Meter Toledo 320	Mettler Toledo, Gießen
Schüttler (Heidolph Unimax 1010)	Heidolph Instruments, Schwabach
Sterilbank 1 Holten Laminair 1.5	Thermo Fisher Scientific
Sterilbank 2 Topsafe 1.5	Nunc GmbH Wiesbaden
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Labotec, Wiesbaden
Ultraschallgerät (S-250D)	Branson, Danbury, USA
Vortexer Reax Control	Heidolph, Schwabach
Waagen AE50, PM300	Mettler, Basel
Wasserbäder (GFL Typ 1002 und 1004)	Milian Labware, USA
Western Blot-Kammer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Zellzählgerät CASY TT	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Zellkulturmikroskop (Wilovert 30, Standard)	Hund, Wetzlar
Zentrifuge (5415R)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge (5804)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge (Megafuge 1.0R)	Heraeus Instruments, Hanau

2.1.7 Gebrauchsmaterialien

Cellstar PP-Röhrchen 50ml, 15ml	Greiner, Frickenhausen
Deckgläser	Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda- Königshofen
Einkanalpipetten	Gilson, Villiers-le-Bel
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Eppendorfggefäße	Eppendorf GmbH, Hamburg
ELISA-Platte PS Microplatte 96 wells	Nunc, Wiesbaden
Filterpapiere für Cytospin	Shandon, Pittsburgh, PA
Filterpapier (whatman paper)	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Glasgefäße	Schott, Mainz
Kanülen, Sterican 0,45x12mm	Braun, Melsungen
Kapillarspitzen 200µl	Biozym, Oldendorf
Kryokonservierungsröhrchen	Thermo Fisher Scientific, Roskilde
Magnetstäbchen	Roth, Karlsruhe
Multikanal-Pipette	Thermo Fisher Scientific, Waltham,
Multikavitätenplatten (6-, 12- oder 96)	Greiner Bio-One GmbH,
	Frickenhausen
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
Nitrocellulosemembran	
Objektträger, 8 Kavitäten (8-Well-und 4-Well Chamberslides)	BD Biosciences, San José, USA
Parafilm	American National Can, Chicago
Pasteur Pipetten	Hirschmann, Eberstadt
Petrischale	Nunc, Wiesbaden
pH Indikatorstäbchen 4,5-10,0	Machery-Nagel, Düren
Pinzette	FST, Heidelberg
Pipetten Eppendorf Reference	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Polysine-Objektträger	Menzel, Braunschweig
Polyethylenröhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Scheren	FST, Heidelberg
Sieb Cell strainer 40 µm Nylon	BD Falcon, Bedford, MA
Skalpelle, steril	
Spatel:	Merck, Darmstadt
Sterilisationsfilter 22 µm	Millipore, Bedford, MA
Whatman Filterpapier	Whatman, Maidstone, GB
Zellkulturplatte Cellstar TC-Plate 12 wells	Nunc, Wiesbaden

Zellkulturplatte Cellstar TC-Plate 24 wells	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturplatte Cellstar TC-Plate 48 wells	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturflaschen, 175cm ² , 75cm ² , 25cm ² (CellStar tissue culture flask T175 T75, T25)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

2.1.8 Software

Adobe Acrobat 9.0 Pro Microsoft Office 2003, 2007, 2010

Image Lab 3.0.1 *BIO-RAD* Software

LSM Image Examiner Zeiss

Microsoft Office Excel 2003, 2007, 2010

Microsoft Office Power Point 2003, 2007, 2010

Microsoft Office Word 2003, 2007, 2010

WinMDI 2.9 Software

ZEN 2011 Light Edition

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

Für die vorliegende Arbeit wurden drei unterschiedliche pathogenfreie Maus-Inzuchtstämme verwendet. Weibliche Balb/cJ Tiere, die von der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz bezogen wurden. Des Weiteren wurden weibliche gentechnisch veränderte Tiere, aus den Jackson Laboratories, USA, B6; 129-*Sirt1*^{tm1Ygu}/J und B6.Cg-Tg (Cd4-cre) benutzt. Die Haltung und Zucht der verwendeten Kleintiere fand in der Zentralen Versuchstiereinrichtung in Mainz statt. Alle wurden unter Standardlaborbedingungen mit frei zugänglichem Futter und Wasser, bei einer Temperatur von 22°C ± 2°C und in einem 12 Stunden Tag/Nacht Rhythmus gehalten.

2.2.2 Genotypisierung

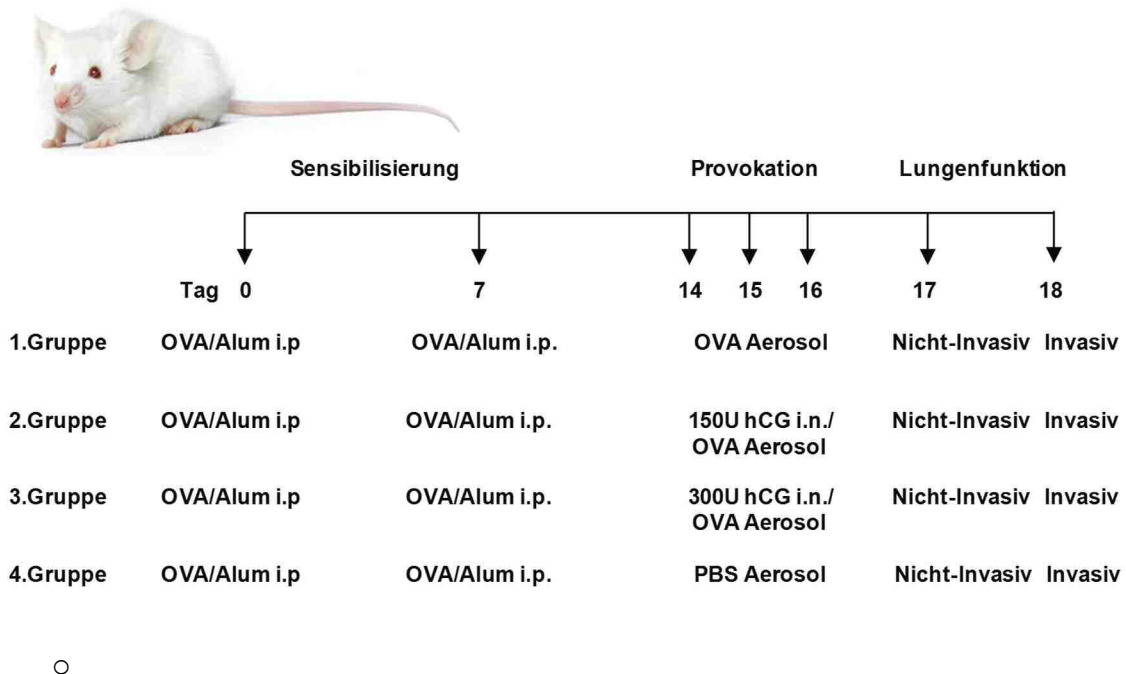
Um den genauen genetischen Status der Tiere zu bestimmen, wurden Ohrbiopsien entnommen. So fand gleichzeitig die Markierung und Probengewinnung statt. Das Ohrgewebe wurde in je 50 µl Lysepuffer und 25 µg Proteinase K aufgenommen und über Nacht bei 55°C unter leichtem Schütteln verdaut. Nach dem kompletten Probenverdau wurde die Aktivität der Proteinase K für 10 Minuten bei 95° inhibiert. Das gewonnene Lysat wurde bei -20 °C tiefgefroren oder direkt weiterverarbeitet.

2.2.3 Tierbehandlung

In Hinsicht auf die Fragestellung wurden verschiedene Behandlungen durchgeführt. In beiden Modellen wurde das Ovalbumin-System angewendet, das eine Kombination aus systemischer und lokaler Exposition darstellt.

Behandlungen

- OVA-hCG-Modell in Balb/cJ Mäusen



-

Abbildung 6: Behandlungsprotokoll.

Zur Induktion von Asthma bronchiale wurde allen Tieren je 200 µl Alum-Lösung mit einer Konzentration von 100 µg OVA je zwei Mal i.p. verabreicht. Um die Wirkung von hCG in einem murinen OVA-Modell zu ermitteln, wurden 2 der 4 Gruppen mit verschiedener hCG-Konzentration behandelt. Das Hormon wurde in einer Konzentration von 150U/30 µl und 300U/30 µl, gelöst in 0,9% NaCl-Lösung, i.n. gegeben.

In diesem Tiermodell wurden Wildtypmäuse (Balb/cJ) eingesetzt, die in vier Gruppen aufgeteilt wurden. In einer ersten Phase wurde eine systemische Reaktion ausgelöst. Hierzu wurden alle Tiere mit 100 µg OVA, gelöst in 200 µl Aluminiumkaliumsulfatlösung, an den Tagen 0 und 7 intraperitoneal injiziert. Eine Woche später nach der letzten Behandlung erfolgte die Provokation der ersten Versuchsgruppe mit 1%iger OVA-Lösung an drei hintereinander folgenden Tagen. Die zweite Gruppe bekam nach Betäubung mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran, intranasal 30µl 150U hCG gelöst in 0,9% Kochsalzlösung. Die doppelte Dosis hCG (300U hCG) wurde der dritten Gruppe auf gleiche Weise appliziert. Die mit humanem Choriongonadotropin behandelten Mäuse wurden eine Stunde später gleichermaßen mit Ovalbumin in PBS für 30 Minuten aerosolisiert. Die

Kontrolltiere erhielten nur physiologische Kochsalzlösung als Aerosol. Anschließend wurde die Hyperreagibilität der oberen und unteren Atemwege gemessen.

- OVA-Modell in Mäusen mit beeinträchtigter Deacetylase-Funktion (Sirt1), mit B6 Hintergrund

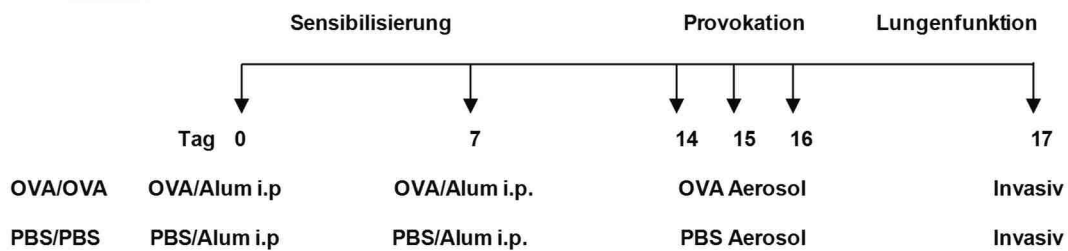


Abbildung 7: Behandlungsprotokoll.

In diesem Modell wurden zur Induzierung von allergischem Asthma zwei gentechnisch veränderte Mausstämmen B6; 129-*Sirt1^{tm1Ygu/J}*; Cg-Tg (CD4-Cre) und B6.Cg-Tg (CD4-Cre) verwendet. Die OVA/OVA-Gruppen erhielten 100 µg OVA gelöst in 200 µl Alum i.p. je zwei Mal in einem Abstand von einer Woche. Die PBS/PBS-Gruppen bekamen 200 µl Alum/PBS.

Die Mauslinien B6; 129-*Sirt1^{tm1Ygu/J}*; Cg-Tg (CD4-Cre) und B6; 129-*Sirt1^{tm1Ygu/J}* wurden in diesem Asthmodell untersucht. Um eine asthmatische Antwort in den gentechnisch veränderten Mäusen zu induzieren, wurde wie schon oben beschrieben, als erstes eine systemische Sensibilisierungsreaktion auf Ovalbumin hervorgerufen. Hier ist zu erwähnen, dass die Kontrollmäuse von beiden Stämmen eine intraperitoneale PBS/Alum-Injektion erhielten. So konnte man einen Nebeneffekt des Alum-Adjuvants ausschließen. Die OVA-behandelten Tiere wurden an den Tagen 14, 15 und 16 einer 1%igen OVA-Lösung, bzw. die Kontrolltiere einer PBS-Lösung für 30 Minuten in einer Aerosolkammer exponiert. Einen Tag später erfolgte die Lungenfunktionsanalyse in Zusammenarbeit mit der Asthma Core Facility des Forschungszentrums für Immunologie. Alle Tierversuche wurden nach Vorgaben des Tierschutzgesetzes in der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universität Mainz, Deutschland durchgeführt.

2.2.4 Nicht-Invasive Lungenfunktions-Messung

Die Überempfindlichkeit der oberen Atemwege, zu denen Mund- und Nasenhöhle, Rachen und Kehlkopf zählen, wurde nicht-invasiv mittels eines Ganzkörperplethysmographen der Firma BUXCO® gemessen. Hierfür wurden die Mäuse frei beweglich in einzelne Kammern gesetzt. Jede Kammer ist mit einem Pneumotachographen, Druckmesser, Luftfeuchtemessmer und Aerosolkopf verbunden. Der Nachweis der Hyperreaktivität erfolgte mittels dreistufiger Methacholinprovokation 24 Stunden nach dem Allergenchallenge. Methacholin (Acetyl- β -Methylcholinchlorid) ist ein synthetisch hergestelltes Acetylcholinanalogon, das als Muscarinrezeptor-Agonist eine direkte Wirkung auf die glatte Muskulatur hat. Es wurde über den Vernebler in die Kammer zugeführt. So wurde die Provokationssubstanz in ansteigender Dosierung (6,25; 12,5 und 25 mg/ml) in einem Intervall von ca. 10 Minuten von den Versuchstieren inhaliert.



Abbildung 8: Darstellung des Ganzkörperplethysmographen-Systems der Firma BUXCO®

Durch diese einfach durchführbare Methode werden viele verschiedene Parameter von dem Messgerät über den gegebenen Zeitraum von 10 Minuten detektiert, zur Software weitergeleitet und dort als Diagramm dargestellt. Zu diesen Größen gehören: Inspirationszeit (T_i); Expirationszeit (T_e); Maximaler Einatemfluss (PIF), Maximaler Ausatemfluss (PEF); Atemvolumen (TV); Expirationsvolumen (EV); -Minutenvolumen (MV); Atemfrequenz (f); Ende der inspiratorischen Atempause (EIP); Ende der expiratorischen Atempause (EEP); Relaxationszeit (R_t), erweiterte Pause (P_{enh}). P_{enh} ist der empirische Parameter, der sich auf Veränderungen der Atemwege bezieht und somit Informationen über die Hyperreagibilität gibt. Er wird folgendermaßen definiert: $P_{enh} = PEF/PIF \times \text{Pause}$. Die Pause wird berechnet als: $\text{Pause} = T_e/R_t - 1$, wobei die Relaxationszeit bis zu einem Druckabfall auf 36% des gesamten Kammerdrucks absinkt. P_{enh} und Pause sind dimensionslose Größen, die keine absoluten sondern relative Werte darstellen.

2.2.5 Invasive Messung: Messung des Atemwegwiderstandes

Mit dem invasiven System der Firma BUXCO® wurde die Hyperreaktivität der unteren Atemwege (Trachea, Bronchien und Alveolen) ermittelt. Zur Messung der Lungenfunktion wurden zunächst die Versuchstiere intraperitoneal mit 200 µl einer Mischung aus Ketamain-Rompun (1:4) und 0,9% NaCl-Lösung narkotisiert. Nach Erlangen der chirurgischen Toleranz wurde die Luftröhre frei präpariert und ein Trachealtubus (Metall-Plastikkanüle) minimal invasiv implantiert. Im folgenden Schritt wurde die Maus in Rückenlage im Ganzkörperplethysmographen platziert und ein Oesophaguskatheter in die Speiseröhre eingeführt, der mit einem Druckempfänger und einer Wassersäule verbunden ist. Damit die Beatmung der Maus sichergestellt werden konnte, wurde sie mit einer frei regulierbaren Pumpe verbunden. Um äußere Einflussfaktoren auszuschließen wurde die Kammer gemäß Protokoll vor jeder Messung kalibriert. Die Lungenfunktionsmessung lief wie folgt ab:

1. Schritt: 1 Minute aufzeichnen der Baseline
2. Schritt: 30 Sekunden Aerosol mit Methacholin
3. Schritt: 5 Minuten Messung des Atemwegwiderstandes

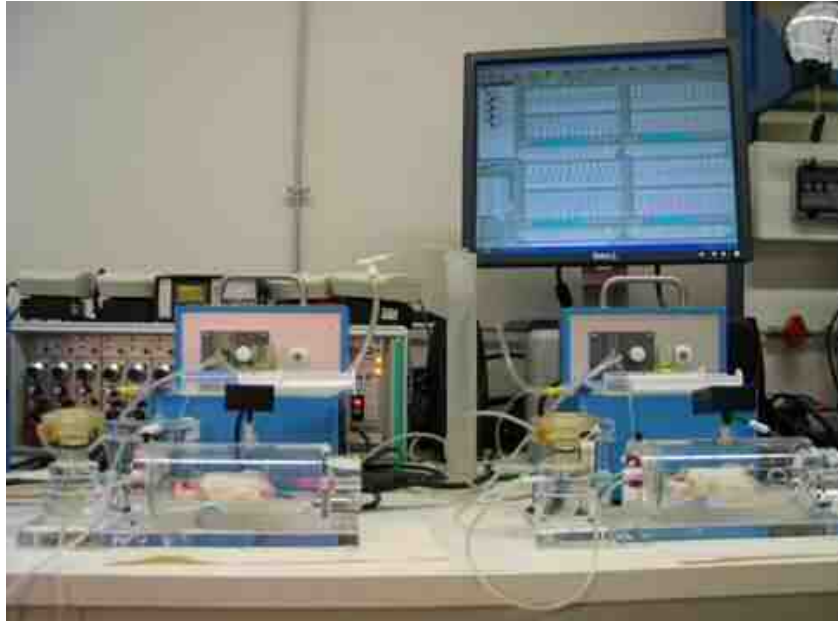


Abbildung 9: Darstellung des invasiven Systems der Firma BUXCO®

Da unterschiedliche Methacholin-Dosen (3,125; 6,25; 12,50; 25; 50 und 100 mg/ml) mit aufsteigender Konzentration appliziert wurden, wurden die Schritte mehrmals wiederholt. Die Methacholinlösung wurde über eine Verneblerdüse, die mit der Trachealkanüle verbunden ist, direkt in die Lunge appliziert.

Die Druckdifferenz, welche mit einem Druck-Messfühler gemessen und aufgezeichnet wird, wird später mit einer speziellen Software (BioSystem XA) des Herstellers ausgewertet, wobei die isovolumetrische Methode zugrunde gelegt wird, bei der die Veränderung des Ein- und Ausatemdrucks bezogen auf ein kalibriertes Volumen berechnet wird. Der Atemwegswiderstand wird als Resistance (RI (cm H₂O x sek/ml) angegeben, wobei die Daten als Mittelwerte (MW ± SD) dargestellt werden.

2.2.6 Bronchoalveolar Lavage (BAL)

Die bronchoalveoläre Lavage ist ein weitverbreitetes medizinisches Verfahren, das in der Diagnostik als auch in der Therapie von pulmonalen Krankheiten eingesetzt wird [241]. Diese Methode findet auch eine breite Anwendung in der experimentellen Tierforschung von Lungenerkrankungen. Die Lavage dient zur Gewinnung von zellulären und nicht zellulären Bestandteile aus den terminalen Bronchiolen und Alveolen, um pathologische Veränderungen im bronchialen Sputum zu analysieren. Die Lungenspülung wurde unmittelbar nach der invasiven Messung durchgeführt. Für

diese wurde eine mit 600 µl steriler physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllte Spritze in den Trachealtubus eingeführt und die Lunge wurde je zwei Mal mit Hilfe von leichtem Massieren des Brustraumes gespült. Das so gewonnene Material wurde in 15 ml gekühlte Röhrchen überführt und anschließend bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zum Zeitpunkt der Zytokinbestimmung bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.7 Cytospin

Die aus dem Respirationstrakt gewonnenen Zellen wurden in 1 ml kaltem PBS resuspendiert und mittels CASY-Gerät ausgezählt. Anschließend wurden sie auf 1×10^6 /ml eingestellt und 100 µl dieser Zellsuspension auf Objektträger durch Zytocentrifugation aufgebracht. So erzielte man qualitativ hochwertige Dünnschichtpräparate, die luftgetrocknet und bis zur Färbung bei -20° gelagert wurden. Die so gewonnenen Cytospin-Präparate wurden zu einem späteren Zeitpunkt durch eine differenzierte Zellfärbung nach Romanowsky gefärbt.

Diff-Quick-Färbung:

- 1) Objektträger 5 x 1 sec in Fixierlösung
- 2) Objektträger 5 x 1 sec in Färbelösung I (Eosin)
- 3) Objektträger 5 x 1 sec in Färbelösung II (Thiazin)
- 4) Objektträger 5 x 1 sec in Aqua Dest.
- 5) Objektträger 5 x 1 sec in Aqua Dest.
- 6) Objektträger mit Hilfe von Entellan eindeckeln und Lufttrocknen

Nach der Färbung der Präparate erfolgte die morphologische Charakterisierung der Entzündungszellen in der bronchoalveolären Spülung, die in vier Haupttypen in Hinsicht auf ihre Häufigkeit im allergischen Asthma klassifiziert wurden. Die Mehrzahl der inflammatorischen Zellen machen die Eosinophilen aus, die anhand ihres polymorphoiden Kerns und rot gefärbten kationischen Zytoplasmas zu erkennen sind. Die Neutrophilen sind charakterisiert durch ihren mehrsegmentierten Kern und ungefärbtes Zytoplasma. Im Vergleich zu Lymphozyten, die recht klein sind und einen kondensierten Kern besitzen, verfügen Makrophagen über ein höheres Verhältnis an Zytoplasma zu Kern, der weniger kondensiert ist. Wobei aktivierte

Makrophagen zur Fusion fähig sind und somit zur Bildung von Riesenzellen, um größere Fremdkörper zwecks Phagozytose zu umschließen. Für die Quantifizierung der verschiedenen Zelltypen wurden 500 Zellen in unterschiedlichen Betrachtungsfeldern gezählt. Die Zählung wurde für jedes Versuchstier durchgeführt.

2.2.8 Serumgewinnung

Die Blutabnahme aus dem Herzen fand unmittelbar nach der Lungenlavage statt. Es sollte das Dreifache der später benötigten Serummengende an Blut abgenommen werden. Zur vollständigen Gerinnung wurde das Blut für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einem 1,5 ml Röhrchen ohne Zusätze stehen gelassen. Im nächsten Schritt wurden die Proben bei 3000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert und das Serum vorsichtig abgenommen. Die Aufbewahrung des Serums erfolgte bei -80°C bis zur weiteren Analyse.

2.2.9 Organentnahme und Organpräparation

Je nach Fragestellung des Versuches wurden folgende Organe der Reihe nach entnommen: Lunge, Thymus und Milz. Unter aseptischen Bedingungen wurde der Bauchraum eröffnet und das Zwerchfell abgetrennt. Im nächsten Schritt wurde die Lunge vorsichtig entnommen und aufgeteilt. Zweckgemäß wurde der ganze nicht lavagierte Lungenflügel, der zum Anfertigen von Paraffinschnitten diente, in wässriger Formalinlösung mit 4% Formaldehyd für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur konserviert. Einer der kleinen Lungenlappen, der zur Gewinnung von RNA und Proteinen benutzt werden sollte, wurde kurz in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Je nach Zielsetzung wurde auch ein Stück Lunge für histologische Untersuchungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren um so der Autolyse vorzubeugen. Der größte Teil der Mauslunge wurde zur Gesamtzellisolation verwendet. Darauf folgte die Präparation des Thymus, wobei beide Lappen später als Zellsuspension verarbeitet wurden. Im Anschluss wurde die Milz, sorgfältig entnommen und in eiskaltes Medium für die nachfolgende Zellisolation überführt.

2.2.10 Histologische Methoden und Färbungen

Es wurden, wie im oberen Abschnitt schon erwähnt, zwei Konservierungstechniken angewendet. Zum einen erfolgte das Fixieren des Lungengewebes in 4%iger Formalinlösung, die gebräuchteste Art der Gewebeerhaltung und zum anderen in flüssigem Stickstoff (-196°C) und das spätere Aufbewahren bei -80°C.

2.2.10.1 Paraffinschnitte

Um ein möglichst natürliches Erhalten des Gewebes zu erzielen, wurde das Lungenstück in Formalin eingebracht. Allgemein gilt, die Dauer der Fixierung hängt von der Größe der Gewebeprobe ab, in diesem Fall zwischen 18-24 Stunden und das Fixans sollte im Überschuss vorliegen, so dass das Präparat im Fixierungsmittel schwimmt. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde das Zielmaterial für mehrere Stunden, üblicherweise zwischen 6-8 Stunden, in Leitungswasser gespült und anschließend mit Aqua Dest ausgewaschen. Das Entwässern des Gewebes erfolgte in aufsteigender Alkoholreihe mit darauf folgender Inkubation in Intermediärmedium, in diesem Fall Xylol und abschließend das Einbetten ins heißes Paraffin (65°C).

- 1) 1h Isopropanol, 40% in Aqua dest.
- 2) 1h Isopropanol, 60% in Aqua dest
- 3) 1h Isopropanol, 80% in Aqua dest.
- 4) 1h Isopropanol, 90% in Aqua dest
- 5) 1h Isopropanol, 100%.
- 6) 1h Isopropanol, 100%
- 7) 2h Isopropanol, 100%
- 8) 1h Xylol
- 9) 1h Xylol
- 10) 1h Xylol
- 11) 4h Paraffin
- 12) 2h Paraffin

Als nächstes wurden die Paraffin durchtränkten Proben vorübergehend warm gestellt und dann manuell in Gießschälchen gelegt und mit 65° C heißem Paraffin überschichtet. Die in den Kassetten eingebetteten Organe wurden auf eine Kaltplatte gestellt und der so gekühlte Paraffinblock vorsichtig aus der Gießform entnommen. Zum Herstellen von Schnitten wurde ein Rotationsmikrotom verwendet. Die Paraffinproben wurden bei -20°C gekühlt und zum Schneiden vorbereitet. Die erzielten Schnitte, mit einer Dicke von 3 µm, wurden erst auf einem Kaltwasserbad aufgefangen und sogleich auf ein 40° C warmes Wasserbad übertragen, wo sie sich „streckten“ und glatt mit Hilfe eines Pinsels auf Polylysin beschichtete Objektträger aufgezoogen wurden. Die so erstellten Lungenschnitte wurden bei 37°C über Nacht getrocknet, damit sie besser am Objektträger anhaften.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung ist eine gängige Standardfärbung, die Auskunft über die Struktur des Gewebes liefert und dadurch sichtbare Unterschiede zwischen gesunden, entzündeten und pathogenen Strukturen ermöglicht. Für diese Färbung wurden die fertigen Lungenparaffinschnitte verwendet, die als erstes in Xylol entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe (100%, 96% und 70% Ethanollösung) rehydratisiert wurden. Nach einer kurzen Inkubationszeit in Aqua dest wurden die Schnitte mit Hämatoxylinlösung für 3 Minuten gefärbt, wodurch sich der Farbstoff Hämaalaun an die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren lagert und somit die Zellkerne später dunkelvioletts erscheinen lässt. Die vollständige Differenzierung der Kerne erfolgte mittels Leitungswasser, was als „Bläuen“ bekannt ist. Im nächsten Schritt erfolgte die Gegenfärbung mit Eosin für 3 Minuten und die anschließende Differenzierung des Zytoplasmas mit Wasser. Eosin bindet an positive Gruppen, charakteristisch für Eiweiße, die im Präparat als rosa Strukturen zu erkennen sind. Weiter wurden die Lungenschnitte in ansteigender Alkoholreihe dehydriert und darauf in Xylol zum Eindeckeln mit Entellan vorbereitet.

Mikroskopische Auswertung

Grad 0- keine Entzündungszeichen

Grad 1- niedrige Infiltration von Entzündungszellen

Grad 2- mittlere Infiltration von Entzündungszellen

Grad 3 - hohe Infiltration von Entzündungszellen

Grad 4 - sehr starke Infiltration von Entzündungszellen

Perjod-Schiff-Färbung (PAS-Färbung)

Die Perjod-Schiff-Färbung (Periodic acid-Schiff reaction) ist auch eine häufig verwendete Färbemethode, wodurch Zellstrukturen, welche neutrale Mukopolysaccharide, Muko- und Glykoproteine, Glykoglipide oder Phospholipide enthalten, sichtbar gemacht werden. Für die Darstellung der schleimbildenden Becherzellen in der Lunge wurden als erstes die Paraffinschnitte wie schon beschrieben entparaffiniert, rehydratisiert und wie folgt gefärbt.

- Spülen in Aqua dest.
- Perjod Saure (1%) 5 min
- Spülen mit Leitungswasser 5 min
- Spülen in Aqua dest.
- Schiff's Reagenz 15 min
- Spülen mit Leitungswasser 5 min
- Spülen in Aqua dest.
- Gegenfärbung mit Hämatoxylinlösung 2 min
- Bläuen in Leitungswasser 10-20 min
- Spülen in Aqua dest.
- Aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol 70%, 96%, 100%) je 3 min
- Xylol
- Eindecken mit Entellan

Bei dieser Reaktion fungiert die Perjodsäure als Oxidationsmittel, so dass Aldehydgruppen freigesetzt werden, die mit dem Schiffschen Reagenz reagieren. So erscheinen die mukusproduzierenden Drüsen in den Lungenpräparaten magentarot bis pink. Für die Differenzierung von Zytoplasma und Kernen in den Schnitten wurde eine Hämatoxylinfärbung vorgenommen.

Grad der Vermehrung von Becherzellen

- Grad 0 – keine Becherzellen
- Grad 1 – bis 20% Becherzellen
- Grad 2 – 20-40% Becherzellen
- Grad 3 – 41-60% Becherzellen
- Grad 4 – 61-80% Becherzellen
- Grad 5 – ab 80% Becherzellen

2.2.10.1.1 Kryoschnitte

Eine schnelle Methode zur Herstellung von Lungenschnitten ist das Schockfrieren von unfixiertem Gewebe. Die tiefgefrorenen Organe wurden vor dem Schneiden auf einen Halter mit Einbettmedium, welche als Matrix dient, aufgebracht und danach wurden Schnitte mit einer Dicke von 3 µm am Kryostat bei -20°C angefertigt. Das Einbettmedium übt gleichzeitig eine Schutzfunktion aus, so dass Oberflächenproteine nicht stark deformiert werden. Die fertigen Präparate wurden bei Raumtemperatur getrocknet und dann abhängig von der erwünschten Färbung direkt mit Aceton, Methanol oder einer Kombination aus beiden Fixiermitteln für etwa 10 Minuten fixiert. Alternativ mit 1% PFA in PBS für 20 Minuten bei RT inkubiert. Die Fixierung verursacht eine Präzipitation von Proteinen, bei der die Tertiärstruktur zerstört wird, aber die Primär- und Sekundärstruktur erhalten bleibt. Falls keine sofortige Verarbeitung der Schnitte erfolgte, wurden sie gut verpackt bei -20° gelagert.

Zum Nachweis von spezifischen Proteinen (F4/80) auf der Oberfläche von murinen Makrophagen, sowie zum Überprüfen von infiltrierten CD4⁺ T-Zellen in der Lunge wurden Kryoschnitte verwendet. Da Paraffin die Eigenschaft besitzt Oberflächenproteine zu vernetzen und dadurch deren Nachweis zu erschweren.

Immunhistofärbung von Kryoschnitten - F4/80 und CD4

Die Immunhistologie ist ein Verfahren, das zum Nachweis von Antigenen in histologischen Schnitten eingesetzt wird. Das Prinzip beruht auf der Antikörper-Antigen-Reaktion. Dazu wird Antikörper zielgerichtet gegen das nachzuweisende Antigen angewendet. In diesem Fall wurde primärer Antikörper gegen F4/80-Marker auf Makrophagen benutzt. Zur Detektion dieser Bindung wurde ein zweiter mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelter Antikörper eingesetzt. Der Sekundärantikörper ist immer gegen die Tierspezies des ersten Antikörpers gerichtet.

Die Auswahl der geeigneten Fixationsmittel, sowie die Temperatur sind entscheidend für die Affinität des Antikörpers zum Epitop. Zum Nachweis des Oberflächenantigens F4/80 wurden die Kryoschnitte mit 1% PFA in 1xPBS für 20-30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Es folgten drei Waschschrte mit 1xPBS für je 5 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Entfernen der Flüssigkeit vom Objektträger wurden die Schnitte mit einem wasserabweisenden Stift (DAKO Pen) vorsichtig umkreist, sodass die nachfolgenden Lösungen sich nur auf dem Präparat gut verteilen konnten und die Antikörperlösungen sich nicht mischen. Es ist zu beachten, dass die Schnitte vor Austrocknung geschützt werden sollen. Deshalb wurden die Proben zur weiteren Behandlung in eine feuchte Kammer überführt. Zum Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen wurde 3% BSA (fetales Kälberserum), gelöst in PBS, benutzt. Die Inkubation betrug 1 Stunde bei Raumtemperatur. Der F4/80-Antikörper (eBioscience) wurde austitriert und in einer Konzentration 1:100 in Blocklösung eingesetzt. Die Lungenschnitte wurden mit dem ersten Antikörper entweder für 1 Stunde bei 23°C oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch mehrere Waschschrte entfernt. Der fluorochromkonjugierte Sekundärantikörper (goat anti-rat Alexa 555) wurde im Blockpuffer 1:300 verdünnt. Zusätzlich wurde für die Kernfärbung die interkalierende Substanz 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) 1:10000 dazu pipettiert. Die Präparate wurden mit 200 µl 2.AK-DAPI-Lösung bedeckt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Darauf folgte erneutes Waschen mit PBS und anschließend in Aqua. Dest. Die Proben wurden mit Mounting Medium eingedeckt, das zugleich das Verblässen des Fluorochroms verlangsamt. Bis zur Analyse, die mittels konfokalem Laser-Scanning Mikroskop erfolgte, wurden die gefärbten Schnitte im Dunkel bei 4°C aufbewahrt. Damit unspezifische Anfärbungen ausgeschlossen werden können, wurden

Kontrollpräparate mitgeführt. Hierzu wurden Lungenschnitte nur mit DAPI, oder nur mit dem Sekundärantikörper behandelt.

Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Im Kapitel 2.2.12 wurde ausführlich die Behandlung der aus Knochenmark generierten Makrophagen beschrieben.

Um morphologische Veränderungen der Zellen infolge der verschiedenen Stimulationen zu untersuchen, wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Als erstes wurden die Makrophagen, die auf einem Objektträger, welcher in 8 Kammern unterteilt ist ausgesät, mit PBS gewaschen und mit 200 µl 4% PFA ohne Zusatz von Methanol für 20 Minuten bei 23°C fixiert. Die Zellen wurden anschließend drei Mal mit 1xPBS gewaschen. Da es sich um den Nachweis von intrazellulären Strukturen handelt, wurden die Proben mit 0,2% Saponinlösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Saponin beeinflusst die Permeabilität der Membran. Im nächsten Schritt wurde die Lösung entfernt und eine 5% BSA mit 0,2% Triton Blocklösung pipettiert. Die Inkubationszeit betrug 1 Stunde und erfolgte bei Raumtemperatur. Darauf folgte eine Doppelfärbung für 1 Stunde bei 23°C. Es wurden Primärantikörper, hergestellt in verschiedenen Spezies, gerichtet gegen Aktin und Tubulin verwendet. Das Detergenz Triton-100 in der Blocklösung verbessert das Durchdringen der Antikörper in die Zelle. Die Makrophagen wurden mehrfach gewaschen und weiter bei Raumtemperatur mit fluorochrommarkierten Zweitantikörpern (1:200 in 5% BSA+Triton) und DNA-Farbstoff Höchst 33342 (1:10000) im Dunkel inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mehrmals gewaschen, in Mounting Medium eingebettet und bei 4°C aufbewahrt. Parallel dazu wurden positive und negative Kontrollfärbungen durchgeführt.

2.2.11 Zellisolierung

Isolierung von Primärzellen aus der Lunge

Nach der Organentnahme wurde die Lunge weiter zur Einzelzellsuspension verarbeitet. Dafür wurden die restlichen Lungenlappen jeweils in eine Petrischale überführt und mit einem Skalpell fein zerkleinert. Da die Lunge ein kollagenreiches

Organ ist, wurde auch eine enzymatische Behandlung vorgenommen. Die Zellsuspension wurde in einem mit 5 ml Kollagenaselösung gefüllten Falcon für 45 Minuten bei 37° unter horizontalem Schütteln (300 rpm) inkubiert. Die Zusammensetzung der Verdauung beinhaltete Kollagenase Typ2 (300U/ml), ein proteolytisches Enzym, das die Kollagenfasern in Stützgewebe abbaut, und 150 µl DNase (10ng/ml) gelöst in 10 ml kaltem PBS. Nach der Inkubationszeit wurde das verdaute Gewebe durch ein Sieb mit Porengröße 40 µm mit dem Stempel einer 1 ml Einmalspritze in ein 50 ml Falcon durchgedrückt. Zugleich wurde das Sieb mehrfach mit RPMI-Medium, mit 1% PenStrep und 5% FCS gespült, sodass die Zellen sich vom Sieb lösten und Zellverluste vermieden wurden. Im nächsten Schritt wurde die Lungenzellsuspension für 10 Minuten bei 1200 rpm abzentrifugiert, gefolgt von der Abnahme des Überstandes. Das Zellpellet wurde mit 5 ml ACK-Lyse-Puffer behandelt, gut resuspendiert und bei Raumtemperatur für fünf Minuten inkubiert. Der Lysepuffer bewirkte das Aufplatzen der vorhandenen Erythrozyten. Nach der 5-minütigen Inkubation erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt mit nachfolgendem Dekantieren des Überstandes. Die Lungenzellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, um vorhandene nicht verdaute Gewebestückchen zu entfernen. Im Anschluss wurden die isolierten Lungenzellen in 10 ml 0,5% igem BSA-PBS-EDTA-Puffer (MACS Puffer) aufgenommen und mittels CASY-System die Zellzahl bestimmt.

Isolierung von Primärzellen aus der Milz

Die Gewinnung von Primärzellen aus der Milz verlief annähernd gleich wie die Lungenzellisolation, aber mit dem Unterschied, dass keine enzymatische Verdauung vorgenommen wurde. Die Milz wurde direkt nach der Entnahme durch ein Sieb in ein Reaktionsgefäß gedrückt und mehrmals mit kaltem Medium gewaschen und anschließend unter Standardbedingungen abzentrifugiert. Dann wurden die Erythrozyten durch Zugabe von 5ml ACK-Lyse-Puffer lysiert, gefolgt vom nächsten Zentrifugationsschritt. Der Überstand wurde entsorgt und das Zellpellet wurde in 10 ml PBS aufgenommen. Mit Hilfe einer 10 ml Pipette erfolgte das Entfernen von groben Fettpartikelchen. Zuletzt wurden die Milzzellen in 10ml MACS-Puffer resuspendiert und ausgezählt. Die gewonnenen Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt.

Isolierung von Primärzellen aus dem Thymus

Nach der Präparation des Thymus wurde dieser ebenfalls über ein Sieb unter ständigem Nachspülen mit frischem Medium zerdrückt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 1200 rpm wurde das Medium dekantiert und in gleicher Weise wie oben beschrieben erfolgte die Erythrozytenbehandlung. Nach dem zweiten Zentrifugationsschritt für 5 Minuten bei 1200 rpm wurde das Zellsediment in 5ml MACS-Puffer gut resuspendiert und 10µl Aliquot wurden zum Ermitteln der Zellzahl verwendet.

Isolierung von Knochenmarkzellen

Für die Isolierung von Knochenmarkzellen wurden weibliche Balb/c Maus mittels zervikaler Dislokation getötet. Unmittelbar danach wurde die Maus auf den Rücken gelegt und mit Ethanol gründlich desinfiziert. Unter sterilen Bedingungen wurde das Fell von der Ferse der hinteren Extremitäten bis zum Bauch aufgeschnitten. Nach vorsichtigem Entfernen der Haut erfolgte das Abschneiden des Beines am Hüftgelenk, welches kurz in 70%iger Ethanolösung geschwenkt und dann in DMEM F12 Medium mit 1% PenStrep und 2% FCS gewaschen wurde. Um die Knochen frei zupräparieren wurden die Muskeln und das Fleisch entfernt. Die so freigelegten Tibia und Femur wurden abgetrennt und in Spülmedium gelegt. Mit Hilfe einer Knochenschere wurden beide Knochenenden, die sogenannten Epiphysen, von der Diaphyse getrennt, welche das Knochenmark enthält. Das Knochenmark wurde nach Punktion mittels einer 25G Kanüle mit einer mit Medium gefüllten 10ml Spritze ausgespült. Nach dem Herstellen der Einzelzellsuspension durch mehrmaliges Resuspendieren wurden die Zellen über ein 40µl Sieb in ein 50 ml Röhrchen gegeben, so dass Knochensplinter im Sieb hängen blieben. Als nächstes wurden die Knochenmarkzellen für 5 Minuten bei 1500 rpm abzentrifugiert und nach der Abnahme des Überstandes mit 2ml Erythrozytenlysepuffer behandelt. Die Reaktion wurde mit 8ml Medium nach 5-minütiger Inkubationszeit gestoppt. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet in 20ml Kulturmedium resuspendiert und mittels Neubauer Zählkammer die Zellzahl ermittelt. Pro Tier wurden von 30×10^6 bis 70×10^6 Vorläuferzellen gewonnen, was mit dem Alter der Tiere korrelierte.

2.2.12 Generieren von Makrophagen

Die isolierten hämatopoetischen Zellen wurden in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt und pro Petrischale mit der Zugabe von 9 ml Differenzierungsmedium ausgesät. Es wurde DMEM-F12 Medium mit 1% PenStrep, 10% FCS und 20ng/ml rekombinatem mM-SCF verwendet. Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor, abgekürzt M-CSF, ist ein Wachstumsfaktor, der die Entwicklung von hämatopoetischen Vorläuferzellen zu ausdifferenzierten Makrophagen fördert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Feuchtigkeit. Am 2. Tag wurden pro Petrischale 5 ml frisches Differenzierungsmedium zugegeben. Am Tag 5 wurde das komplette Medium abgenommen, vorhandene zelluläre Bestandteile mit Medium entfernt und anschließend neues vorgewärmtes Kulturmedium zugegeben. Im Lichtmikroskop konnte beobachtet werden, wie die Zellen am Tag 6-7 die Morphologie von Makrophagen angenommen hatten. Am Tag 7 konnten die ausdifferenzierten Makrophagen für Versuche eingesetzt werden. Dafür wurde das Medium von der Platte entfernt, gefolgt von einem Waschschrift. Da Makrophagen über eine sehr hohe Adhärenz verfügen wurde ihr Ablösen zum Teil mit einer nicht-enzymatischen Lösung bewirkt. Zu diesem Zweck wurde zu den Zellen 10 ml kaltes PBS-EDTA Medium hinzugegeben, das Kalzium (Ca²⁺), das ein notwendiger Bestandteil für die Adhärenz der Zellen an die Zellkulturplatte ist, bindet. Die Inkubation erfolgte bei 4°C für 10 Minuten. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von Waschmedium gestoppt und die Zellen wurden sehr vorsichtig mit einem Zellschaber von der Platte abgelöst und in ein 50 ml Falcon überführt. Die Zellkulturplatte wurde zusätzlich mit Medium gespült, um einen Zellverlust so gering wie möglich zu halten und dann bei 1200 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Es folgte die Abnahme des Überstandes und die Aufnahme der Pellets in 10 ml Kulturmedium ohne mM-CSF. Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Charakterisierung der Makrophagen wurde mit dem Oberflächenmarker CD11b mittels FACS geprüft.

2.2.13 Behandlung von *in vitro* generierten Makrophagen

Analyse der Zytokinproduktion nach verschiedenen Behandlungen und phänotypischen Charakterisierung der Zellen

Um die Zytokinfreisetzung von Knochenmark generierten Makrophagen zu untersuchen, wurden 1×10^6 Makrophagen/ml pro Vertiefung in 2x12-Well-Platten ausplattiert. Die Zellen wurden mit Medium für 24 Stunden ohne Wachstumsfaktoren im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und die Makrophagen wurden unter unten aufgelisteten Konditionen stimuliert.

- (1) Kondition - unstimulierte Zellen
- (2) Kondition - OVA stimulierte Zellen
- (3) Kondition - LPS stimulierte Zellen
- (4) Kondition - hCG stimulierte Zellen
- (5) Kondition - OVA+hCG stimulierte Zellen
- (6) Kondition - LPS+hCG stimulierte Zellen

Die erste Kondition entspricht lediglich der Zugabe von DMEM-F12 Medium mit 1% Pen/Strep und 10% FCS. Zum Herstellen von OVA-Medium wurde 1,25 mg Ovalbumin in 20 ml des gleichen Mediums gelöst und durch einen 0,2 µm Filter steril gefiltert. Es wurden 62,5 µg OVA/ml auf die Zellen pipettiert. Für die Behandlung mit Lipopolysaccharid (Ausgangskonzentration: 1 mg/ml) wurde 1 µl LPS zu den Proben gegeben, was einer Endkonzentration von 1 µg/ml entspricht. Um die Wirkung von hCG (humanes Choriongonadotropin) auf Makrophagen zu untersuchen, wurden die Zellen mit 150U stimuliert. Dafür wurden 5000U hCG in 500 µl NaCl-Lösung gelöst und davon 15 µl pro Well in 985 µl des oben genannten Mediums zugegeben. Weiter wurde der Effekt von hCG in Kombination mit dem Eiweiß Ovalbumin, als auch in Verbindung mit LPS untersucht. Die Proben wurden für jeweils 24 und 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Später wurde der Überstand in 1,5 ml Eppis transferiert und bei -20°C bis zur ELISA-Durchführung eingefroren. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und je nach Fragestellung entweder in RNA-Lysepuffer aufgenommen oder mit Oberflächenmarker gefärbt und analysiert.

Untersuchung von Proteinen zu unterschiedlichen Zeitpunkten per Westernblot

Zum Nachweis von Proteinen unter dem Einfluss von hCG wurden in einem weiteren Versuch Makrophagen wieder in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in einer 12-Wellplatte ausgesät und ohne Zusatz von M-CSF bei 37°C für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden mit 150U hCG zu unterschiedlichen Zeitpunkten behandelt.

- (1) nicht behandelte Makrophagen
- (2) 30' hCG behandelte Makrophagen
- (3) 1h hCG behandelte Makrophagen
- (4) 2h hCG behandelte Makrophagen
- (5) 4h hCG behandelte Makrophagen
- (6) 8h hCG behandelte Makrophagen

Nach abgeschlossener Stimulation wurde der Überstand entsorgt, die Zellen gewaschen und 100 μl kalter Lysepuffer/Well hinzugefügt. Die Kulturplatte wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt, was das Ablösen und Aufbrechen der Makrophagen erzielte. Die lysierten Zellen wurden mit einem Zellschaber geerntet und in 1,5 ml Eppis überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Morphologische Charakterisierung von *in vitro* generierten Makrophagen mittels Immunfluoreszenzfärbung

Für die Untersuchung zytoplasmatischer Proteine, involviert in den IL-10 Signalweg als auch von Zytoskelett-Elementen, wurden 5×10^5 *in vitro* generierte Makrophagen in 8-Kammerobjektträgern ausgesät. Diese wurden, wie schon oben eingegeben, mit unterschiedlichen Stimuli zu unterschiedlichen Zeitpunkten behandelt. (Siehe: 2.2.10 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen).

2.2.14 Bestimmung der Zellzahl

In dieser Arbeit wurde die Zellzahl mittels zwei Methoden durchgeführt. Zum einen wurde das automatische Zellzählgerät Casy verwendet und zum anderen erfolgte das Auszählen manuell.

Bestimmung mittels Casy®-Zellzählgerät

CASY steht für „Cell Counter + Analyser System“. Dieses Gerät ist ein elektronischer Partikelzähler, der die Zahl, das Volumen und die Vitalität der Zellen schnell und präzise ermittelt. Das Prinzip der Messung basiert auf der Widerstandsmesstechnik. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl Zellsuspension in 10 ml eines schwachen Elektrolytpuffers (CasyTon Lösung) resuspendiert und durch eine Kapillare mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit aufgesaugt. Die Zellen passieren die Kapillare einzeln und dadurch verdrängen sie eine ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung. Dies führt zu einem erhöhten Widerstand in der Messspore, welcher in Korrelation mit der Größe der Zelle steht. In der Messkapillare sind die Zellen einer niedrigen Feldspannung ausgesetzt, die durch eine intakte Zellmembran nicht durchdringen kann. Im Gegensatz dazu passiert die elektrische Feldstärke geschädigte Membranen und so entsteht keine Spannung in der Kapillare. Mit der Auswertesoftware CASY EXCEL werden die Ergebnisse in Form einer Kurve auf dem Monitor dargestellt.

Manuelle Bestimmung der Zellzahl

Die Quantifizierung von Zellen erfolgte auch mittels Neubauer Zählkammer. Dafür wurde eine Einzelzellsuspension aus den pelletierten Zellen hergestellt. Davon wurden 10 µl entnommen und abhängig von der Dichte der Zellen in einem Verhältnis 1:2, 1:5 oder 1:10 mit 0,5% (w/v) steril filtrierter Trypanblaulösung gemischt. Weil Trypanblau zytotoxisch für die Zellen ist, sollte die Bestimmung der Zellen unmittelbar nach seiner Zugabe erfolgen. Aus dieser Mischung wurden 10 µl vorsichtig am Rand zwischen Deckglas und Zählkammer pipettiert. Durch die Kapillarkräfte wurde die Probe direkt aufgezogen. Der Farbstoff, Trypanblau ist ein polyanionischer Azofarbstoff, der durch die Membran toter Zellen diffundiert und sie im Mikroskop blau aussehen lässt. Die Membran von lebenden Zellen schließt den

sauren Farbstoff aus und deren Zytoplasma erscheint weiß. Die Anzahl intakter Zellen wurde in den vier Quadranten bestimmt und nach folgender Formel berechnet. (Zellzahl: 4) x Verdünnungsfaktor x 10^4 (Kammerfaktor)=Zellen/ml

So ließ sich lichtmikroskopisch die Zahl und Vitalität der Zellen bestimmen.

2.2.15 Zellkultur

Behandlung von Lungenzellen mit α CD3/ α CD28

Nach der Isolation wurden die Lungenzellen unter Standardbedingungen abzentrifugiert und in RPMI-Medium mit 1% PenStrep und 5% FCS in der gewünschten Konzentration aufgenommen. *In vivo* erfolgt die Aktivierung von T-helper Zellen über Bindung des präsentierenden Antigens an dem spezifischen T-Zell-Rezeptor (TZR), der mit dem CD3 Rezeptor und den Zeta-Ketten, den sogenannten TCR-CD3-Komplex bildet. In Abwesenheit von Antigen präsentierenden Zellen *in vitro* werden monoklonale α -CD3 Antikörper eingesetzt, die über die CD3-Untereinheiten die T-Zellen aktivieren, was mit Aktivierung, Wachstum und Zytokinfreisetzung assoziiert ist. Aus diesem Grund wurden für die Kultivierung von primären Zellen vorerst 24-Well-Platten oder 48-Well-Platten mit 10 μ g/ml anti-CD3-Antikörper, gelöst in NaHCO_3 , beschichtet. Pro Vertiefung wurden 100 μ l (24-Well-Platte) und 50 μ l (48-Well-Platte) Lösung pipettiert, gut verteilt und anschließend für 1 Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit, was der Adhärenz des Antikörpers entsprach, wurde der Überstand unter sterilen Bedingungen abgesaugt. Zur Entfernung von ungebundenem anti-CD3 wurden die Zellkulturplatten zusätzlich mit PBS gewaschen. Der letzte Schritt bestand in dem Aussäen der ausgewählten Menge an Zellen in den Kulturschalen. Es wurden 1×10^6 Zellen/ml in den 24-Well-Platten und 5×10^5 Zellen/500 μ l in den 48-Well-Platten ausplattiert. Ein Teil der aufgetragenen Proben wurde zugleich mit löslichem anti-CD28 (2 μ g/ml) Antikörper stimuliert. Diese zusätzliche Anregung des costimulatorischen Moleküls CD28 führte zur Proliferation der T-Lymphozyten und zu verstärkter Zytokinausschüttung. Die somit behandelten Lungenzellen wurden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. 24 Stunden später wurden die Überstände abgenommen und bei -20°C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

2.2.16 FACS-Analyse

Markierung von Zelloberflächenmolekülen

Die Charakterisierung von verschiedenartigen Zellpopulationen lässt sich mit Hilfe von markierten Oberflächenproteinen durchführen. Für eine Oberflächenfärbung wurden mindestens 5×10^5 Zellen benötigt, die in ein FACS-Röhrchen überführt wurden. Die gewünschten Antikörper wurden in 60 μ l PBS-Lösung 1:200 verdünnt und auf die Zellen pipettiert und gut durchmischt. Die Proben wurden für 30 Minuten bei 4°C lichtgeschützt inkubiert und anschließend einmal in 500 μ l PBS gewaschen und 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und das Zellsediment mit 200 μ l PBS versetzt. Die gefärbte Zellsuspension ist nun für die Messung bereit. Falls das Ausmessen der markierten Proben nicht am gleichen Tag erfolgte, wurden sie in 2% PFA in PBS aufgenommen und solange bei 4°C unter Lichtausschluss gelagert, um eine Inaktivierung des Fluorochroms zu verhindern. Derart wurden die zu untersuchenden Zellen zielgerichtet mit unterschiedlichen Antikörpern angefärbt, die auch mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert waren. Es wurden folgende Oberflächenstrukturen untersucht: CD4, CD8, CD11b, CD25, CD40, CD44, CD62L, CD69, CD80, CD86, MHC-II. Zusätzlich wurden Isotypkontrollen verwendet, damit falsch positive Ergebnisse vermieden wurden. Weiterhin wurden immer Kompensationkontrollen abhängig von den Mehrfachfärbung mitgeführt.

Markierung von intrazellulären Molekülen

Diese Methode ermöglicht das Nachweisen von intrazellulären Molekülen, wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren und Zytokine. Weil die intrazelluläre Färbung immer mit Fixation, sprich mit Quervernetzung von Oberflächenmolekülen verbunden ist, was die Erkennung der Oberflächenproteine von Antikörper unmöglich macht, folgt grundsätzlich die intrazelluläre Behandlung danach. Nach erfolgter Oberflächenfärbung wurden die Zellen mit Permfix-Lösung fixiert und gut gemischt. Die Proben wurden für 30 Minuten im Kühlschrank aufbewahrt und dann für 5 Minuten bei 1500 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, sodass das Pellet nicht zerstört wurde. Um das Zielprotein in diesem Fall der Transkriptionsfaktor Foxp3 zu markieren, muss der Puffer, in dem der

Fluoreszenzantikörper für die intrazelluläre Färbung aufgenommen wird, ein Detergenz wie z. B. Saponin enthalten. Es macht die Zellmembran permeabel und das Zellinnere für den Antikörper zugänglich. Dafür wurde eine 0,1% Saponinlösung verwendet. Nach dem Inkubieren bei Raumtemperatur im Dunkel wurde der überschüssige ungebundene Antikörper mit Perm-Wash entfernt. Es folgte ein letzter Zentrifugationsschritt und das Absaugen des Überstandes. Das Zellpellet wurde in 200 µl EDTA aufgenommen und bis zur Messung bei 4°C aufbewahrt. Im Gegensatz zu einer Oberflächenmarkierung wurde für die intrazelluläre Färbung das Dreifache an Zellen (ca. $1,5 \times 10^6$) eingesetzt, weil die Mehrzahl an Waschschritten zu möglichen Zellverlusten führt.

Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Messverfahren zur Quantifizierung mehrerer Parameter, wie Oberflächen- und Intrazellulären Strukturen verschiedener Zelltypen. Ein Durchflusszytometer sortiert und zählt die Zellen und ein Gerät, das die Zellen gleichzeitig noch auftrennt, wird als fluoreszenzaktivierter Zellsorter (FACS) bezeichnet. Zur Identifizierung vieler Zellstrukturen oder Subpopulation wird ein Gemisch markierter Zellen durch eine Düse gedrückt. Dadurch entsteht ein feiner Flüssigkeitsstrahl mit vereinzelt Zellen, die durch einen Laserstrahl in bestimmten Abständen geführt werden. Dabei kommt es zu einer Lichtstreuung an den Zellen und die gebundenen Farbstoffmoleküle werden zur Fluoreszenz angeregt. Mittels empfindlicher Photodetektoren wird sowohl das gestreute als auch das emittierte Licht der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe gemessen. Das erste liefert Informationen über die Größe und die Granularität der Zelle, die in den Diagrammen als FSC (Vorwärtsstreulicht) und SSC (Seitwärtsstreulicht) zu erkennen sind. Das zweite gibt Auskunft über fluoreszierende Bindungen und damit über die Expression der Zielmoleküle.

Zur Aufzeichnung und Analyse der Daten ist das Gerät (FACS calibur) an einen Computer angeschlossen und mit Hilfe des Computerprogramms Cellquest pro® werden die statistischen Auswertungen durchgeführt. Es gibt verschiedene Darstellungsformen der Ergebnisse, wie das Punktdiagramm, das Histogramm und das Konturdiagramm.

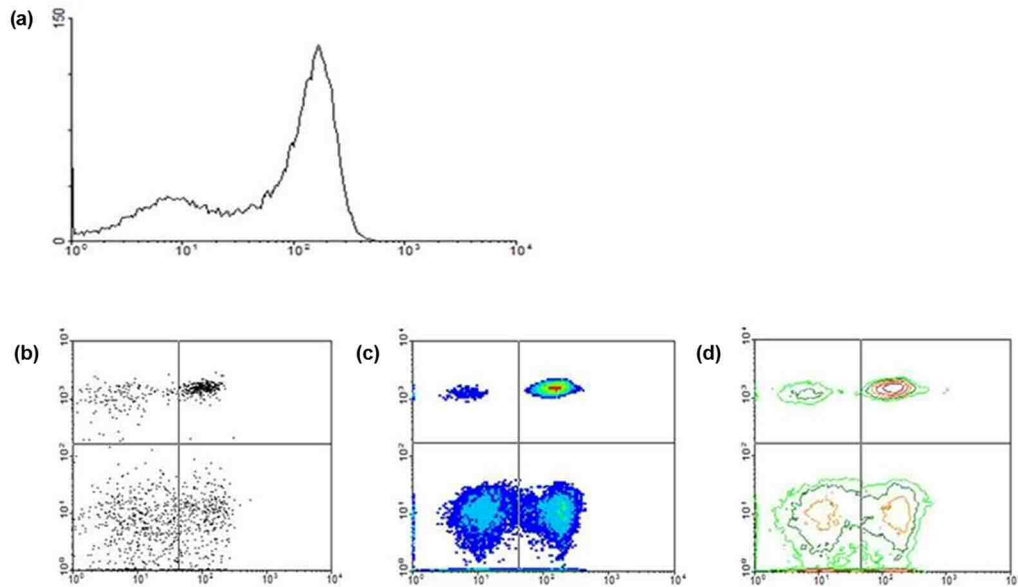


Abbildung 10: Verschiedene Darstellungstechniken.

Histogramme (a) zeigen die Verteilung von Zellen, die durch einen einzigen Parameter charakterisiert werden (Größe, Granularität, Lichtintensität). Wenn zwei oder mehr Parameter pro Zelle dargestellt, bzw. verglichen werden müssen, sind Punkt- (b), Dichte- (c) und Konturdiagramme (d) dafür geeignet. Jede Zelle, deren Fluoreszenz gemessen wird, wird im Plot durch einen Punkt repräsentiert.

Um die Eigenschaften eines einzigen Zelltyp oder ganzer Zellopopulationen zu untersuchen, markiert man die Zellen mit einem oder mehreren Antikörpern, an die ein Farbstoffmolekül gekoppelt ist. Mittels vieler Fluorochrome (Phycoerythrin (PE), Peridin-Chlorophyll-a-Proteinkomplexe (PerCP), Allophycocyanin (APC), Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) usw.), die unterschiedliche Emissions- und Absorptionsspektren besitzen, können mehrere Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig detektiert werden. Da es zu spektralen Überlappungen infolge der Überschneidung von Emissionsspektren einiger Fluorochrome kommen kann und um falsche Messergebnisse zu vermeiden, müssen mit der verwendeten Software Korrekturen (sog. Kompensation) vorgenommen werden. Durch die FACS-Methode können zahlreiche immunologische Fragestellungen untersucht und aufgeklärt werden.

2.2.17 Enzymed Linked Immuno Sorbant Assay (ELISA)

ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren, was zur Quantifizierung von einzelnen Proteinen, Viren, Hormonen, Toxinen usw. angewendet wird. Mit dieser Technik wurde die Immunoglobulinkonzentration vom Gesamt-IgE, OVA-spezifischen IgE, IgG1 und IgG2 im Serum, als auch die Zytokinproduktion von IL-13, IL-5, IL-4, IL-10, IL-17 und IFN- γ in der BAL-Flüssigkeit und den Zellkulturüberständen bestimmt. Da es sich um einen Sandwich-ELISA handelt, erfolgte zu Beginn die Beschichtung einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit dem ersten Antikörper (Capture-Antikörper) gerichtet gegen das Zielprotein (Antikörper oder Interleukine). Anschließend wurde die Platte entweder bei 4° oder Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Als nächstes wurden die ungebundenen Bestandteile des Antikörpers mit drei Waschschritten entfernt und darauf die unspezifischen Bindungsstellen durch Blockpuffer für mindestens 1 Stunde bei ca. 22°C demaskiert. Im nächsten Schritt wurde die Platte erneut mehrmals gewaschen. Die Proben wurden mit dem nachzuweisenden Antigen in Doppelbestimmung in die Wells pipettiert. Parallel zu den Proben, auch in Doppelbestimmung wurde eine Standardverdünnungsreihe bezogen auf das zu untersuchende Protein aufgetragen. In der zweistündigen Inkubationszeit erfolgte das Bindender Primärantikörper an einem spezifischen Epitop auf dem Antigen. Nach der Inkubation wurden alle ungebundenen Antigene mit Waschpuffer entfernt und danach direkt der sekundäre Antikörper zugegeben, der ein anderes Epitop auf dem Zielantigen erkennt und anschließend dort bindet. Gleichzeitig wurde das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) pipettiert. Wie der Name schon sagt, handelt es sich um eine aus Meerrettich isolierte Peroxidase, die am zweiten Antikörper konjugiert. Die Bildung des Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex fand bei Raumtemperatur für mindestens 1 Stunde statt und anschließend wurde überschüssiger 2. Antikörper rausgewaschen. Um die Menge des vorhandenen Antikörpers in der Platte zu quantifizieren, wurde eine farblose Detektionslösung mit Wasserstoffperoxid zugegeben. Infolgedessen spaltete das Enzym das Substrat und dies führte zu einem sichtbaren Farbniederschlag. Die Sättigungsdauer betrug zwischen 5-45 Minuten. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von je 50 μ l Stopplösung (H₂SO₄) unterbunden, indem die Peroxidase zerstört wurde. Die Absorption der Proben wurde bei 450nm in einem Mikrotiterplatten-Autoreader bestimmt. (siehe: Abb.11)

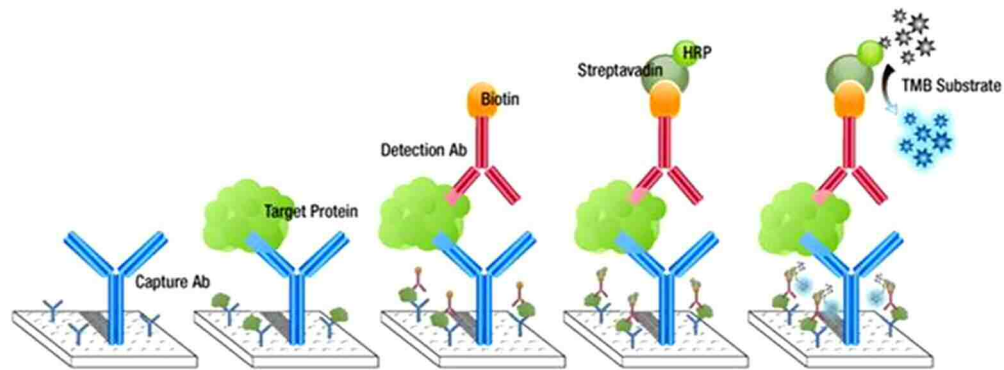


Abbildung 11: Bildliche Darstellung des Sandwich-ELISA

1.Schritt: Belegen der Platte mit dem ersten Antikörper (Capture Ab); 2.Schritt: Auftragen der Proben (Antigen); 3.Schritt: Zugabe des zweiten Antikörpers (Detection Ab); 4. Schritt: Bindung des Enzyms Meerrettichperoxidase (HRP) an den zweiten Antikörper; 5.Schritt: Zugabe des zum Enzym passenden Substrates. Quelle:[242]

2.2.18 Western Blot

Proteinisolation aus Gewebe und Zellen

Eine Proteinanalyse erfordert vorab die Probenaufarbeitung. Zum einen wurden Gewebeproben und zum anderen Zellen bearbeitet. Die bei -80°C aufbewahrten Lungenstücke wurden in ein 1,5 ml konusförmiges Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurde ein frisch angesetzter kalter Lysepuffer, zusammengesetzt aus 1% NP-40 in PBS mit Zusätzen von Protease und Phosphatase Inhibitoren, pipettiert. Mit Hilfe eines mechanischen Homogenisators wurde das Gewebe, bis zur Bildung einer homogenen Mischung, zerkleinert. Um Verunreinigungen zwischen den einzelnen Proben zu vermeiden, wurde das Gerät mit 1xPBS gespült. Für das Aufschließen von noch intakten Zellmembranen wurden die Homogenate für 2 Minuten bei Raumtemperatur im Ultraschallbad behandelt. Dabei wurden zusätzliche Proteine freigesetzt, die durch die verschiedenen Inhibitoren in der Lösung nicht abgebaut werden. Anschließend erfolgte die Zugabe von Benzonase(konz), die zum Scheren von DNA eingesetzt wurde. Um die Proteinextraktion zu begünstigen wurde das so verarbeitete Gewebe für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Das Zelllysate wurde für 20 Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert. Durch die Abnahme des Überstandes erfolgte das Trennen des Gesamtzelllysates, inklusive der Proteine, von den Zelltrümmern,

die entsorgt wurden. Darauf folgte die Bestimmung der Proteinkonzentration. Es ist zu erwähnen, dass alle Schritte auf Eis stattfanden.

Wie in den *in vitro* Versuchen beschrieben wurde, wurden 1×10^6 Makrophagen/Well ausplattiert und behandelt. Nach der Stimulation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 100 μ l des gleichen Lysepuffers auf 1×10^6 Zellen pipettiert. Zum Lysieren der Zellen wurde die Platte für 10 Minuten leicht geschüttelt. Mittels eines Zellschabers wurden noch adhärenente Zellen von der Platte abgelöst und das ganze Homogenat in ein Reaktionsgefäß transferiert. Die weitere Proteinisolation fand wie oben beschrieben statt.

Proteinbestimmung

Für das qualitative und quantitative Vergleichen von Proteinen mittels Western Blot, ist die Proteinmenge in den verschiedenen Lysaten zu überprüfen, entscheidend. Es existieren verschiedene gut etablierte Methoden zur Proteinbestimmung, wie die Biuret- und ABC-Methode, sowie die Methode nach Lowry als auch nach Bradford. Man kann Proteine außerdem mittels UV-Absorption ermitteln. In dieser Arbeit wurde ein modifiziertes Verfahren Bradford (1976) angewendet. Das Prinzip basiert auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blau an Aminosäuren. Die ungebundene kationische Form des Farbstoffs wird durch die Komplexbildung mit Proteinen in seine anionische stabile Form umgewandelt. Dadurch ändert sich das Absorptionsmaximum vom Farbreagenz von 465 nm (protonierte bräunliche Form) zu 595 nm (unprotonierte blaue Form).

Um die Proteinmenge zu bestimmen wurde die Probe laut Gebrauchsanweisung vorerst 1:40 mit Aqua dest. verdünnt und 50 μ l der verdünnten Probe im Doppelansatz in die Vertiefung einer Mikrotiterplatte pipettiert. Dazu wurden 200 μ l des 1:5 vorverdünnten Roti Nanoquants gegeben. Roti Nanoquant basiert auf einer Modifikation der Methode nach Bradford, womit die Quantifizierung von Proteinen in wässrigen Lösungen ab 200ng analysiert wird. Zwischenzeitlich wurde eine Standardreihe mit bekannter Proteinkonzentration erstellt. Anhand dieser sollte später die unbekannte Proteinmenge berechnet werden. Hierzu wurden vier Verdünnungen (30 μ g/ml; 50 μ g/ml; 60 μ g/ml; 80 μ g/ml) des Rinder-Serumalbumins (BSA) angesetzt und ebenfalls 50 μ l in Doppelbestimmung pipettiert und mit dem gleichen Farbstoff versetzt. Für den Nullwert der Eichgerade wurde nur das verdünnte Nanoquant mit destilliertem Wasser gemischt. Die Farbreaktion trat

während der Inkubationszeit bei Raumtemperatur auf. 5 Minuten später wurde die Messung im ELISA Reader durchgeführt. Die Absorption aller Ansätze wurde bei 590nm und 450nm gemessen, wobei der gemessene Wert bei 450nm als Referenzwert fundierte. Aus den ermittelten Extinktionswerten der Lösungen wurde der Quotient 590 nm/450 nm gebildet, der das Verhältnis zwischen gebundenem und ungebundenem Coomassie Blau anzeigt. So wurde auf Basis der ermittelten BSA-Eichgerade die Proteinkonzentration berechnet.

SDS-Page (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese)

Die SDS-Gelelektrophorese ist eine Standardmethode zum Nachweis von Proteinen in einem komplexen Gemisch. Da Proteine verschiedene elektrische Ladungen und dadurch unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten und -richtungen im elektrischen Feld haben, werden diese mit dem starken anionischen Detergenz SDS versetzt, das durch seine hydrophoben Schwanzgruppen in das Innere des Proteins eindringt und es denaturiert. D. h., ihre Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur wird zerstört. Es kommt zur Bildung von lang gestreckten Protein-SDS-Komplexen mit gleichmäßig verteilter negativer Ladung, wodurch die Wanderung und Trennung der Proteine im elektrischen Feld nur von ihrer Molekülmasse abhängig ist. Die native Konformation einiger Proteine wird zusätzlich durch Disulfidbrücken stabilisiert, die durch Erhitzen gespaltet werden.

Zu diesem Zweck wurden 30µg des Lysats mit 2fach oder 5fach Ladepuffer (Roti®-Load) versetzt, anschließend für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und auf Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Anfangswanderung im Sammelgel erfolgte in den ersten 30 Minuten bei einer Stromstärke von 50 Volt und die Auftrennung im Trenngel bei 130 Volt. Je nach Molekulargewicht des jeweiligen Proteins wurden Trenngele (z.B. 10%, 15%) mit unterschiedlicher Porengröße hergestellt, welche sich von der Acrylamidkonzentration bestimmen lässt. Zusätzlich wurde zur Bestimmung der Proteingröße ein Molekularmarker aufgetragen.

Transfer und Nachweis von Proteinen

Nach der Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran, die über eine hohe Proteinbindungskapazität verfügt. Hierfür wurde das Gel mit der Trägermembran zwischen mehrere Lagen von Filterpapier gelegt und senkrecht in eine mit Puffer gefüllte Kammer gestellt. Der Proteintransfer dauerte 90 Minuten bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA. Für eine optimale Temperatur diente eine Kühleinheit.

Im Anschluss wurde die Membran mit 1xPBS gewaschen und dann mit Blocklösung (5% Milchpulver in PBS) für 1 Stunde bei RT inkubiert. So wurden freie unspezifische Bindungsstellen auf der Membran blockiert. Im nächsten Schritt wurde die Behandlung mit dem ersten Antikörper (1:1000), der spezifisch gegen das Zielprotein gerichtet ist, verdünnt in der gleichen Blocklösung, über Nacht bei 4°C durchgeführt. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran 3 Mal jeweils 5 Minuten mit 1xPBS/Tween und weiter mit dem an eine alkalische Phosphatase gekoppelten Zweitantikörper, gelöst im Blockpuffer in einer Konzentration 1:15000, für eine Stunde bei RT behandelt. Danach wurde die Membran mehrmals mit PBS/Tween gewaschen. Zur Detektion der Proteine wurde die Membran je 2 Mal mit Assay-Puffer für 10 Minuten bei RT und anschließend zur Signalverstärkung mit Nitroblock II (1:200), gelöst in Assay-Puffer, für 10 Minuten inkubiert. Im selben Puffer wurde das Substrat der alkalischen Phosphatase (1:1000) verdünnt und im Anschluss zu der Membran pipettiert. Nach 5 minütiger Inkubationszeit erfolgte die Entwicklung im Chemidoc-Gerät.

2.2.19 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, kurz PCR) ist ein enzymabhängiges Verfahren zur *in vitro* Amplifikation definierter DNA-Abschnitte. Für eine qualitative PCR werden Ausgangs-DNA-Material (Template), passende Oligonucleotide (Primers) dienend als Start-DNA, eine ausreichende Menge von Nukleotiden (dNTPs), hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) und ein Mg²⁺ enthaltender Reaktionspuffer, geeignet für die Wirksamkeit der DNA-Polymerase, benötigt.

Die genomische DNA gewonnen aus den Ohrbiopsien der $Sirt1^{flox/flox}$, $CD4^{Cre/+}$ und $Sirt1^{flox/flox} CD4^{Cre/+}$ Mäuse wurde mit Hilfe dieser Technik analysiert. Für die Durchführung einer Standard-PCR wurden folgende Komponenten in 20 μ l-Reaktionsansätzen verwendet.

Ampliqon III (1,1x)	18 μ l
Primer A	100 pmol/ μ l
Primer B/C	100 pmol/ μ l
DNA-Vorlage	1 μ l
Dest. H ₂ O	ad 20 μ l

Folgende Primer wurden mit zwei separaten PCR-Programmen amplifiziert:

P1 (A): 5' - CGT CCC TTG TAA TGT TTC CC - 3'

P2 (B): 5' - CGT CCC TTG TAA TGT TTC CC - 3'

P3 (C): 5' - GGT AAA AAG TTG TAC CTA CTT - 3'

Die PCR beruht auf der zyklischen Wiederholung von drei Schritten. Der Erste ist die Denaturierung der doppelsträngigen DNA, die durch Erhitzen (92-94°C) in Einzelstränge gespalten wird. Im zweiten Schritt erfolgt eine primerspezifische Temperatursenkung (50-65°C), die der Hybridisierungsvorgang begünstigt. Hier wird eine stabile Verbindung zwischen Primer und Zielgenbereich, die komplementär zueinander sind, aufgebaut. Zusätzlich beginnen die Polymerasen Nukleotide anzubauen, um die Verbindung zwischen Primern und DNA zu verstärken. Dieser Prozess wird im letzten Schritt verlängert. Es kommt zur Synthese neuer DNA-Stränge, die bei einer optimalen Arbeitstemperatur (72-75°C) für die verwendete Polymerase verläuft. Mit jedem Zyklus wird die DNA zwischen den beiden Primern verdoppelt, dies führt zu einer exponentiellen Vermehrung der DNA-Fragmente einer bestimmten Länge.

Für diese Gewebetypisierung verlief die Reaktion unter Standardbedingungen in einem Thermocycler 36 Zyklen:

1. Schritt: Initiale Denaturierung (94°C, 4 min)
2. Schritt: Denaturierung (94°C, 30 sec), Primer-Annealing (60°C, 30 sec), Elongation (72°C, 1 min)
3. Terminale Elongation (72°C, 5 min)
4. Kühlung (4°C)

Das vervielfältigte Produkt wurde in einem mit Ethidiumbromid gefärbten 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Zum Vergleich wurde das Gel mit einem DNA-Längenstandard sowie einer Negativ- und Positivkontrolle beladen.

2.2.20 Statistische Auswertung

Alle *in vivo* Experimente wurden drei bis fünf Mal durchgeführt und die *in vitro* Versuche wurden in Duplikaten oder Triplikaten angefertigt. Die gesamte statistische Auswertung in dieser Arbeit wurde als Mittelwert \pm Standardfehler mit Hilfe des Programmes Excel berechnet und in verschiedenen Diagrammformen dargestellt. Die Signifikanz zwischen den einzelnen Gruppen wurde mit dem Zwei-Stichproben t-Test (Student's t-Test) für unabhängige Stichproben berechnet. Dabei gilt: *: $p < 0,05$ (schwach signifikant); **: $p < 0,01$ (signifikant); ***: $p < 0,001$ (hoch signifikant).

3 Ergebnisse

3.1 HCG–Effekt bei Asthma bronchiale

Frühere Studien ergaben, dass das humane Choriongonadotropin neben seinen endokrinen, parakrinen und autokrinen Funktionen auch über immunregulatorische Eigenschaften verfügt. Zur Aufklärung der immunologischen Funktion von hCG im allergischen Asthma wurden die charakteristischen Merkmale dieser Erkrankung in dem schon beschriebenen *in-vivo*-Modell (Abb. 6) analysiert. Hierzu gehören die Überempfindlichkeit des oberen und unteren Respirationstrakts, die Atemwegsentzündung, die Serumbestimmung der spezifischen Immunglobuline sowie das Ermitteln des Th2-Zytokinprofils. Wie im Methodenteil angegeben, erfolgte die Applikation des humanen Choriongonadotropins intranasal. Therapeutisch werden sowohl aus wässrigen als auch lipophilen Systemen Wirkstoffe über die Nasenschleimhaut in Form von Tropfen und/oder Sprays systemisch absorbiert. Da hier ein topischer Effekt in der Lunge angestrebt wurde, erforderte die Aufnahme des Peptidhormons eine Inhalationsnarkose (Isofluran).

3.1.1 Wirkung von hCG auf die Atemwegshyperreagibilität

Mit dem Begriff Hyperreagibilität wird eine Überempfindlichkeit der Atemwege beschrieben, die unter bestimmten Bedingungen mit einer Atemwegsobstruktion reagieren kann. Der Nachweis dieses asthmatischen Parameters erfolgte mittels zweier verschiedener Systeme der Firma BUXCO®, das nicht-invasive und invasive System.

Die Hyperreagibilität der oberen Atemwege lies sich 24 Stunden nach der letzten OVA und/oder PBS Aerosol-Verabreichung durch das nicht-invasive Ganzkörperplethysmographen-System ermitteln. Die Ergebnisse betrachtend (Abb. 12 a/b) konnten nur geringe Unterschiede zwischen den drei Hauptgruppen erfasst werden. Die mit 150U und 300U hCG behandelten Mäuse wiesen nur bei der mittleren Methacholindosis eine niedrige Penh* auf, im Vergleich zu dem konstant erhöhten Penh-Wert, der in den OVA/OVA Mäusen beobachtet wurde.

*Penh= Indikator für die Bronchokonstriktion der oberen Atemwege (siehe 2.2.4)

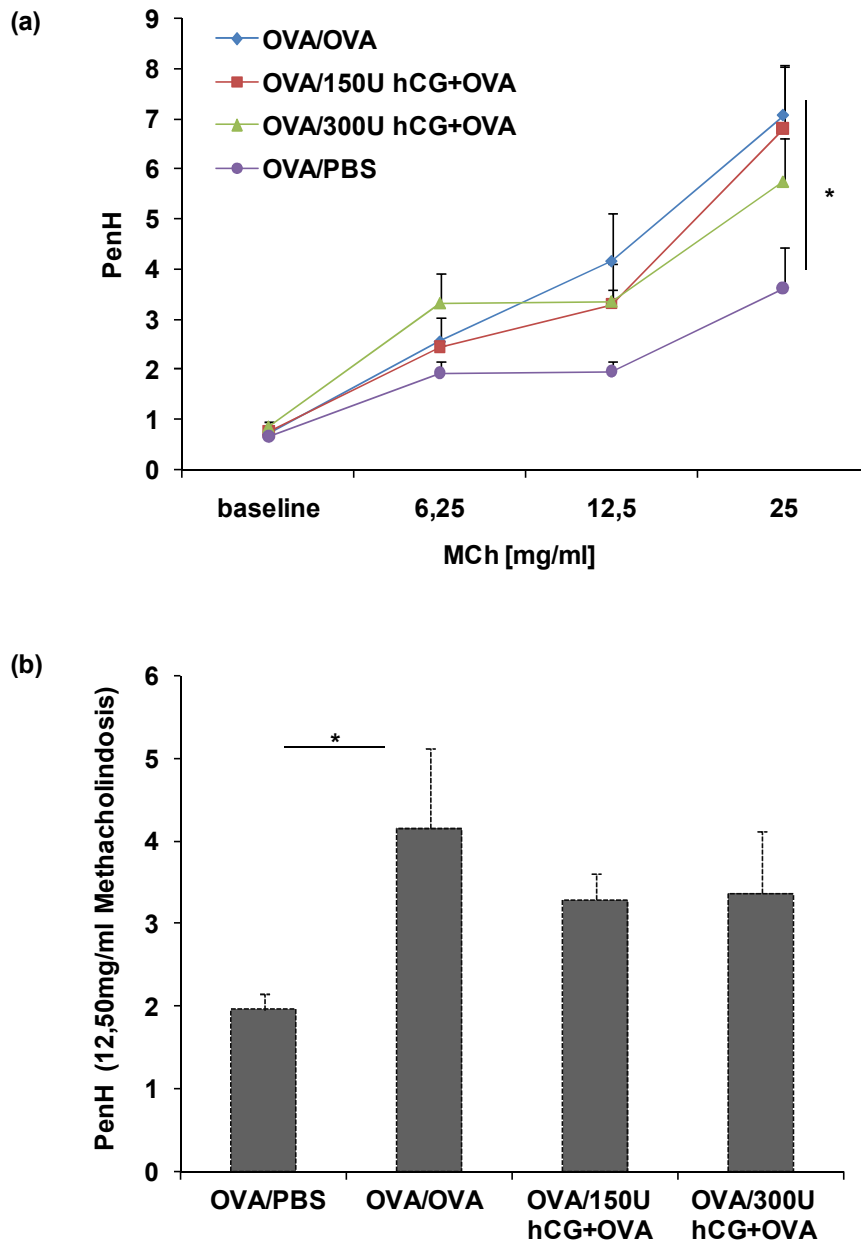


Abbildung 12: Einfluss von hCG auf die oberen Atemwege

Die Überempfindlichkeit der oberen Atemwege wurde bei aufsteigender dreistufiger Methacholinprovokation (6,25; 12,50 und 25,00 mg/ml) mittels des nicht-invasiven Systems der Firma BUXCO® (whole-body-plethysmographie) am Tag 17 untersucht. Alle Versuchstiere wurden zweimal (Tag 0 und 7) mit OVA/Alum-Lösung intraperitoneal immunisiert und anschließend an drei hintereinander folgenden Tagen mit OVA, OVA/hCG und PBS behandelt (siehe 2.2.3 Behandlungsprotokoll). Im Liniendiagramm (a) ist die Gabe aller Methacholindosen und im Balkendiagramm (b) lediglich die 12,50 mg/ml Dosis dargestellt. Mittelwerte \pm SD (n=3-4). Signifikanzniveau: * (P<0,05).

MCh = Methacholin, PenH =erweiterte Pause

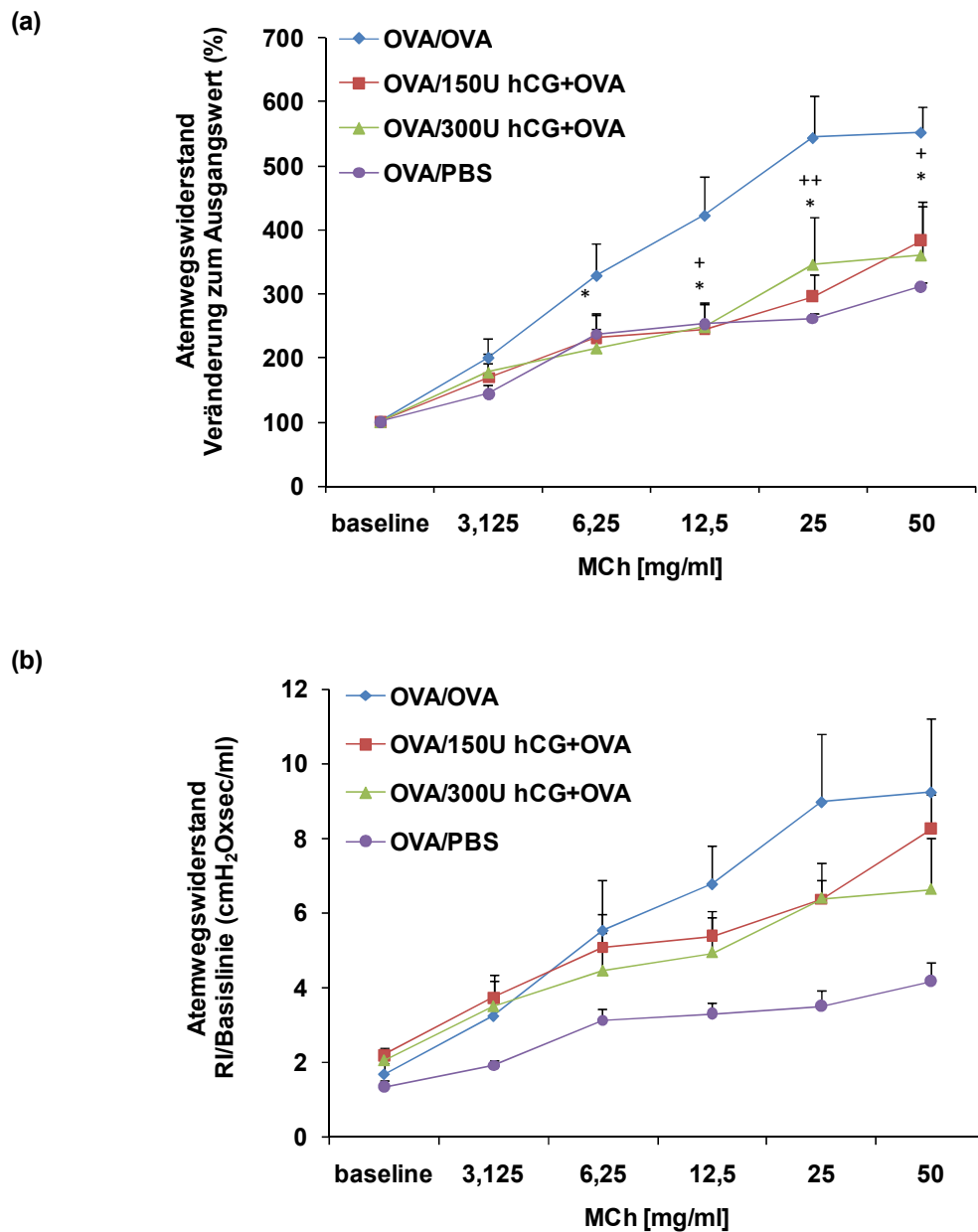


Abbildung 13: Einfluss von hCG auf die unteren Atemwege

Der Atemwegswiderstand des unteren Respirationstrakts wurde 48 Stunden nach der letzten OVA bzw. PBS-Provokation (siehe 2.2.3 Behandlungsprotokoll) mittels des invasiven Systems der Firma BUXCO® gemessen. Hierfür wurde Methacholin in ansteigender Dosierung (3,125, 6,25; 12,50; 25 und 50mg/ml) appliziert. Die Hyperreagibilität der unteren Atemwege ist in (a) als Veränderung zum Ausgangswert und (b) als prozentuale Änderung von der Basislinie dargestellt. Mittelwerte \pm SD (n=3-4). Signifikanzniveau: * (P<0,05).

MCh = Methacholin

Um die Wirkung des Schwangerschaftshormons auch auf den tieferen Atemtrakt zu überprüfen, wurde am Tag 18 eine invasive Lungenfunktionsmessung durchgeführt. Dabei wurden die Bronchien aller Tiere mit fünf aufsteigenden Methacholin-Konzentrationen provoziert. Wie aus dem Diagramm zu erkennen ist, gibt es deutliche Differenzen in der Hyperreagibilität der zu untersuchenden Gruppen. In den OVA/OVA Mäusen wurde eine sehr starke bronchokonstriktorische Reaktion hervorgerufen. Im Gegensatz dazu zeigten die zusätzlich mit Hormon behandelten Tiergruppen einen verminderten Atemwegswiderstand. Beide Hormonkonzentrationen untereinander vergleichend, fällt eine kontinuierlich niedrige Bronchokonstriktion, in den mit 300U hCG intranasal behandelten Tieren, auf.

3.1.2 Effekt von hCG auf die humorale Immunantwort

Beim Asthma bronchiale spielt die humorale Immunantwort eine wichtige Rolle. Dafür wurde nach der Lungenlavage Blut aus dem Herzen der Versuchstiere entnommen. Das so gewonnene Blutserum diente als Quelle der Immunglobuline E, G1 und G2a, die mittels ELISA nachgewiesen wurden.

Allergisches Asthma ist durch eine verstärkte IgE Antikörperproduktion gekennzeichnet, die in diesem murinen Modell durch das Antigen Ovalbumin ausgelöst wurde. Es wurde sowohl der Gesamt IgE-Level als auch der OVA-spezifische IgE Spiegel untersucht. Allerdings zeigte die Hormonapplikation keinen Effekt auf die IgE Sekretion. Bei allen drei asthmatischen Modellen wurde im Blutserum nahezu der gleiche Antikörperlevel detektiert (Abb.14 a, b). Immunglobulin G macht die Hauptmenge der gelösten Antikörper im Serum aus. In den frühen 1960er Jahren wurde bekannt, dass die IgG-Antikörper in vier Subklassen (IgG1-IgG4) zu unterteilen sind. Alle Unterklassen wurden bei Mensch (IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4), Maus (IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3) und Ratte nachgewiesen. Sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen wurde eine allergenspezifische IgG1 Produktion, welche die Th2-Immunantwort fördert, dokumentiert [243, 244]. Deshalb wurde der IgG1-Titer ebenfalls ermittelt. Auch hier ließen sich nur geringe Unterschiede im IgG1 Antikörperlevel zwischen den drei murinen Asthmodellen feststellen, wie im Punktdiagramm zu sehen ist. Die IgG2a Produktion, welche mit einem Th1-Profil assoziiert wird, wies das gleiche Muster auf. Aufgrund der OVA/Alum Sensibilisierung

wurde ein erhöhter Spiegel aller drei Antikörper in den Proben der Kontrolltiere nachgewiesen.

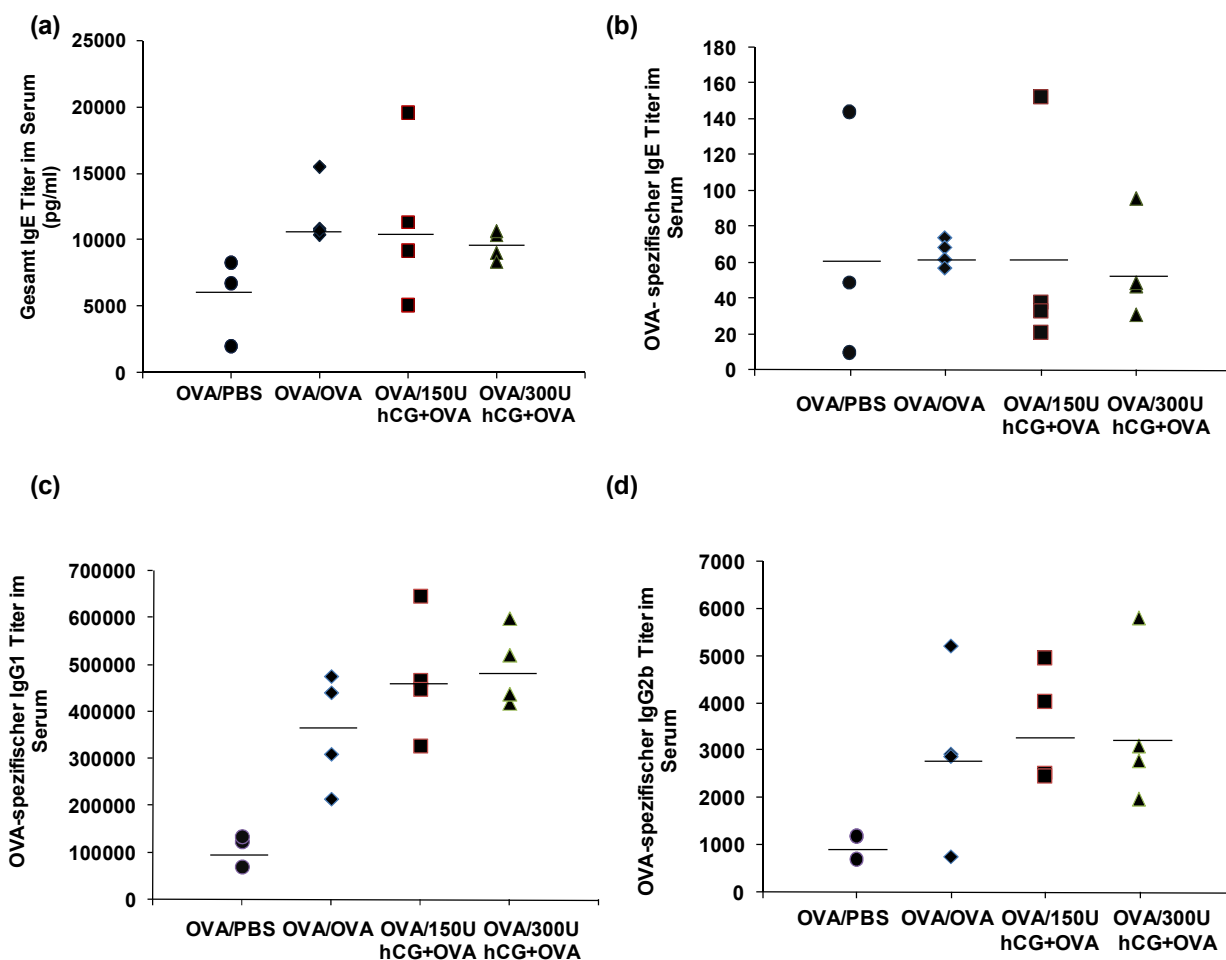


Abbildung 14: Bestimmung des Antikörpertiters im Blutserum nach hCG-Behandlung

Mittels ELISA wurde der Gesamt-IgE- (a), der OVA-spezifische IgE- (b), IgG1- (c) und IgG2a-Titer (d) im Serum ermittelt. Das Serum wurde 48 Stunden nach der letzten OVA-, bzw. PBS-Aerosol-Behandlung abgenommen. Der Gesamt IgE-Titer im Serum wurde in ng/ml und die OVA spezifischen IgE-(b), IgG1- (c) und IgG2a-Konzentrationen wurden in Relation zum bekannten Standard in einer willkürlichen Einheit (Units) pro Milliliter dargestellt. Mittelwerte \pm SD (n=3-4).

3.1.3 Einfluss von hCG auf die Entzündung in der Lunge

Bei einer allergischen Reaktion findet ein starker Influx inflammatorischer Zellen in die Lunge statt, dessen Ausmaß mit der Schwere der Erkrankung in Korrelation steht. Die Entzündung lässt sich durch eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung auf 3 µm dicken Paraffinpräparaten nachweisen. Die histologische Untersuchung zeigte geringe Unterschiede in der Migration von Entzündungszellen im Lungengewebe zwischen den drei Krankheitsmodellen. Die Mäuse, behandelt mit den zwei unterschiedlichen Konzentrationen (150U und 300U) hCG, zeigten kaum Unterschiede im Entzündungsgrad verglichen mit den OVA/OVA Mäusen. In den Lungenschnitten der OVA/PBS Gruppe wurde wie erwartet keine Inflammation nachgewiesen. Die Entzündung ist sowohl um die Bronchien als auch um und in den Blutgefäßen zu beobachten. Zur Identifizierung der eingewanderten Zelltypen (Lymphozyten, Granulozyten, Makrophagen) wurden weitere Methoden angewendet.

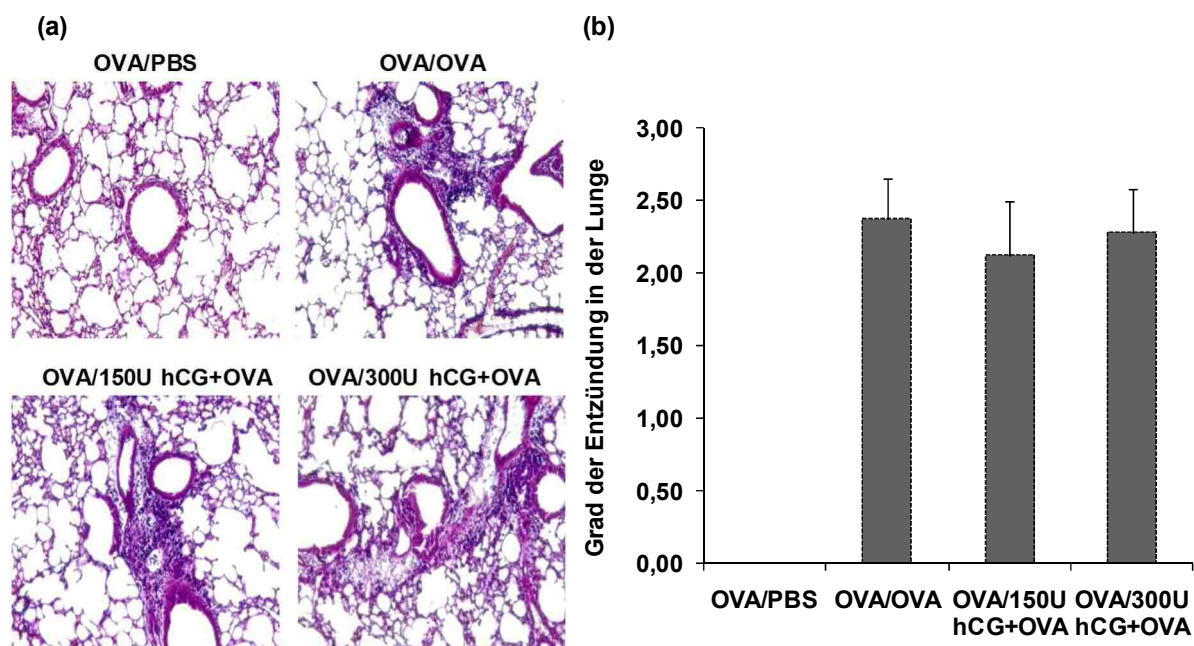


Abbildung 15: Histologische Untersuchung der Lunge nach hCG-Behandlung

Hierfür wurden Lungenschnitte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (a) und semiquantitativ in einer Skala von 1-4 ausgewertet (b). Grad 0: keine Entzündungszeichen; Grad 1: niedrige Infiltration von Entzündungszellen; Grad 2: mittlere Infiltration von Entzündungszellen; Grad 3: hohe Infiltration von Entzündungszellen; Grad 4: sehr starke Infiltration von Entzündungszellen. Die dargestellten histologischen Lungenpräparate wurden bei einer 10-fachen Vergrößerung aufgenommen. Mittelwerte \pm SD (n=3-4).

Die Akkumulation eosinophiler Granulozyten, die durch die Abgabe von mannigfaltigen Entzündungsvermittlern, wie Lipidmediatoren, Zytokinen und zytotoxischen Proteinen, das Lungengewebe beschädigen, gehört zu den charakteristischen Befunden bei Asthma Bronchiale. Zur Analyse wurden die Zellen aus der Bronchoalveolarflüssigkeit isoliert und auf bestimmte Oberflächenstrukturen untersucht. Eosinophile sind durch die konstitutiv hohe Expression des CC Chemokinrezeptor 3 (CCR3) charakterisiert. Zwischen 16000 und 60000 CCR3 Rezeptoren sind auf einer Zelle zu finden, welche die Migration fördern. Um diese von den restlichen Lymphozyten und Granulozyten in der BAL unterscheiden zu können, wurden alle Zellen auf die Expression folgender Oberflächenmarker: CD3 (T-Zellmarker), B220 (B-Zellmarker), GR-1 (Neutrophilenmarker) und CCR3 (Eosinophilenmarker), mittels Immunfluoreszenz und anschließender Analyse bestimmt.

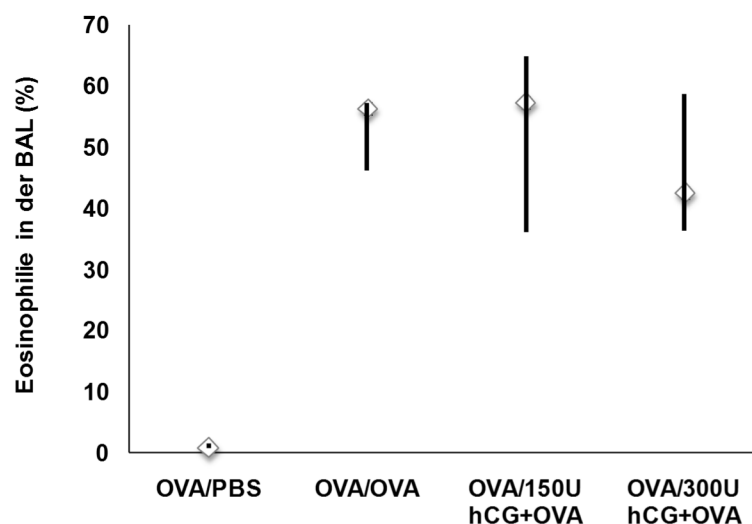


Abbildung 16: Quantifizierung der Eosinophilie in der Lunge

Die Infiltration eosinophiler Granulozyten wurde per Durchflusszytometrie analysiert. Dazu wurden Zellen aus der Bronchoalveolarlavage aller Tiere nach der invasiven Messung am Tag 18 isoliert und mit folgenden Oberflächenantikörpern markiert: CD3, B220, Gr-1 und CCR3. Mittelwerte \pm SD (n=3-4). BAL= bronchoalveoläre Lavage /Bronchoalveolarlavage

Die Eosinophilpopulation wurde als CD3-B220-GR-1⁺CCR3⁺ definiert, wobei der Glukokortikoidrezeptor (GR-1) eine intermediäre Expression aufweist. Die FACS-Auswertung ergab keine deutlichen Differenzen in der Zahl infiltrierter eosinophiler

Granulozyten zwischen der OVA/OVA (53,23%) und der mit 150U hCG (50,48%) behandelten Gruppe. Im Gegensatz dazu wurden circa 9% weniger CCR3⁺ Zellen (44%) in der BAL der Gruppe mit 300U hCG behandelt, nachgewiesen. Aufgrund der fehlenden Allergenprovokation wurden keine CCR3^{high} GR-1^{int} Zellen in den Kontrollmäusen nachgewiesen.

3.1.4 Bestimmung der Th2-Zytokinproduktion in der Lunge

Eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale spielen die Th2-Zellen, die durch die Freisetzung verschiedener Zytokine und durch die Aktivierung inflammatorischer Zellen, eine Entzündungsreaktion nicht nur auslösen, sondern auch weiterregulieren. Der Th2-Phänotyp wird durch die Interleukine IL-4, IL-5 und IL-13 beschrieben, die zur Aufklärung des Immunstatus in dem Asthma-hCG-Modell untersucht wurden. Wenige humane und murine Studien berichteten über den Effekt von humanem Choriongonadotropin auf Zellen des Immunsystems. Hier stellte sich die Frage, inwiefern das Peptidhormon hCG die Zytokinsekretion, die für die Th2-Immunantwort charakteristisch ist, beeinflussen kann. Dies wurde in den folgenden Assays überprüft. Um lokale Immunveränderungen zu erfassen, wurde die bronchoalveoläre Lavage, eine gängige Methode zum Nachweis von Proteinen in der Lunge, verwendet. Zu diesem Zweck wurde die Lunge unmittelbar nach der invasiven Messung mit physiologischer Kochsalzlösung lavagiert. Anschließend erfolgte eine Separierung der zellulären Komponenten von der Flüssigkeit, die weiter zur Untersuchung der Th2-Zytokine verwendet wurde. Die Analyse aller Interleukine erfolgte mittels ELISA.

Die Ergebnisse zeigten einen annähernd gleichen Level von IL-4 und IL-5 bei den Allergen exponierten Tieren und den zusätzlich mit hCG behandelten Mäusen. Im Vergleich dazu lies sich eine reduzierte Konzentration des IL-13 Zytokins, das eine wesentliche Rolle in der Entstehung der bronchialen Hyperreagibilität spielt, in dem hCG-Asthmamodell nachweisen. Da die Kontrollmäuse mit OVA/Alum sensibilisiert wurden, ist eine gewisse Produktion aller Zytokine im BAL* zu detektieren.

*BAL= bronchoalveoläre Lavage (siehe 2.2.6)

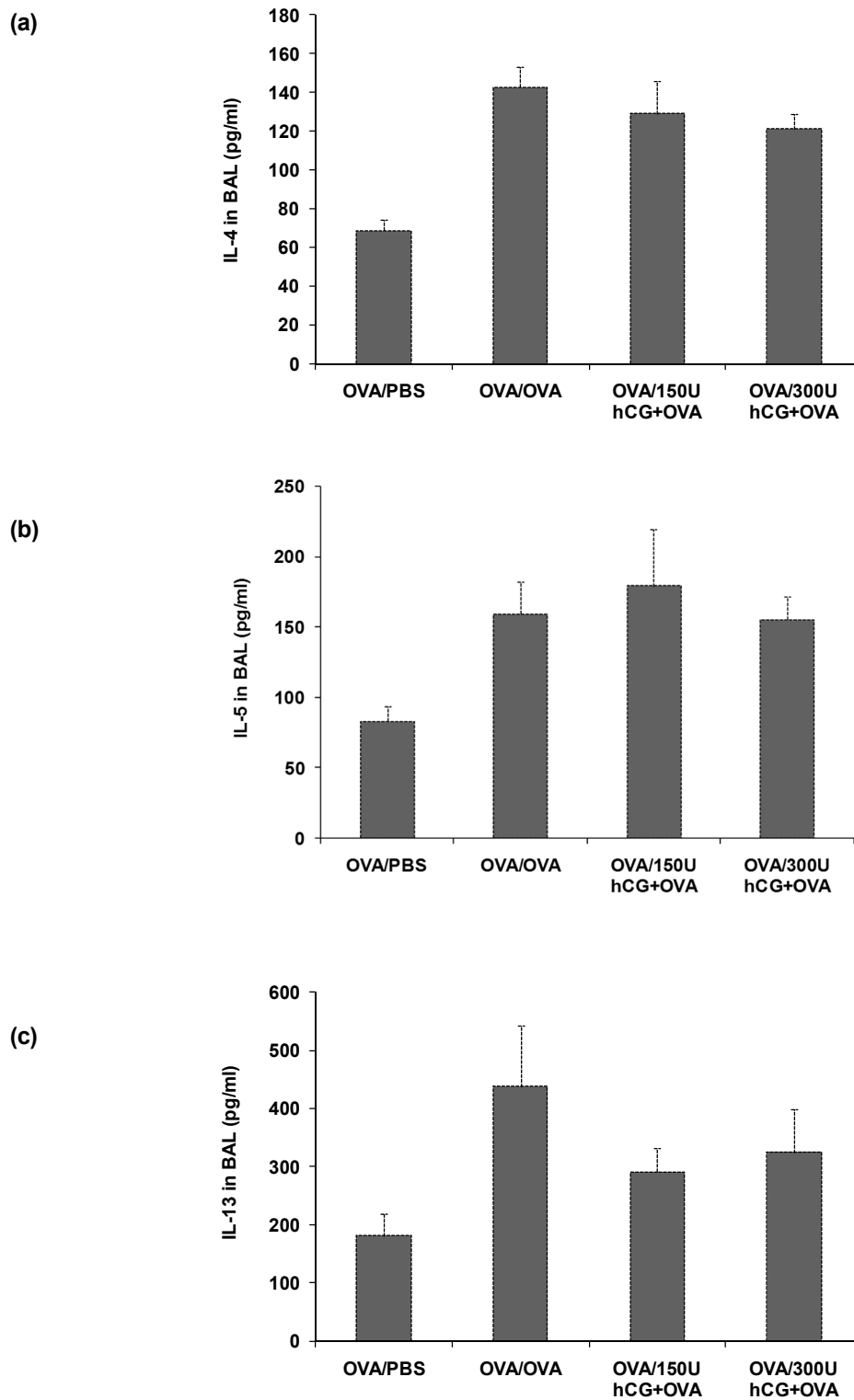


Abbildung 17: Analyse des Th2-Profiles in der Bronchoalveolarflüssigkeit

Aus der BAL*, gewonnen unmittelbar nach der invasiven Messung, wurde mittels ELISA die Konzentration der Zytokine IL-4 (a), IL-5 (b) und IL-13 (c) bestimmt. Mittelwerte \pm SD (n=4).

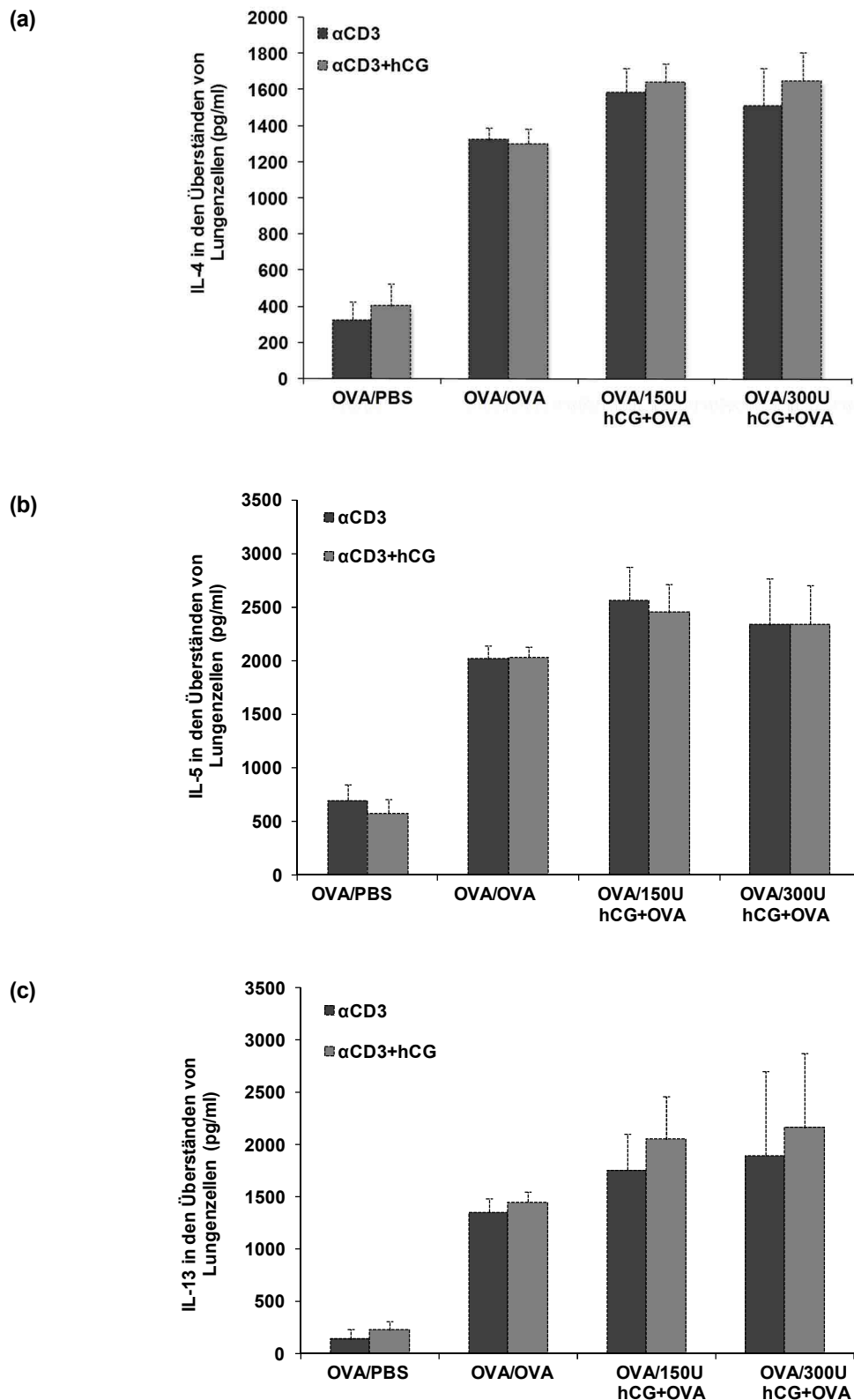


Abbildung 18: Bestimmung des Th2-Zytokinprofils primärer Lungenzellen

Gesamtzellen aus der Lunge aller vier Tiergruppen wurden isoliert und allein mit 10 $\mu\text{g/ml}$ αCD3 oder mit 10 $\mu\text{g/ml}$ αCD3 und 150U hCG RPMI-Medium für 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurde die Sekretion der Th2-Zytokine IL-4 (a), IL-5 (b) und IL-13 (c) in den Überständen der Lungenzellen durch ELISA untersucht. Mittelwerte \pm SD (n=3-4).

Wie schon erwähnt vermitteln Th2-Lymphozyten ihren Effekt durch die von ihnen sezernierten Interleukine, die auch im isolierten Lungengewebe bestimmt werden können. Hierzu wurden Gesamtzellen aus der Lunge isoliert und in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml Medium bei 37°C im Brutschrank mit αCD3 , bzw. αCD3 und hCG kultiviert. 24 Stunden später wurden die Überstände abgenommen und per ELISA auf die Zytokinproduktion untersucht. Die Produktion der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 war in den Überständen der OVA/hCG Mäuse gegenüber der OVA/OVA Tiere, leicht erhöht. Es ist ein ähnliches Muster zu beobachten. Dabei fällt aber der Unterschied des Th2-Profiles in den unterschiedlichen Proben, in der isolierten Lungenflüssigkeit und in den Überständen der stimulierten Lymphozyten, auf. Dass Hormone die Differenzierung sowie die Polarisierung von T-Zellen beeinflussen können, wurde bereits beschrieben. Allerdings zeigten diese *in vitro* Daten, dass eine zusätzliche Stimulation der T-Zellen mit dem Peptidhormon hCG auf die Freisetzung dieser drei Interleukine weder eine positive noch eine negative Wirkung hat.

3.1.5 Bestimmung der Effektorzellen

Des Weiteren war es von Interesse die infiltrierten CD4-Effektorzellen in der Lunge zu untersuchen. Hierfür wurden Gesamtzellen aus der Lunge isoliert und für 30 Minuten bei 4°C unter Lichtausschluss mit den folgenden Antikörpern markiert. Es handelte sich um die Oberflächenmoleküle CD69 und CD44, die als Früh- und Spät-Aktivierungsmarker auf T- und B-Lymphozyten, NK-Zellen, Makrophagen und Granulozyten identifiziert wurden.

Mit einem Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson (BD) wurde die Expression der genannten Proteine gemessen und ausgewertet. Wie aus dem Diagramm zu entnehmen ist, wurden keine Differenzen in der CD4-Gesamtzellzahl in der Lunge aller asthmatischen Tiere ermittelt. Ähnliche Ergebnisse wurden in den $\text{CD4}^+\text{CD69}^+\text{CD44}^+$ T-Zellen in der Lunge der drei asthmatischen murinen Modelle analysiert. Einzige Ausnahme stellt die Kontrollgruppe dar, die eine reduzierte CD4-T-Zahl und Effektorzellen aufwies, beruhend auf der fehlenden Allergenprovokation

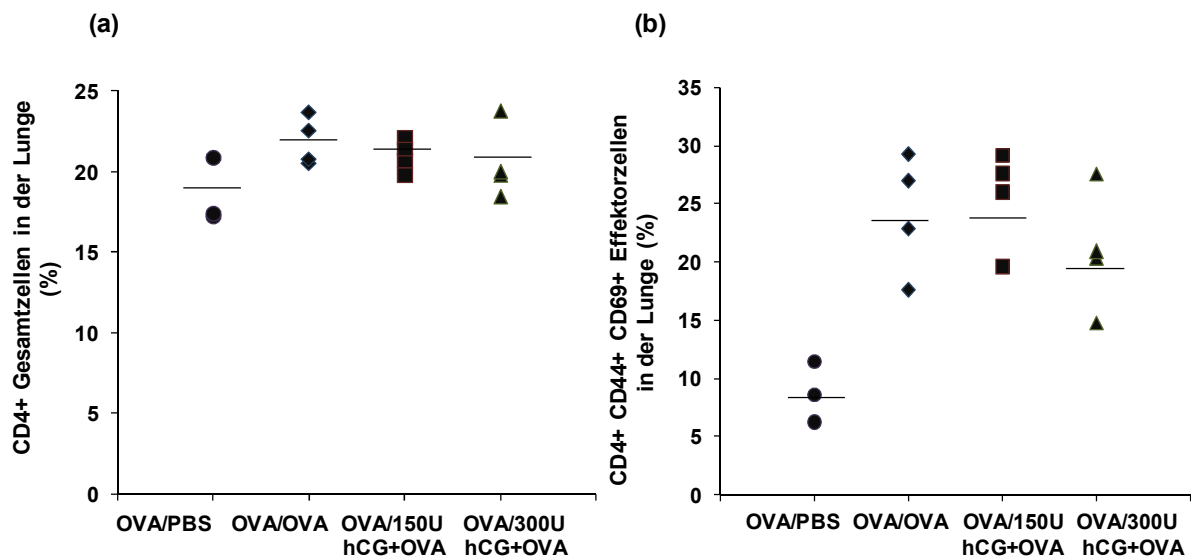


Abbildung 19: Quantifizierung von aktivierten CD4-T-Zellen in der Lunge

Um den Anteil an CD4+ T-Zellen und deren Aktivierungsprofil zu bestimmen, wurden Gesamtzellen aus der Lunge isoliert und mit den Antikörpern anti-CD4, anti-CD44 und anti-CD69 markiert und mittels FACS analysiert. In Abb. (a) ist die Gesamtzellzahl der CD4+ T-Zellen und in (b) die Effektorzellzahl dargestellt. Mittelwerte \pm SD (n=3-4).

3.1.6 Einfluss von hCG auf die Makrophageninfiltration in der Lunge

Als professionelle Phagozyten und antigenpräsentierende Zellen spielen Makrophagen sowohl in dem angeborenen als auch dem erworbenen Immunsystem eine entscheidende Rolle. Verschiedene Publikationen zeigten, dass das Milieu in der allergischen Lunge die Makrophagenantwort beeinflusst, sodass ihre Funktion in Asthma bronchiale kontrovers betrachtet wird [129]. Es wurde jedoch ein Zusammenhang zwischen dem Makrophagenphänotyp und der Hyperreaktivität gefunden [130, 245].

Rückblickend auf die ermittelten Ergebnisse wurde keine eindeutige Erklärung für die reduzierte Hyperreagibilität der Atemwege in den Mäusen, behandelt mit 150U und 300U humanen Choriongonadotropin, gefunden. Ausnahme machte der erniedrigte Level von IL-13, bestimmt in der Bronchoalveolarlavage dieser Tiere. So stellte sich die Frage, um die Wichtigkeit dieser Immunzellen in den murinen hCG-Modellen. Zur Identifizierung der Makrophagen wurde das F4/80 Antigen ausgewählt. Es handelt

sich um einen 160 kDa großen Glykoproteinrezeptor, der auf nahezu allen Makrophagentypen konstitutiv exprimiert wird. Der Nachweis erfolgte durch immunhistochemische Färbung in 3 µm dicken Kryoschnitten, die anschließend mit einem konfokalen Laser-Scannig-Mikroskop aufgenommen wurde.

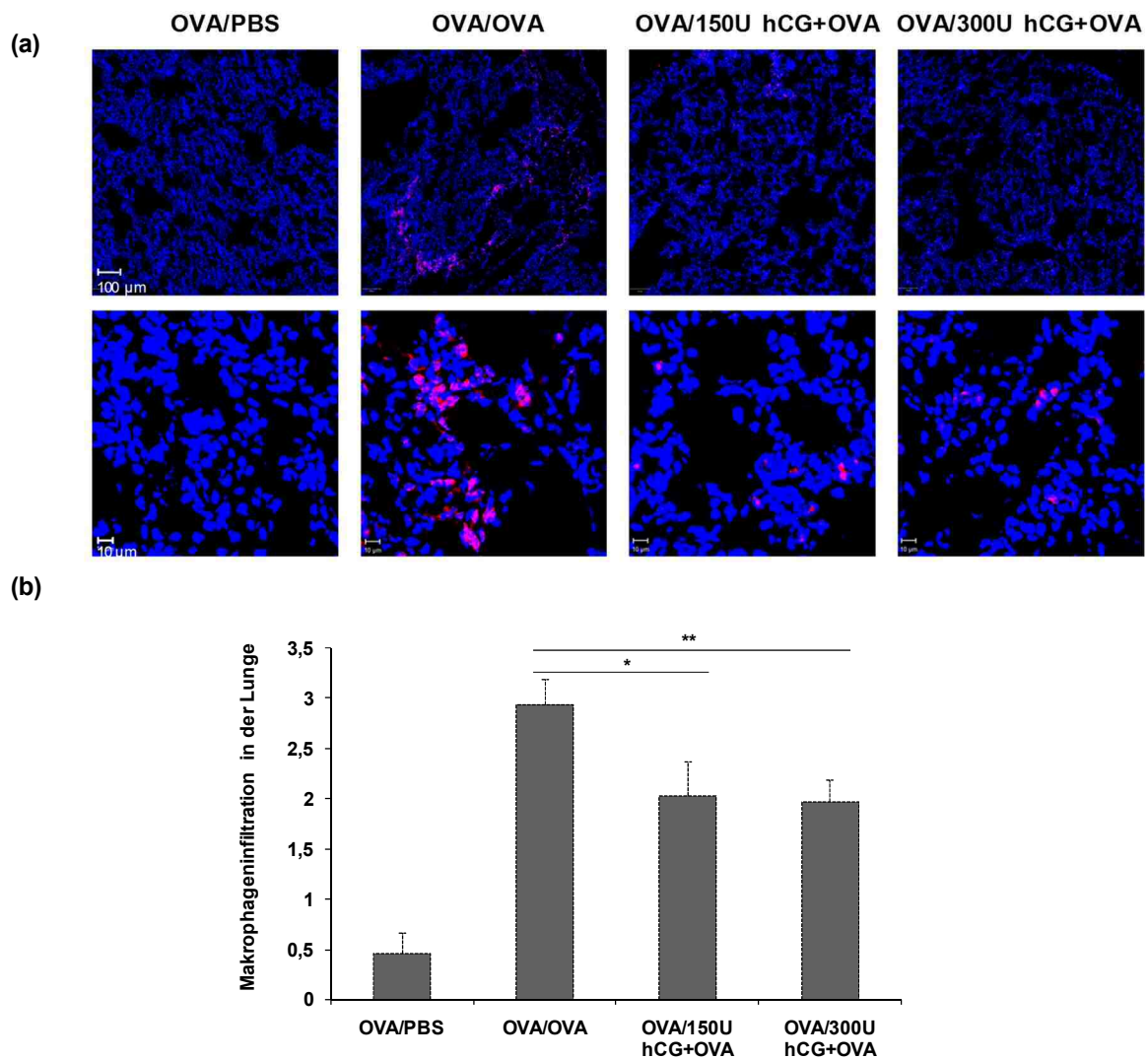


Abbildung 20: Immunhistologischer Nachweis von F4/80⁺ Zellen in murinen Lungenpräparaten

Hierfür wurden Kryoschnitte aus der Lunge angefertigt. Die Detektion von F4/80⁺-Zellen (rot) erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbung. In (a) sind die konfokalen Aufnahmen zu sehen und in (b) ist die semiquantitative Bestimmung dargestellt. Grad 0: keine Infiltration von F4/80⁺ Zellen; Grad 1: niedrige Infiltration von F4/80⁺ Zellen; Grad 2: mittlere Infiltration F4/80⁺ Zellen; Grad 3: hohe Infiltration von F4/80⁺ Zellen; Grad 4: sehr starke Infiltration von F4/80⁺ Zellen. Mittelwerte ± SD (n=4-8).

Die mikroskopischen Aufnahmen zeigten eindeutige Unterschiede bezüglich der Infiltratzahl an F4/80⁺ Zellen zwischen den drei asthmatischen Tiergruppen, die in den Präparaten durch die rosarote Färbung zu erkennen sind. Es erwies sich eine viel stärkere Makrophagenansammlung in der Lunge der OVA/OVA Mäuse verglichen mit den hCG behandelten Mäusen. Die Tiere, die 300U hCG erhielten, zeigten eine signifikant erniedrigte Expression des F4/80 Rezeptors gegenüber den OVA/OVA Tieren.

3.2 Zelluläre Effekte von hCG

Über einen Effekt des Schwangerschaftshormons auf Monozyten und Makrophagen wurde schon berichtet [180, 182]. Das Ziel der folgenden *in vitro* Studie bestand darin festzustellen, welche morphologischen und phänotypischen Veränderungen hCG in murinen Makrophagen hervorrufen kann.

3.2.1 Einfluss von hCG auf die Differenzierung von Makrophagen aus hämatopoetischen Stammzellen

Hierfür wurden hämatopoetische Zellen aus Balb/c Mäusen isoliert und anschließend laut Protokoll mit M-CSF stimuliert. In einem Zeitraum von 7 Tagen differenzierten aus Knochenmark isolierten Stammzellen unter den vorgegebenen Bedingungen zu reifen Makrophagen. Dabei stieg nicht nur die Prozentzahl positiver Zellen in der *in vitro* Kultur, sondern auch die Antigenexpression, was durch das verstärkte Binden mehrerer Antikörper pro Zelle zu beobachten ist.

Zu ihrer Charakterisierung wurden die Oberflächenreifungsmarker CD11b und F4/80 ausgewählt. CD11b, eine der Ketten des Mac-1 Integrins, ist einer der ersten Makrophagenmarker, bestimmt durch monoklonale Antikörper, dessen Expression signifikant bei der Reifung steigt. CD11b und das im oberen Abschnitt beschriebene Antigen F4/80 wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen [246].

Die aufgenommenen Bilder demonstrieren die erfolgreiche Entwicklung von aus Zellen des Knochenmarks stammenden Makrophagen. Wie in Abbildung 21 zu sehen ist, wurde eine starke Expression beider Oberflächenproteine, nachgewiesen. Mittels Höchst-Färbung wurden die Zellkerne in Blau sichtbar gemacht. Parallel dazu wurde mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse die Reinheit der Zellpopulation bestätigt.

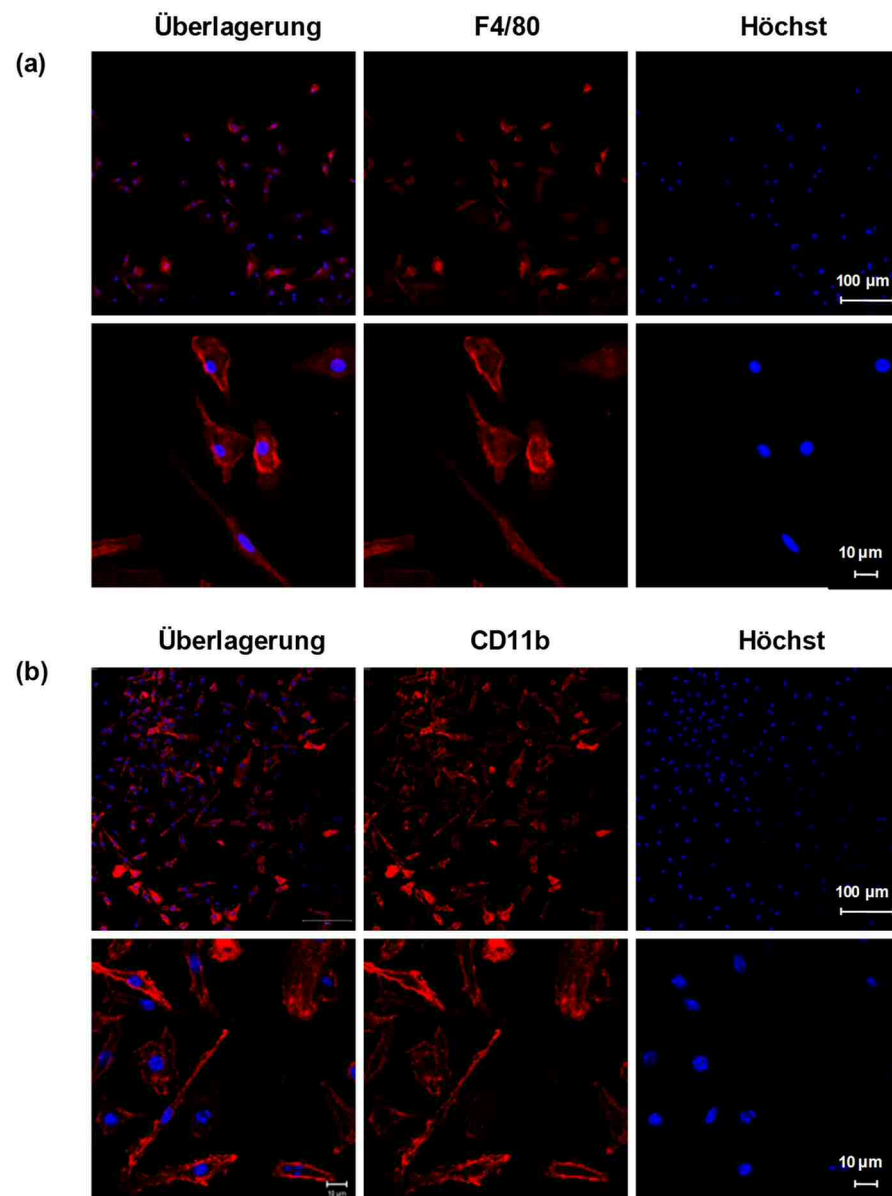


Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbung für CD11b und F4/80 in *in vitro* differenzierten Makrophagen

Die Isolation von Knochenmarkzellen aus Balb/c Mäusen, welche anschließend mit 20 ng/ml rekombinantem mM-CSF für 7 Tage (siehe 2.2.12 Behandlungsprotokoll) stimuliert wurden, diente zur *in vitro* Generierung von Makrophagen. Nach einer Woche wurde die Zellkultur auf die Makrophagenmarker F4/80 und CD11b untersucht, die mit dem Reifungsstadium dieser Phagozyten in Korrelation stehen. In (a) ist die Expression von F4/80 (rot) und in (b) von CD11b (rot) Rezeptor dargestellt. In Blau sind die Zellkerne zu erkennen (Höchst-Färbung).

3.2.2 Makrophagen Phänotypisierung

Wie in dem oberen Abschnitt erwähnt, erkennen Makrophagen nicht nur tote und alte Körperzellen, die sie phagozytieren, sondern auch verschiedene Antigene. Makrophagen werden als antigenpräsentierende Zellen bezeichnet, wenn sie das aufgenommene Antigen nicht zerstören, sondern an MHC-II-Molekülen binden und es Zellen des Immunsystems präsentieren. Zugleich werden auch costimulierende Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 gebildet.

Aufgrund dessen wurden in dem folgenden *in vitro* Versuch die aufgelisteten Oberflächenmarker untersucht. Zu Beginn wurden 1×10^6 Makrophagen ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren und anderen Stimulantien bei 37°C für 24 Stunden inkubiert. Erst dann erfolgte die Stimulation mit dem Peptidhormon für weitere 24 und 48 Stunden. In Anlehnung an das *in vivo* Modell wurden die Zellen ebenfalls mit Ovalbumin (OVA) und der Kombination von OVA und hCG behandelt. Zusätzlich wurde als Positivkontrolle unter gleichen Bedingungen eine LPS- und LPS+hCG-Kondition mitgeführt. Um eventuelle Zellveränderungen unter den verschiedenen Stimuli und Zeitpunkten vergleichen zu können, wurden unstimulierte Makrophagen mit inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern, die spezifisch gegen CD11b, CD40, CD80 und CD86 gerichtet sind, untersucht. Die Analyse fand mit Hilfe des FACS-Caliburs statt. Wie in den Abbildungen 22-23 zu sehen ist, wurden die Ergebnisse in Form mehrerer Histogramme dargestellt. Auf der x-Achse ist die Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der Zellen auf der y-Achse aufgetragen. Dabei wird der Medianwert betrachtet. Die Daten zeigen zum Einen Unterschiede in der Rezeptorexpression zwischen den verschiedenen Behandlungen, mit wenigen Ausnahmen und zum Anderen zwischen den ausgewählten Zeitpunkten. Die Expression des Reifungsmarkers CD11b wurde verstärkt unter den hCG, LPS und hCG+LPS Behandlungen gegenüber den NaCl_2 - und OVA-Konditionen nachgewiesen. Außerdem wurde ein viel stärkeres Signal 48 Stunden später ermittelt, dies deutet auf eine Zunahme der Epitopendichte infolge der Stimulation hin. Dass Makrophagen Allergene und Lipopolisaccharidstrukturen identifizieren und präsentieren ist bekannt. Allerdings zeigten sich ähnliche Medianwerte unter allen stimulierten Kulturen. Es ist sogar eine konstante Expression über 24 und 48 Stunden zu beobachten. Parallel dazu wurde der CD40 Rezeptor untersucht, der von allen APC (Makrophagen, B-Lymphozyten,

Dendritische Zellen) je nach Stimulus exprimiert wird und an den CD40 Ligand auf T-Zellen bindet. Eine erhöhte Intensität der PE-Fluoreszenz (CD40 PE) ließ sich in der hCG behandelten Zellkultur dokumentieren. Wenn man den 24 Stunden Medianwert (162,53) und den 48 Stunden Medianwert (537,61) vergleicht, ist eine ca. 3,5 fache Steigerung der CD40 Expression festzustellen. Ein ähnliches Ergebnis wurde in der OVA+hCG Zellkultur beobachtet. Allein die OVA-Stimulation bewirkte keine Expression dieses Rezeptors.

Was ferner in den Histogrammen der LPS-behandelten murinen Makrophagen noch zu erkennen ist, ist das deutlich verstärkte Fluoreszenzsignal im PE-Kanal 24 Stunden später (523,30) gegenüber dem von hCG. Allerdings führte die Kombination von beiden Stimuli zu einer geringeren Expression von CD40. Die Rezeptoren CD80 und CD86 wirken als Costimulatoren, wenn sie mit CD28 oder als Koinhibitoren mit CTLA-4 (CD152) auf T-Zellen interagieren. 24 Stunden nach der hCG und hCG+OVA Behandlung zeigte sich eine geringe Expression von CD86, die 48 Stunden danach nicht mehr detektierbar war. Diese Daten stehen in Kontrast zu den anderen Stimulationen. Die LPS und LPS+hCG Kondition lösten keine Expression dieses Oberflächenmoleküls aus. Dagegen zeigte sich ein fast gleichbleibendes Signal in der OVA-Makrophagenkultur. Eine intermediäre Bildung von CD80 (813,12) wurde in der 24 Stunden hCG-Zellkultur im Gegensatz zu seiner geringeren Produktion (299,61) in der OVA-Kultur und der merklich erhöhten CD80 Expression (5777,22) in der LPS-Kultur gefunden. Auffallend ist die fast verdoppelte Expression von CD80 (1485,51) auf den Makrophagen stimuliert mit dem Peptidhormon zwei Tage später sowie die reduzierte Expression dieses Moleküls (2641,65) durch die LPS-Stimulation zum selben Zeitpunkt. Wie erwartet, wurden keine der kostimulatorischen Moleküle, sowie MHC-II auf unstimulierten Makrophagen detektiert.

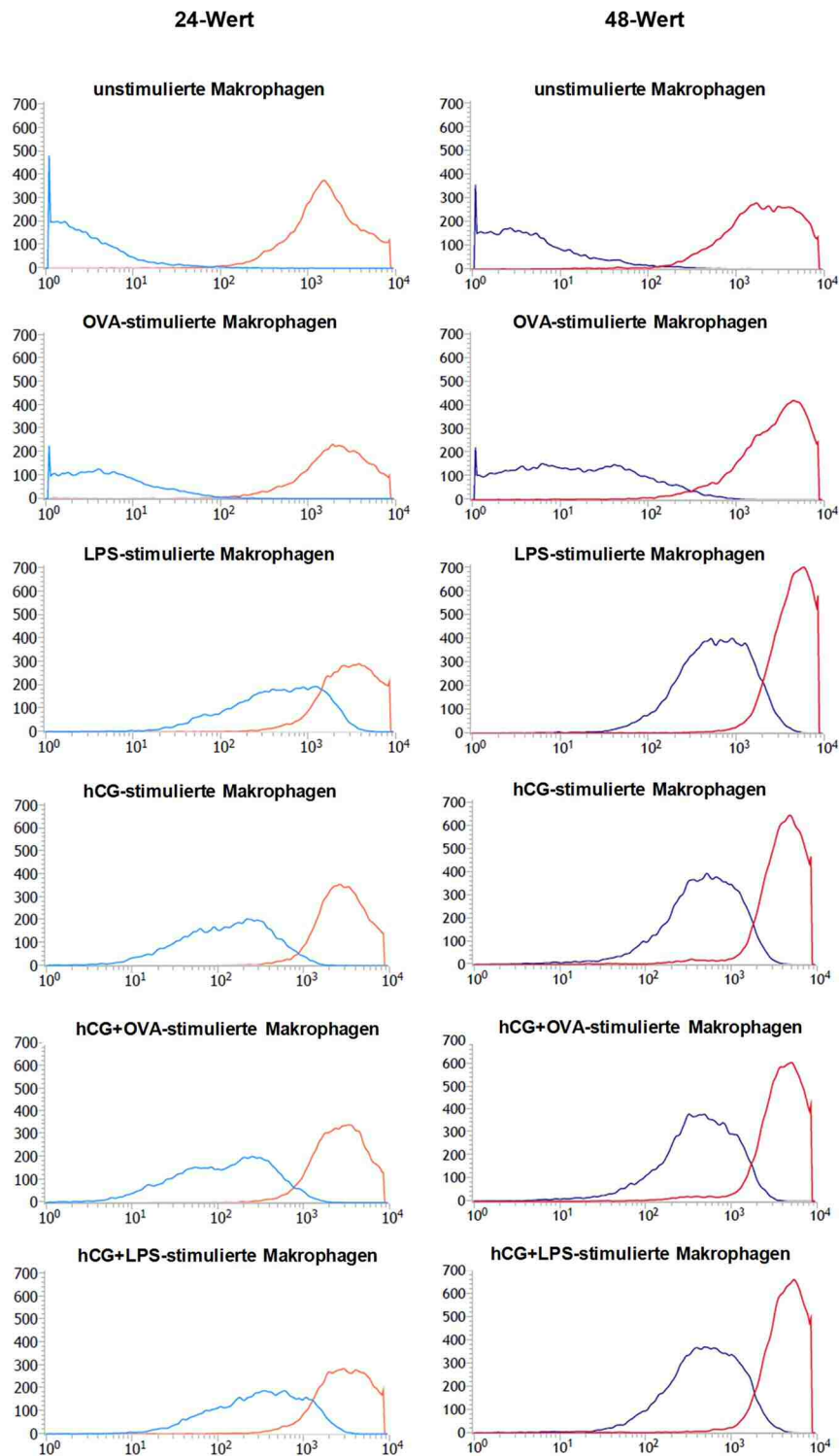


Abbildung 22: Expression von CD40 nach hCG Stimulation

Hierzu wurden *in vitro* generierte Makrophagen für 24 und 48 Stunden entweder allein mit 62,5 $\mu\text{g/ml}$ OVA (b), allein mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS (c), allein mit 150U hCG (d) oder mit 62,5 $\mu\text{g/ml}$ OVA und 150U hCG (e) oder 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS und 150U hCG (f) behandelt (siehe: 2.2.13 Behandlungsprotokoll). Als Kontrolle dienten unstimulierte Makrophagen (a). Anschließend wurde die Expression von CD11b (in Rot) und CD40 (in Blau) mit Hilfe des Durchflusszytometers bestimmt.

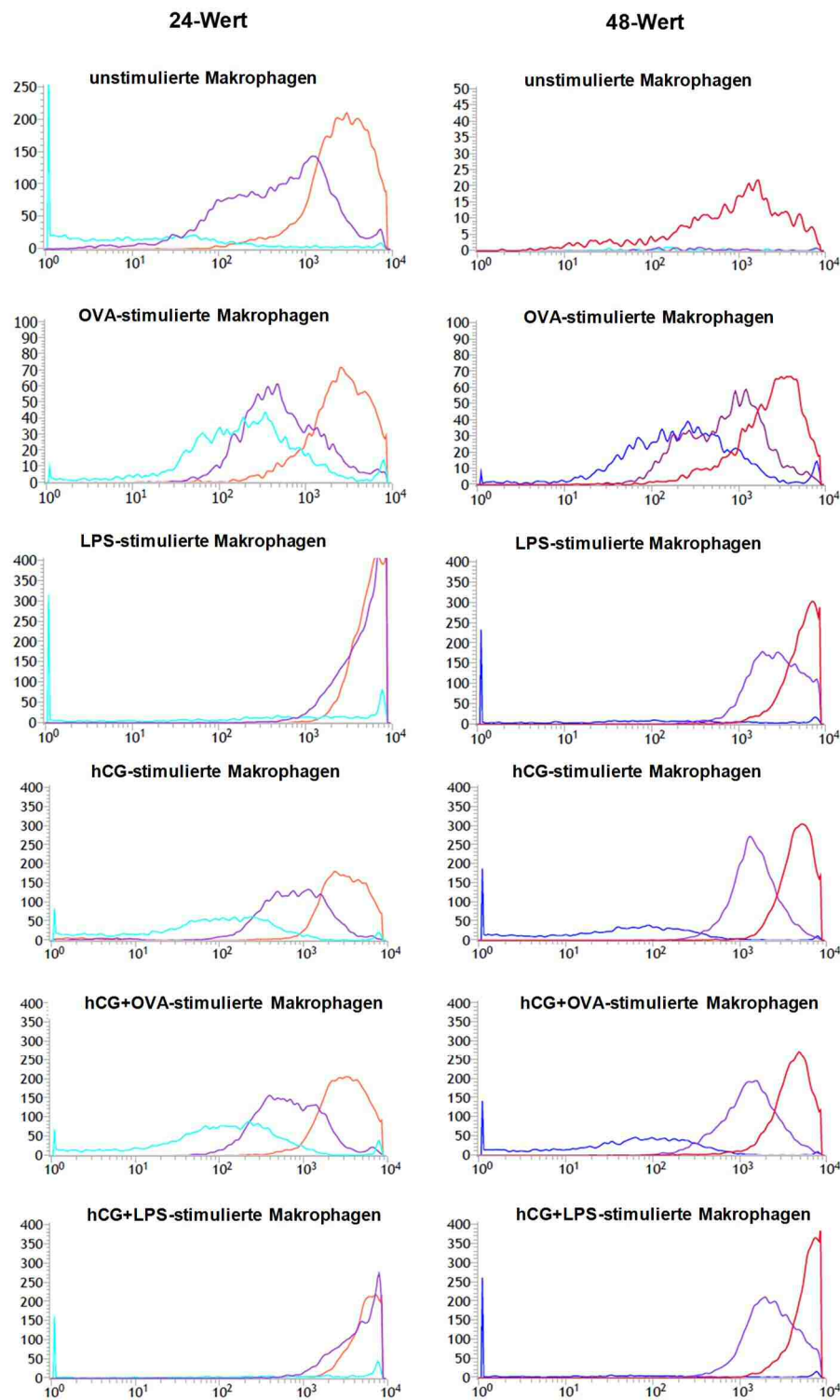


Abbildung 23: Expression von CD80 und CD86 nach hCG Stimulation.

Hierzu wurden *in vitro* generierte Makrophagen für 24 und 48 Stunden entweder allein mit 62,5 µg/ml OVA (b), allein mit 1 µg/ml LPS (c), allein mit 150U hCG (d) oder mit 62,5 µg/ml OVA und 150U hCG (e) oder 1 µg/ml LPS und 150U hCG (f) behandelt (siehe: 2.2.13 Behandlungsprotokoll). Als Kontrolle dienten unstimulierte Makrophagen (a). Anschließend wurde die Expression von CD11b (in Rot), CD80 (in Lila) und CD86 (in Blau) mit Hilfe Durchflusszytometers bestimmt.

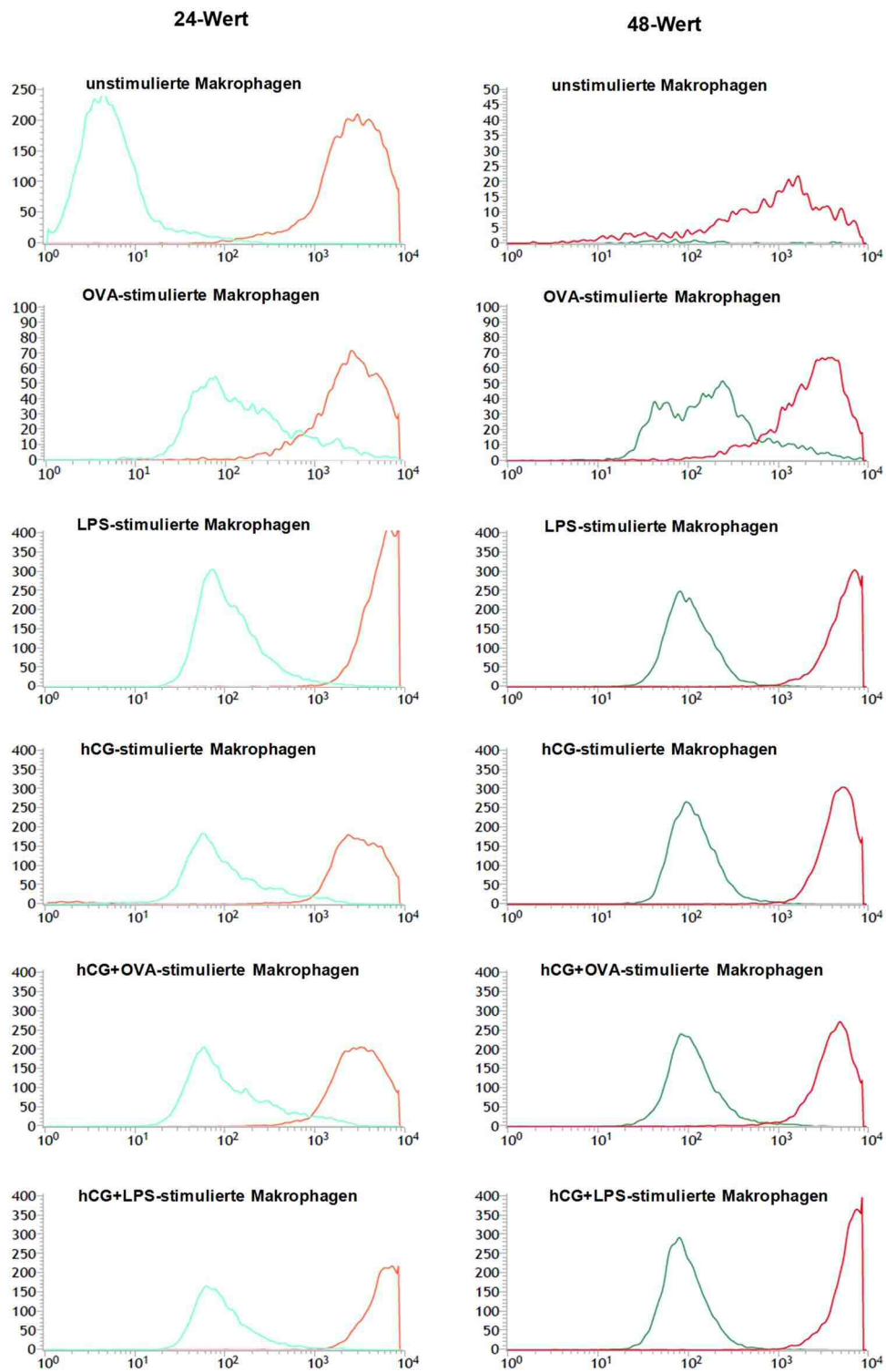


Abbildung 24: Expression von MHC-II nach hCG Stimulation

Hierzu wurden *in vitro* generierte Makrophagen für 24 und 48 Stunden entweder allein mit 62,5 µg/ml OVA (b), allein mit 1 µg/ml LPS (c), allein mit 150U hCG (d) oder mit 62,5 µg/ml OVA und 150U hCG (e) oder 1 µg/ml LPS und 150U hCG (f) behandelt (siehe: 2.2.13 Behandlungsprotokoll). Als Kontrolle dienten unstimulierte Makrophagen (a). Anschließend wurde die Expression von CD11b (in Rot) und MHC-II (in Grün) mit Hilfe des Durchflusszytometers bestimmt.

3.2.3 Morphologische Veränderungen infolge der hCG-Stimulation

Oberflächenstrukturmodifikationen hängen immer mit markanten morphologischen Zellveränderungen zusammen. Makrophagen, wie alle anderen eukaryotischen Zellen auch, verfügen über ein Zytoskelett, das nicht nur bei der Aufrechterhaltung und Umlagerung der Zellform, sondern auch bei der Polarisierung, Migration, Adhäsion, Phagozytose und Zellteilung eine wesentliche Rolle spielt. Es besteht aus drei verschiedenen Filamentsystemen: Mikrotubuli, Aktinfilamente (Mikrofilamente) und Intermediärfilamente. In Anbetracht der bis jetzt durchgeführten Experimente drängte sich die Untersuchung von Aktin und Tubulin in den Vordergrund.

Um eine Umstrukturierung des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts durch die verschiedenartigen Substanzen zu erfassen, wurde eine einfache Fluoreszenzfärbetechnik angewendet. Hierfür wurden murine Makrophagen für 8 bzw. 24 Stunden unter den gleichen Konditionen wie im oberen Teil beschrieben, behandelt. Zur Detektion von Aktin, das als monomeres G-Aktin (globuläres Aktin) und polymeres F-Aktin (filamentöses Aktin) in der Zelle vorliegt, wurde eine Einschrittfärbung mit Phalloidin, gekoppelt an einen Farbstoff Alexa-488, durchgeführt. Da Phalloidin nur mit Aktinfilamenten interkaliert, werden nur diese später in den Präparaten sichtbar. Die Tubulinfärbung erforderte einen Zweischrittprozess. Es erfolgte erst die Inkubation mit einem anti- β Tubulin Antikörper und in einem weiteren Schritt die Inkubation mit einem sekundären Antikörper, welcher mit dem Chromophor Alexa-568 markiert ist. Zur Erkennung der Zellkerne wurde eine Höchstfärbung mitgeführt.

Alle dargestellten Immunfluoreszenzbilder wurden mittels eines konfokalen Laser-Scannig-Mikroskops aufgenommen. Dabei ließen sich prägnante morphologische Differenzen infolge der unterschiedlichen Behandlungen feststellen. Werden Makrophagen mit dem Allergen Ovalbumin für 8 und 24 Stunden stimuliert, zeichnet sich ein charakteristisches Muster ab. Die Mehrzahl der Zellen nimmt eine dünne längliche Struktur an, gekennzeichnet durch die Bildung von Lamellipodien und Filopodien. Die Lamellipodien sind breite und flache Zellauswüchse, die zur Fortbewegung der Zelle dienen. Und die Filopodien sind sehr feine fadenförmige Membranausstülpungen, welche als Chemosensoren und Fangarme agieren. Beide Zellauswüchse sind sehr aktinreich (in Grün), wie die Aufnahmen zeigen. In Rot, innerhalb der Zelle, ist ausgeprägt das Filamentsystem aus Mikrotubuli dargestellt.

Es ist bekannt, dass Lipopolysaccharide (LPS) in verschiedenen Zellen, einschließlich Makrophagen eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts verursachen und dadurch viele Signalwege in der Zelle eingeleitet werden. Wie in den mikroskopischen Aufnahmen von den LPS induzierten Makrophagen zu erkennen ist, weisen diese Zellen eine amöbenähnliche Form auf. Zugleich ließ sich die räumliche Verteilung der Mikrotubuli, welche sich vom kernnahen Organisationszentrum bis in die Peripherie erstrecken, sehr gut veranschaulichen. Bei den ausgewählten Zeitpunkten wurden ebenfalls Unterschiede in der Aktinverteilung nachgewiesen. Um den Effekt von hCG besser zu untersuchen, wurden mehrere Zellkulturen angelegt, die für 1, 4, 8 und 24 Stunden mit dem Peptidhormon (150U) stimuliert wurden. Im Gegensatz zu der OVA und LPS Stimulation führte die Hormonbehandlung der Makrophagen zu einer anderen Aktin- und Tubulin Dynamik. Man konnte eine gewisse Überlappung von Aktin und Tubulin erkennen. Auf den Fluoreszenzbildern wurde um den Nukleus eine dichte aktinreiche Ansammlung detektiert. Die Stimulation mit 300U hCG scheint sogar einen Aktinring um den Zellkern 24 Stunden später zu induzieren. Außerdem konnte man mehrere stark leuchtende punktförmige Aktinstrukturen sehen. Die gleichen Strukturen wurden ebenfalls in der Zellkultur, die eine Zugabe von OVA und hCG erhielten, beobachtet. Die Zellen wiesen die typische Form nach OVA-Stimulation sowohl 8 als auch 24 Stunden später auf, allerdings mit dem Unterschied in der sehr starken Aktinanreicherung um den Zellkern. Erstaunlicherweise wurde der selbe Effekt in den Aufnahmen der Makrophagen, behandelt mit LPS und hCG analysiert, der allerdings nach 8 Stunden viel ausgeprägter gegenüber den 24 Stundenwert war. Es ist zu bemerken, dass LPS ein sehr starker Stimulus ist.

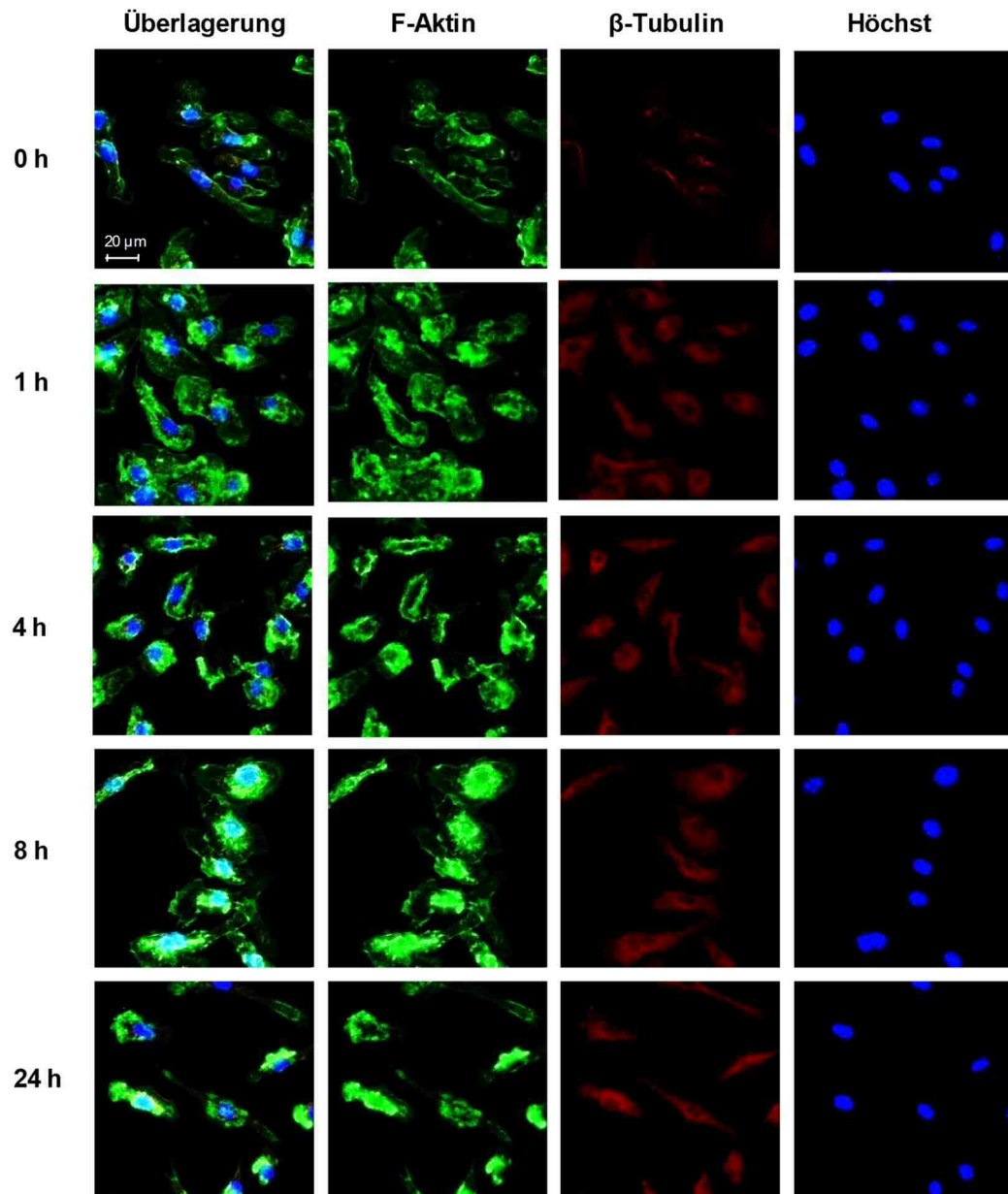
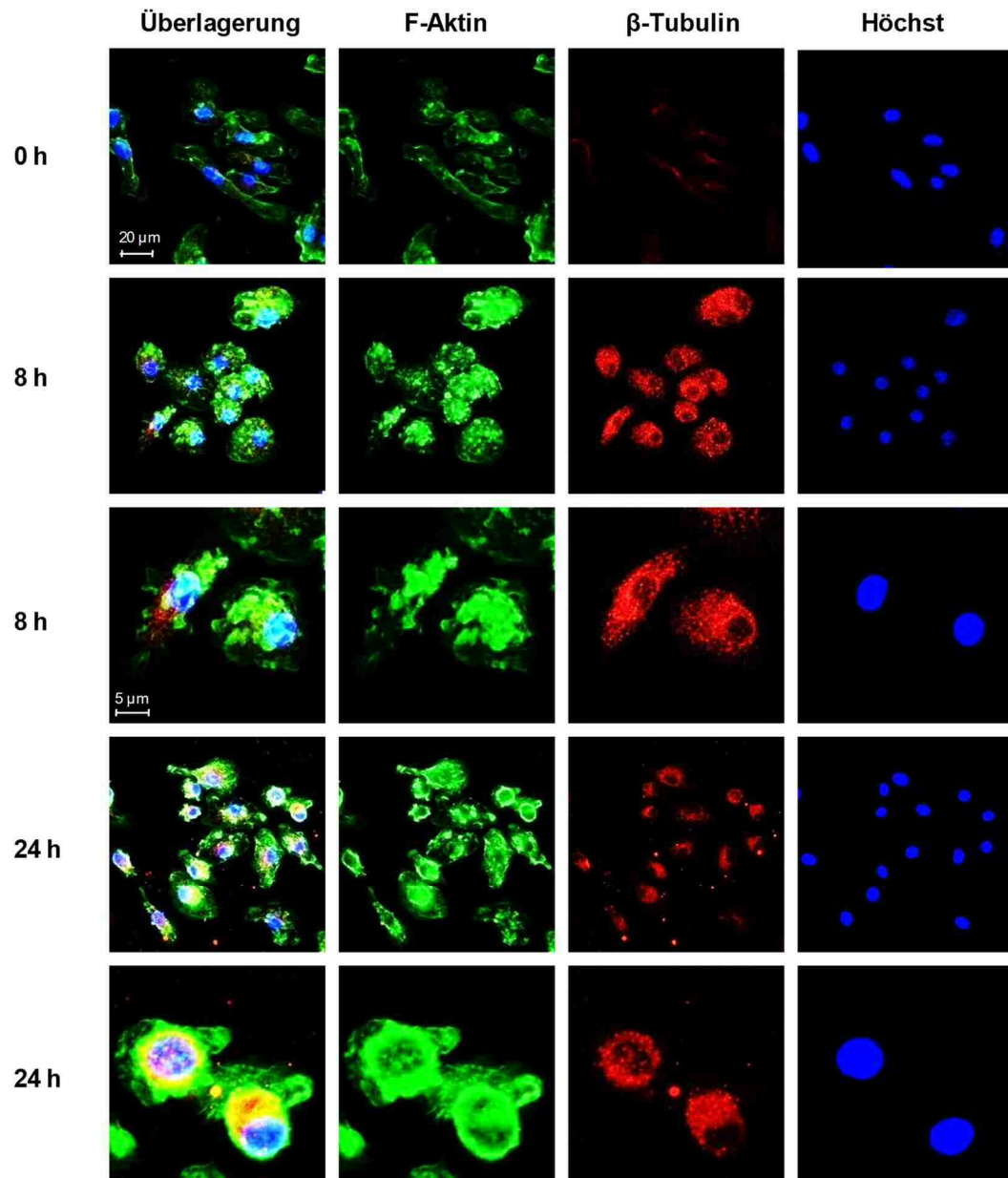


Abbildung 25: Morphologische Veränderungen in Makrophagen nach hCG (150U) Stimulation

Hierfür wurden *in vitro* generierte Makrophagen für 0, 1, 4, 8 und 24 Stunden mit 150U hCG behandelt (siehe: 2.2.13 Behandlungsprotokoll). Anschließend wurde das Aktin- und Tubulin-Zytoskelett der Makrophagen gefärbt. In Grün ist F-Aktin und in Rot ist β-Tubulin zu sehen. Zur Erkennung der Kerne wurde eine Höchst-Färbung (blau) mitgeführt. Die Immunfluoreszenzbilder wurden mittels eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops aufgenommen.

**Abbildung 26: Morphologische Veränderungen in Makrophagen nach hCG (300U) Stimulation**

Hierfür wurden *in vitro* generierte Makrophagen für 0, 8 und 24 Stunden mit 300U hCG behandelt (siehe: 2.2.13 Behandlungsprotokoll). Anschließend wurde das Aktin- und Tubulin-Zytoskelett der Makrophagen gefärbt. In Grün ist F-Aktin und in Rot ist β -Tubulin zu sehen. Zur Erkennung der Kerne wurde eine Höchst-Färbung (blau) mitgeführt. Die Immunfluoreszenzbilder wurden mittels eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops aufgenommen.

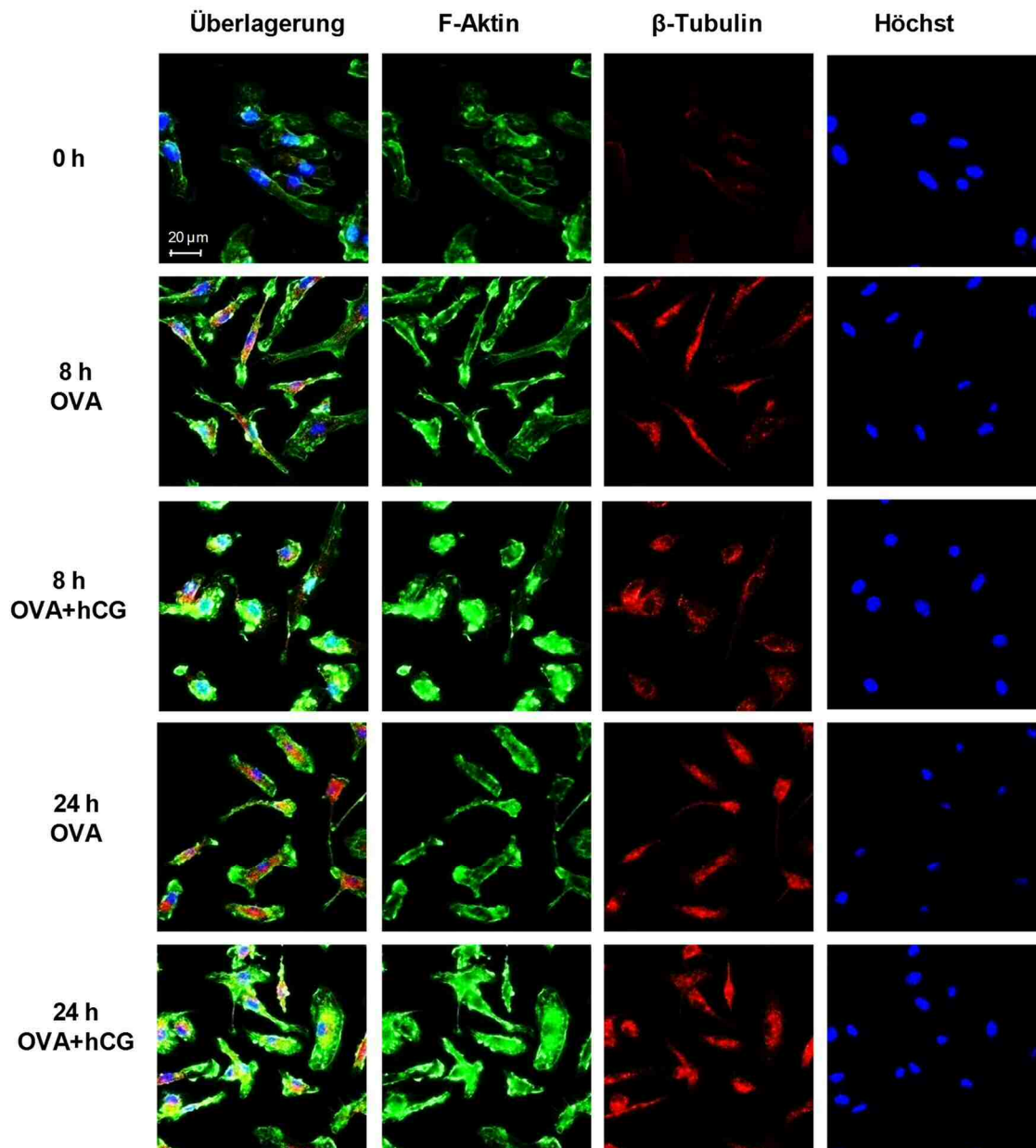


Abbildung 27: Morphologische Veränderungen in Makrophagen nach OVA und OVA/hCG Stimulation

Hierfür wurden *in vitro* generierte Makrophagen für 0, 8 und 24 Stunden entweder allein mit 62,5 μg/ml OVA oder mit der gleichen OVA-Konzentration und 150U hCG behandelt (siehe: 2.2.13 Behandlungsprotokoll). Anschließend wurde das F-Aktin- und β-Tubulin-Zytoskelett der Makrophagen gefärbt. In Grün ist F-Aktin und in Rot ist β-Tubulin zu sehen. Zur Erkennung der Kerne wurde eine Höchst-Färbung (blau) mitgeführt. Die Immunfluoreszenzbilder wurden mittels eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops aufgenommen.

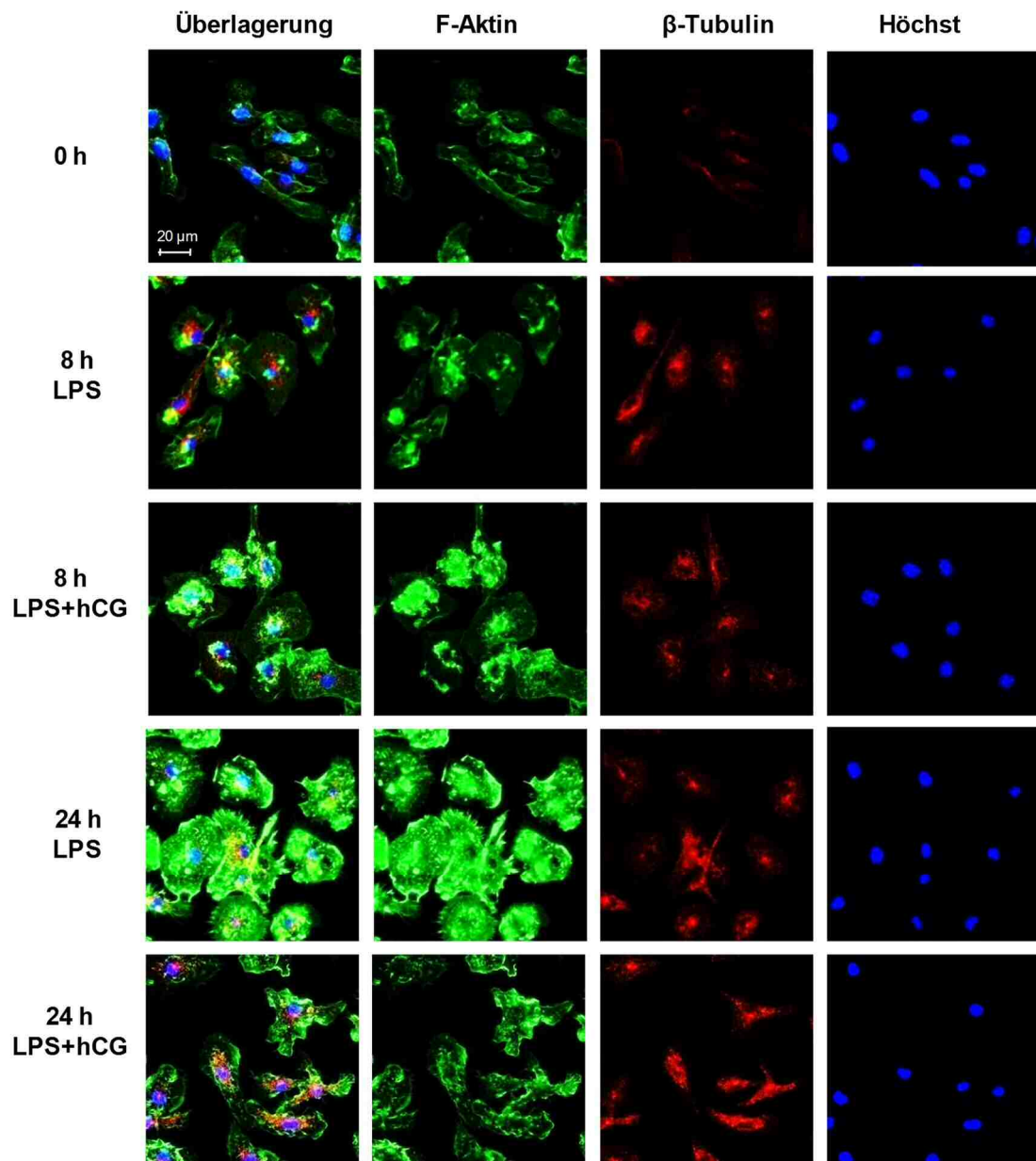


Abbildung 28: Morphologische Veränderungen in Makrophagen nach LPS und LPS/hCG Stimulation

Hierfür wurden *in vitro* generierte Makrophagen für 0, 8 und 24 Stunden entweder allein mit 1 μ g/ml LPS oder mit der gleichen LPS-Konzentration und 150U hCG behandelt (siehe: 2.2.13 Behandlungsprotokoll). Anschließend wurde das F-Aktin- und β -Tubulin-Zytoskelett der Makrophagen gefärbt. In Grün ist F-Aktin und in Rot ist β -Tubulin zu sehen. Zur Erkennung der Kerne wurde eine Höchst-Färbung (blau) mitgeführt. Die Immunfluoreszenzbilder wurden mittels eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops aufgenommen.

3.2.4 Makrophagen produzieren IL-10 nach Zugabe von hCG

Interleukin-10 ist ein pleiotropisches Zytokin, welches von vielen Immunzellen, wie Makrophagen, Dendritischen Zellen, B-Zellen und verschiedenen CD4 und CD8 T-Zellsubtypen produziert wird. Eine Vielzahl von *in vitro* und *in vivo* Studien erforschten und bewiesen die antiinflammatorischen und immunsupressorischen Eigenschaften dieses Zytokins. Diverse endogene und exogene Mediatoren aktivieren Makrophagen zur IL-10 Produktion, welche durch abhängige und unabhängige Toll-like Rezeptor Signalwege eingeleitet werden kann. Demzufolge werden unterschiedliche zytoplasmatische und nukleäre Moleküle in der Signalkaskade aktiviert [164, 247]. Glykoprotein hormone werden auch als „Selbstantigene“ bezeichnet. Dem Choriongonadotropin, das normalerweise nur während der Schwangerschaft produziert wird, wird eine immunologische Toleranz zugeschrieben [248]

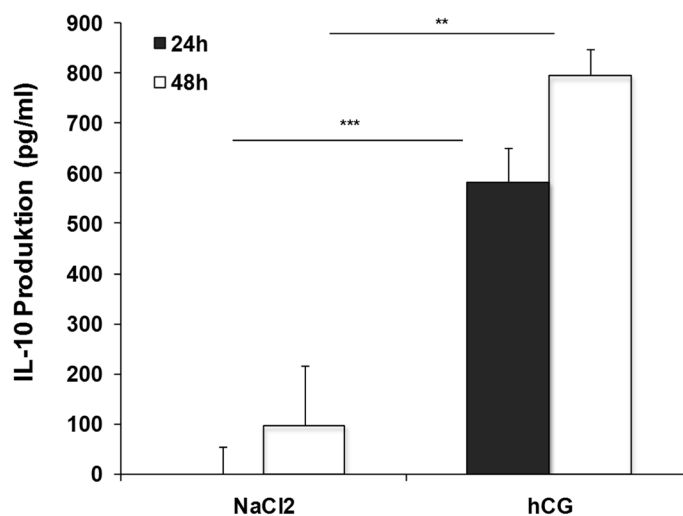


Abbildung 29: HCG fördert die IL-10 Produktion in Makrophagen

Hierfür wurden *in vitro* generierte Makrophagen für 24 und 48 Stunden mit 150U hCG behandelt. Anschließend wurde der IL-10 Level in den Überständen mittels ELISA analysiert. Mittelwerte \pm SD (n=4). Signifikanzniveau: **, *** (P<0,01; P<0,001).

Hierfür wurde in den folgenden Experimenten die IL-10 Produktion, sowie einige in die IL-10 Kaskade involvierte Signalproteine analysiert. Murine Makrophagen wurden mit 150U hCG für 24 und 48 Stunden stimuliert. Die abgenommenen Überstände dienten zur Ermittlung der IL-10 Freisetzung. Wie die dargestellten Ergebnisse zeigen, wurde eine erhöhte IL-10 Sekretion in den Überständen der hCG behandelten Zellen ermittelt. Beim ersten ausgewählten Zeitpunkt wurde eine Konzentration von 583,80 pg/ml detektiert und beim zweiten ca.800 pg/ml.

Für ein besseres Verständnis der oben ermittelten Daten wurde eine Kinetik durchgeführt. Diese erfolgte durch die Zugabe des Peptidhormons für ½, 1, 2, 4 und 8 Stunden in die Makrophagenkultur, gefolgt von einer Proteinisolation. Durch die Westernblot-Methode konnte eine eindeutige Phosphorylierung wichtiger Proteine, welche an dem IL-10 Signalwegbeteiligt sind, dokumentiert werden.

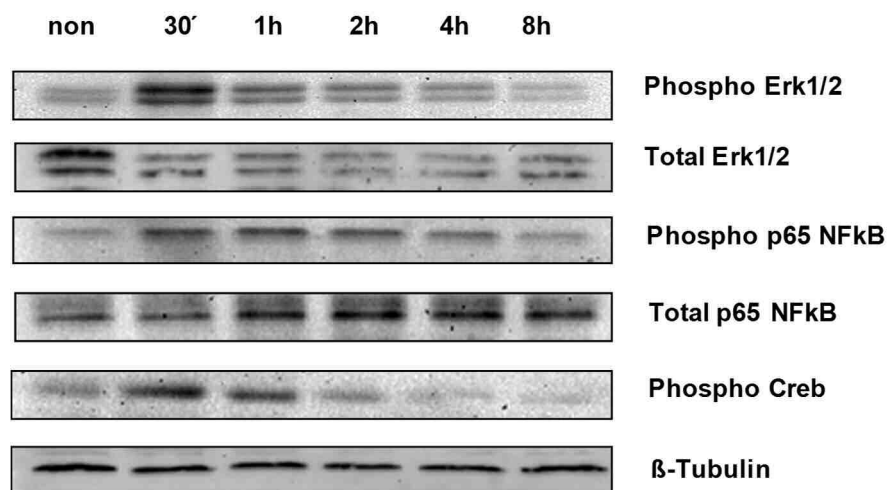


Abbildung 30: Aktivierung des IL-10 Signalwegs nach hCG Behandlung

In vitro generierte Makrophagen wurden für 30', 1 Std., 2 Std., 4 Std. und 8 Std. mit 150U hCG stimuliert (siehe: 2.2.13). Anschließend erfolgte die Proteinisolation. Mittels Western Blot wurden folgende Proteine: Erk1/2, NFκB und Creb, involviert in der IL-10 Synthese, untersucht. Als Beladungskontrolle wurde β-Aktin verwendet.

Im Vordergrund steht die Aktivierung des ERK-Kinase-Wegs, bekannt auch als MAPK-Kaskadeweg, der für eine optimale IL-10 Produktion erforderlich ist. Erk1 und Erk2 gehören zu den extrazellulären Signal-regulierten Kinasen, die zugleich eine entscheidende Rolle bei der Zelldifferenzierung spielen. Es ist eine sehr starke Phosphorylierung nach 30 minütiger Stimulation mit hCG zu detektieren. Im weiteren Verlauf nimmt die Phosphorylierung graduell ab. Die Aktivierung dieser Kinasen führt auch zu ihrer Translokation im Zellkern, die weiter den Transkriptionsfaktor Creb phosphorylieren, wie das Westernblot-Bild erkennen lässt. Parallel dazu wurde eine Phosphorylierung von NF-κB (p65) bestimmt. In den meisten Zelltypen, mit wenigen Ausnahmen, ist NF-κB inaktiv im Zytoplasma zu finden, die allerdings nach ihrer Aktivierung in den Zellkern wandert. Nach 30 Minuten wurden auffallende Unterschiede in der Phosphorylierung von NF-κB zwischen den nicht stimulierten und stimulierten Makrophagen festgestellt. Aber diese ist gegenüber phospho Erk1/2 nicht so deutlich ausgeprägt.

Parallel dazu wurde mittels einer Immunfluoreszenzfärbung nach ½ Stunde die Aktivierung von Erk1/2 ermittelt. Zum Vergleich wurden unbehandelte Zellen mit phospho Erk1/2 gefärbt. Durch die Fluoreszenzaufnahme wurde die Erk1/2 Phosphorylierung nicht nur erneut bestätigt, sondern auch das Ausmaß der Aktivierung demonstriert.

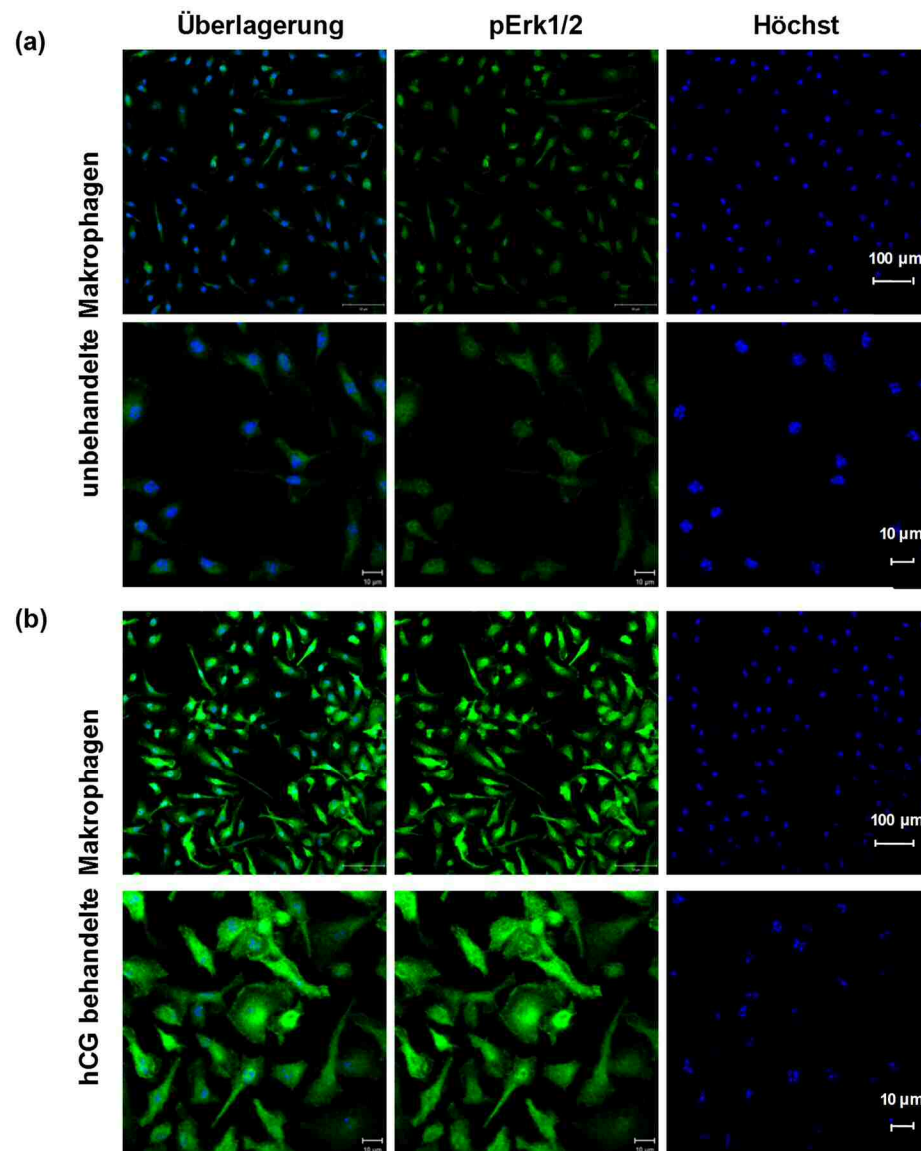


Abbildung 31: Phosphorylierung von Erk1/2 in Makrophagen nach hCG Behandlung

Die Phosphorylierung von Erk1/2 wurde in unstimulierten (a) und in hCG (150U/ml) stimulierten murinen Makrophagen (b) untersucht (Siehe: 2.2.10-2.2.13). Die Immunfluoreszenzbilder, die mittels eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops aufgenommen wurden, zeigen deutliche Unterschiede in dem Phosphorylierungsniveau nach nur 30 minütiger Behandlung mit hCG. In Grün ist pErk1/2 und in Blau sind die Zellkerne (Höchst-Färbung) zu erkennen.

Nicht zuletzt stellte sich die Frage, wie Makrophagen das hCG-Hormon erkennen. Die rasche Phosphorylierung von Erk1/2, NF- κ B und Creb weisen auf eine rezeptorvermittelte Erkennung hin. Dazu wurden die *in vitro* generierten Makrophagen mittels Durchflusszytometrie auf den LH/CG-Rezeptor untersucht. Die FACS-Analyse zeigte eine eindeutige Expression des Rezeptors und somit die Erklärung für die schnell ausgelöste IL-10 Kaskade.

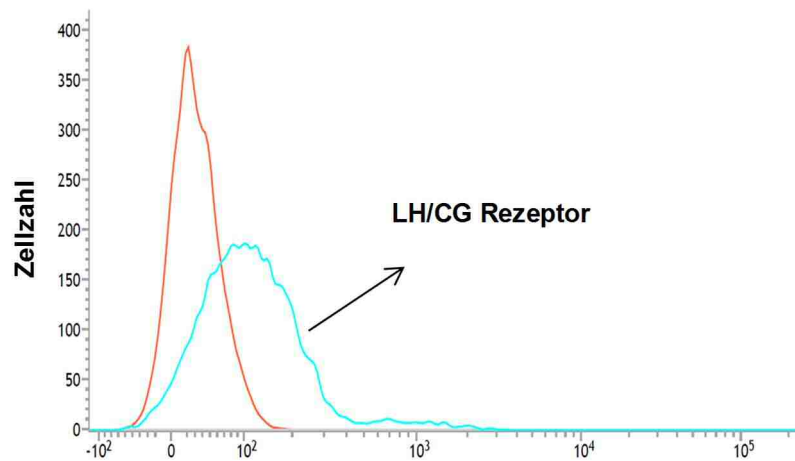


Abbildung 32: Expression des LH/CG-Rezeptors in murinen Makrophagen

Mittels Durchflusszytometrie wurde der LH/CG-Rezeptor auf der Oberfläche muriner Makrophagen nachgewiesen. In Rot ist die Isotypkontrolle (Medianwert=31) und in Blau der LH/CG-Rezeptor (Medianwert=101) dargestellt.

3.3 Generierung konditioneller Sirt1 Mäuse (Sirt1^{F/F} CD4^{Cre/+})

HCG erwies sich als wichtiger Regulator für die Deacetylase Sirt1, wie in humanen und murinen *in vitro* Studien beschrieben wurde [249]. Da Sirt1 ein molekulares Zielprotein von hCG darstellt, sollte dessen Funktion vorerst in der T-Zellentwicklung und später in der Th2-vermittelten Immunantwort in Asthma bronchiale untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die transgenen Mauslinien B6; 129-Sirt1tm1Ygu/J und B6.Cg-Tg (Cd4-cre) verpaart. Wie bereits beschrieben, wurde das Cre/loxP-Rekombinase System verwendet, sodass eine gewebespezifische Modifikation erzielt wurde. Der Mausstamm B6; 129-Sirt1tm1Ygu/J enthielt die loxP-Erkennungssequenzen, flankierend Exon4 und die Mauslinie B6.Cg-Tg (Cd4-cre) beinhaltete die loxP-spezifische Cre-Rekombinase, die unter der Kontrolle des zellspezifischen CD4 Promoters stand. Eine Kreuzung der genannten Mausstämmen führte zur Cre-vermittelten Deletion des Zielexons in der nächsten Generation. Hingegen blieb das flankierte Exon4 in Abwesenheit der Cre-Rekombinase funktionell intakt und wurde weiter normal exprimiert. Exon 4 mit einer Länge von 153 bp enthält eine im Laufe der Evolution stark konservierte Nukleotidsequenz, kodierend für eine 51 Aminosäurekette, die zur katalytischen Domäne von Sirt1 gehört. Die Deletion von Exon 4 beeinträchtigte nicht die Expression des Sirt1 Gens, was daraufhin ein verkürztes Protein ergab. Außerdem wurden keine phänotypischen Merkmale zwischen den entsprechenden Mausmutanten beobachtet.

In Abbildung 33 ist eine schematische Darstellung des Wildtyp-Gens Sirt1, gefolgt von den Genveränderungen, ausgelöst in seinem Locus, veranschaulicht. Eine Genotypisierung der Tiere diente zur Überprüfung des Transgenstatus und erfolgte mittels semiquantitativer PCR-Analyse unter Verwendung von drei Primern. Für die Amplifikation der verschiedenen DNA-Fragmente wurden sowohl die Primerpaare A und B, als auch C und B eingesetzt, die Produkte von 750 bp, 650 bp und 550 bp Größe lieferten. Das kleinste Fragment weist auf das Wildtypallel, das keine eingefügten Flox-Sequenzen besitzt und das Größte Stück auf die integrierten loxP-Seiten. Eine Doppelbande deutet auf ein heterozygoten Tier hin, während eine Einzelbande von 750 bp auf ein homozygoten Tier für die LoxP-Sequenz hindeutet. Für das Bestimmen einer Exon4-Deletion wurden die Primer C und B verwendet, dessen Produkt als eine mittlere Bande im Agarosegel zu detektieren ist.

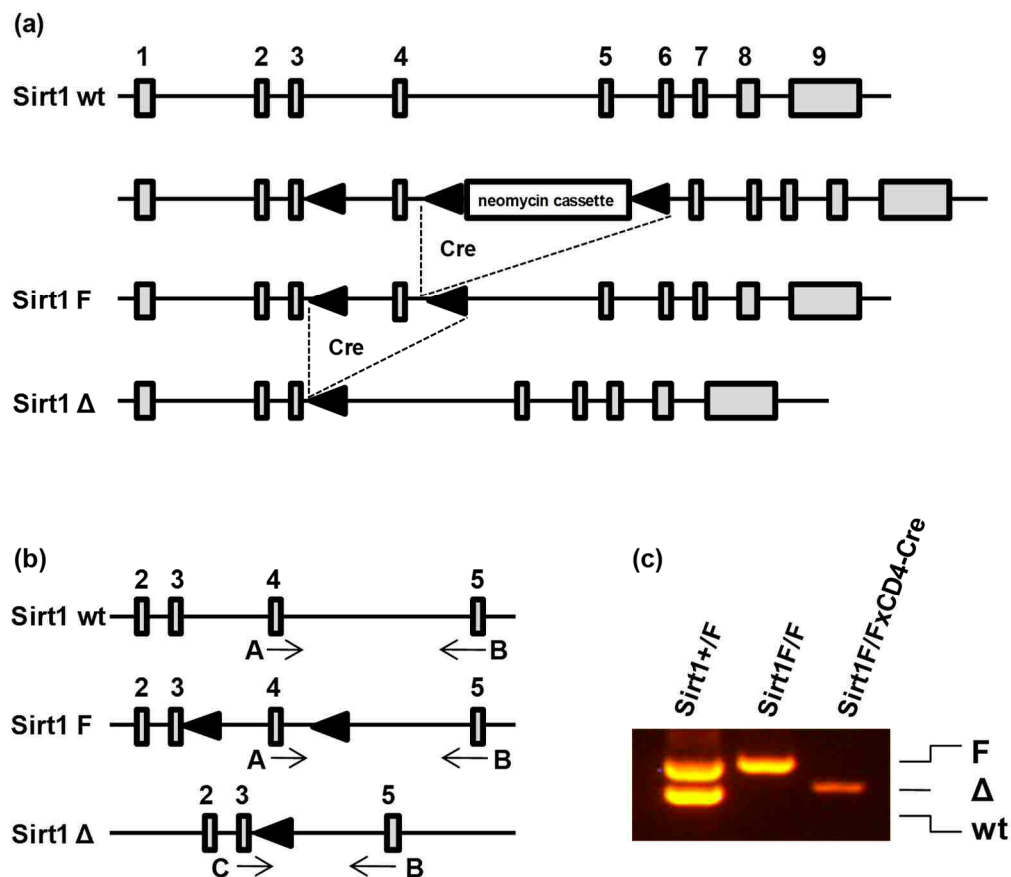


Abbildung 33: Mutagenese-strategie zur Generierung konditioneller $Sirt1^{F/F}$ $CD4^{Cre/+}$ ($Sirt1 \Delta$ und $Sirt1 F$) Mäuse

(a) Schematische Darstellung des *Sirt1* Gens, das 9 Exons beinhaltet (*Sirt1 wt*). Durch homologe Rekombination des Wildtypallels mit einem Targetingvektor wurde eine von lox-P-Sequenzen flankierte Selektionskassette mit dem Neomycin-Resistenzgen, eingebaut. Nach einer erfolgreichen Insertion wurde später mittels Cre vermittelter Rekombination diese rausgeschnitten (*Sirt1 F*). Die Deletion des geflochtenen Exon 4 erfolgte durch Verpaarung mit einer Cre-Maus, konditionell in CD4-T-Zellen (*Sirt1 Δ*). (b) Links im Bild ist das Binden der Primerpaare veranschaulicht, die in zwei PCR-Reaktionen angesetzt wurden. Die Kombination des Primerpaars A und B ergab Produkte mit einer Größe von 750 und 550 Basenpaare (wt-550bp; F-750bp). Die Deletion von Exon 4 konnte durch das zweite Primerpaar C und B detektiert werden (Δ -650bp). (c) Rechts im Agarosegel ist die PCR-Analyse nach DNA-Isolation von $Sirt1^{+/F}$ (wt), $Sirt1^{F/F}$ (F) und $Sirt1^{F/FxCD4^{Cre/+}}$ (Δ) Mäusen zu sehen.

3.3.1 Charakterisierung von T-Lymphozyten im Thymus und der Milz konditioneller Sirt1 Mäuse ($Sirt1^{F/F} CD4^{Cre/+}$)

Sirt1 wird in allen Geweben exprimiert. Im Thymus allerdings ist es vermehrt vorhanden, besonders in CD4 und CD8 positiven Thymozyten. Um zu überprüfen, ob eine beeinträchtigte Sirt1-Deacetylasefunktion die Entwicklung von T-Lymphozytenpopulationen negativ beeinflusst, wurde zunächst eine Thymozytenisolation mit anschließender Markierung der Zellen vorgenommen. Mittels Durchflusszytometrie wurde die T-Zellentwicklung im Thymus charakterisiert. Die Ergebnisse in Abbildung 34 zeigen keine Unterschiede in dem Oberflächenexpressionsmuster der Corezeptoren CD4 und CD8 zwischen den Sirt1 Δ und Sirt1 F Mäusen. Die Analyse ergab ebenfalls keine Differenzen in der Gesamthymozytenzahl sowie in den doppelt positiven und doppelt negativen Populationen.

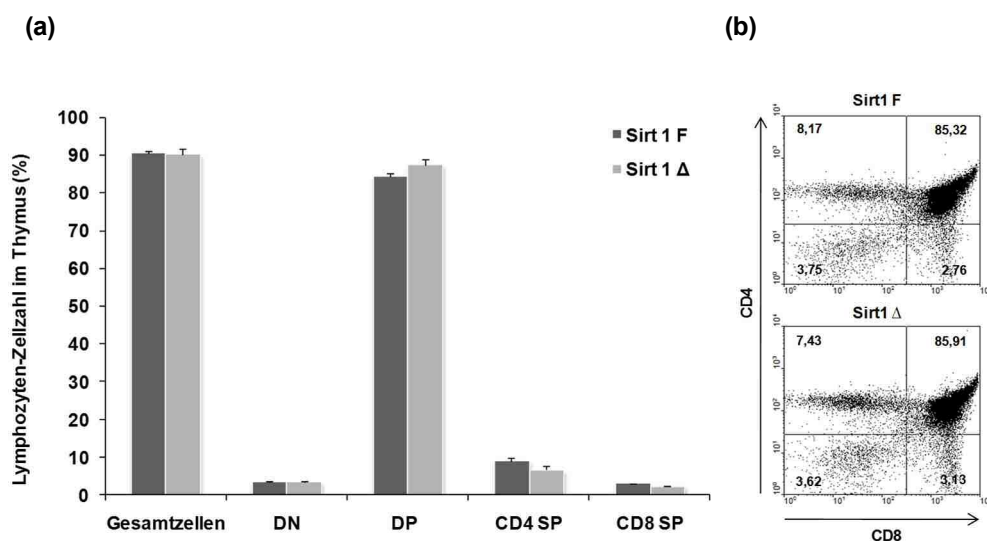
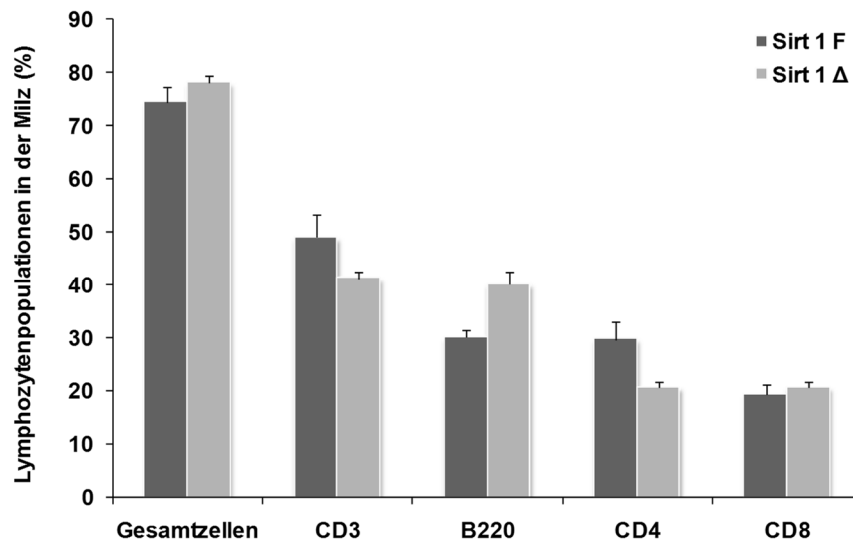


Abbildung 34: Expression von CD4 und CD8 auf T-Zellen

(a) Aus dem Thymus naiver Sirt1 Δ und Sirt1 F Mäuse wurden Gesamtzellen isoliert, die mit den Oberflächenmarkern anti-CD4 und anti-CD8 markiert und anschließend mittels FACS analysiert wurden. (b) Die Dot Plots dienen zur Veranschaulichung der Ergebnisse. Mittelwerte \pm SD (n=4).

Nachdem analysiert wurde, ob der Knockout der Deacetylasefunktion im Sirt1 Gen eine gestörte Entwicklung der Lymphozyten im Thymus zur Folge hat, wurde als nächstes das Lymphozytenprofil in der Peripherie untersucht. In der Milz, dem sekundär lymphatischen Organ, findet die Differenzierung und Vermehrung von B-

und T-Lymphozyten statt. Folglich wurden laut Protokoll Milzzellen isoliert und mit verschiedenen Antikörpern, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 und anti-B220 markiert und mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht.



Abbildung

35:

Untersuchung der Lymphozytenpopulationen in der Milz

Hierfür wurden Gesamtzellen aus der Milz von naiven Sirt1 Δ und Sirt1 F Mäusen isoliert und die Zielpopulationen mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt. Die schematische Darstellung zeigt die FACS-Analyse der CD3, B220, CD4 und CD8 Lymphozyten in diesem sekundären lymphatischen Organ. Mittelwerte \pm SD (n=4).

Durch die Zelluntersuchung wurden geringe Veränderungen in der Anzahl der Oberflächenmoleküle CD3 und CD4 auf T-Zellen in der Milz von Sirt1 Δ Mäusen festgestellt. Wie im Balkendiagramm zu sehen ist, befindet sich die CD3-T-Zellpopulation in Korrelation mit der CD4-T-Lymphozytenpopulation. Betrachtet man die verschiedenen Subpopulationen von Lymphozyten, fiel ebenso die leicht erhöhte Expression von B220, bekannt auch als CD45R, auf B-Zellen in den konditionellen Tieren verglichen mit den Wildtyp-Mäusen auf. Die Zahl zytotoxischer T-Zellen, charakterisiert durch das CD8 Oberflächenantigen, blieb in beiden Tiergruppen unverändert.

Die Proteinacetylierung ist ein natürlicher und genau kontrollierter biologischer Prozess, der durch Lysinacetyltransferasen und Lysinacetylidasen reguliert wird. *In vitro* und *in vivo* Studien zeigen, dass verschiedene HDAC-Inhibitoren eine erhöhte Zahl von regulatorischen T-Zellen und die damit erzielte suppressorische Wirkung

induzierten. Forschungen zeigten, wie wichtig die Acetylierung des Transkriptionsfaktors Foxp3 ist, der essentiell für die Entwicklung und Funktion von regulatorischen T-Lymphozyten ist [221, 223]. Wiederum führt eine Deacetylierung des Foxp3 Proteins zu seiner Instabilität und Funktionslosigkeit. Es wurde berichtet, dass Sirtuin1 Foxp3 deacetyliert und seine inhibitorischen Wirkungen beeinflusst. Ob das Fehlen der Sirt1-Deacetylasefunktion in CD4⁺ T-Zellen die Expression von Foxp3 behindert, wurde hier analysiert.

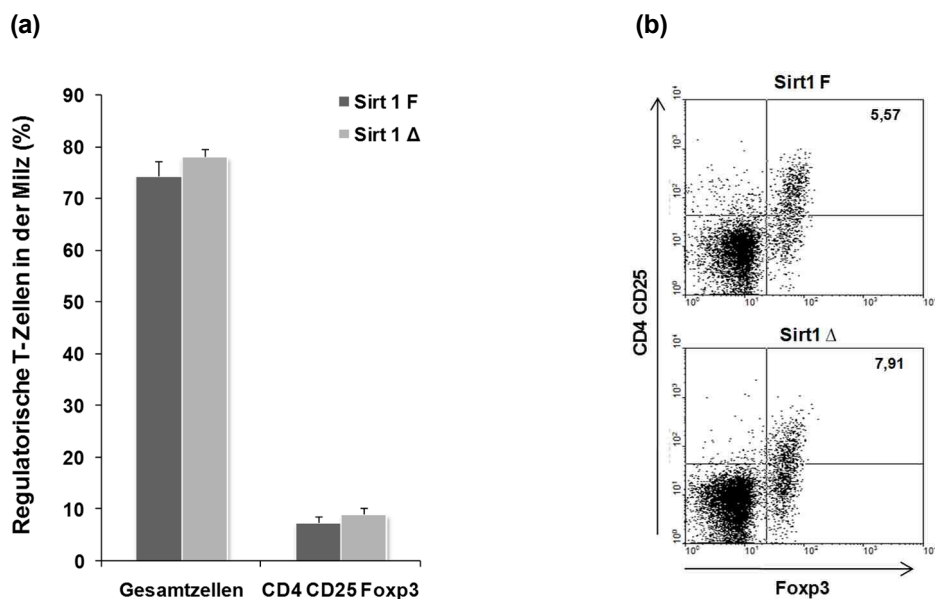


Abbildung 36: Anteil regulatorischer CD4-Zellen in der Milz

Im Durchflusszytometer wurde der Anteil regulatorischer Lymphozyten in der Milz beider Mausstämme gemessen und analysiert. Dafür wurden die Milzzellen mit Antikörpern gegen CD4, CD25 und Foxp3 inkubiert. **(a)** Die prozentuale Auswertung bezieht sich auf die ausgewählte CD4⁺ Lymphozytenpopulation. **(b)** Rechts sind die Dot Plots analog zu den Ergebnissen gezeigt. Mittelwerte \pm SD (n=4).

Hierfür wurden Zellen aus der Milz von naiven Sirt1 Δ und Sirt1 F Mäusen isoliert und mit den entsprechenden Markern gefärbt. Regulatorische T-Zellen sind durch die Oberflächenmarker CD4, CD25 (die α -Kette des IL-2 Rezeptors) und dem Transkriptionsfaktor Foxp3 definiert. Wie in Abbildung 36 zu erkennen ist, wurde die geschilderte Dreifachfärbung durchgeführt und mit der FACS-Methode analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass der Verlust der Deacetylasefunktion in den peripheren T-Zellen keinen Einfluss auf die Expression von CD25 und Foxp3 hatte. Sowohl die

Wildtypen als auch die konditionellen Tiere zeigten keine Unterschiede in der Zahl suppressorischer T-Zellen.

Die Kontrolle des Immunsystems beruht auf einer normalen Immunantwort, die auf die Wanderung von Lymphozyten zwischen lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben angewiesen ist. Da naive T-Zellen bei ausgebliebenem Kontakt zu einem spezifischen Antigen stationär bleiben und nicht auswandern, sind sie fast ausschließlich in den sekundären lymphatischen Organen zu finden. Der CD62 Ligand, auch bekannt als L-Selektin, ist ein Adhäsionsmolekül, das die Migration von naiven T-Zellen vermittelt. [250]

Um die Expression des CD62 Ligands auf CD4⁺ T-Lymphozyten zu untersuchen, wurden Gesamtzellen aus der Milz von beiden Tiergruppen isoliert und mit den zweckmäßigen Antikörpern eine Oberflächenfärbung durchgeführt. Die FACS-Analyse zeigte keine Differenzen bezüglich des CD62L Oberflächenmarkers zwischen den einzelnen Tierstämmen. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass eine gestörte Sirt1 Funktion, die Expression des Adhäsionsproteins nicht beeinträchtigt und eine normale Entwicklung von naiven T-Lymphozyten stattfindet.

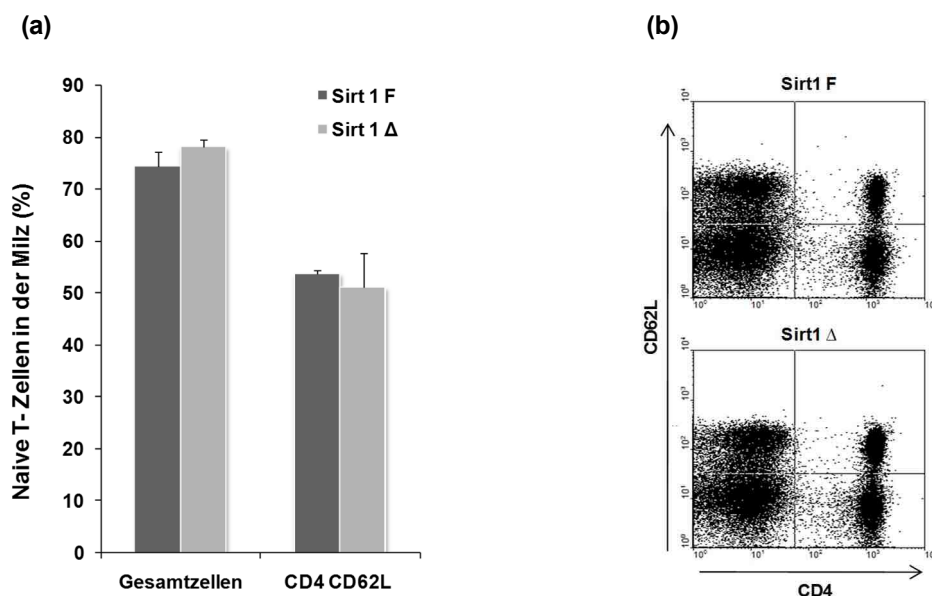


Abbildung 37: Anteil naiver CD4-Zellen in der Milz

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde der naive Phänotyp von CD4⁺ Lymphozyten nach einer Gesamtzellisolation aus der Milz der zwei untersuchten Mausstämme untersucht. Dafür wurden 700.000 Zellen mit den entsprechenden Antikörpern (CD4 und CD62L) markiert. **(a)** Links ist die Datenanalyse dargestellt. **(b)** Auf der rechten Seite befinden sich die Dotplots, die zur Veranschaulichung der Ergebnisse dienen. Mittelwerte \pm SD (n=4).

3.3.2 Bestimmung des Atemwiderstandes von Sirt1^{F/F}CD4^{Cre/+} Mäusen

Es wurde bereits beschrieben, dass der Funktionsverlust der Typ III Histon-Deacetylase Sirt1 zu erhöhter T-Zellaktivierung und beeinträchtigter T-Zelltoleranz führt [221]. In diesem Krankheitsmodell stellt sich die Frage, ob eine gestörte Deacetylasefunktion in CD4⁺ T-Zellen die Hyperreagibilität der Atemwege beeinflusst. Um dies zu ermitteln, wurde eine Lungenfunktionsmessung durchgeführt.

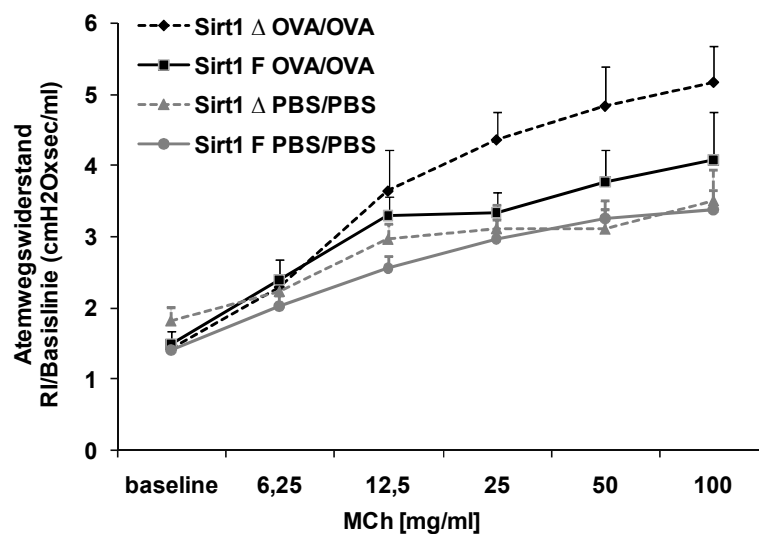


Abbildung 38: Darstellung der bronchialen Hyperreagibilität

Tiere beider Stämme (Sirt1 Δ und Sirt1 F) wurde zweimal (Tag 0 und 7) 100 μ g OVA- oder PBS-Alum-Lösung (200 μ l) intraperitoneal appliziert. An Tag 14, 15 und 16 Tag erfolgte die 1% OVA- bzw. PBS-Provokation für je 30 Minuten. Die Lungenfunktionsmessung wurde 24 Stunden nach der letzten OVA Aerosolbehandlung (siehe 2.2.3 Behandlungsprotokoll) bei aufsteigender Methacholindosierung (6,25; 12,50; 25,00; 50,00 und 100,00 mg/ml) mittels des invasiven Systems der Firma BUXCO® durchgeführt. Mittelwerte \pm SD (n=4-5).

24 Stunden nach der letzten inhalativen OVA und/oder PBS Exposition wurde der Atemwegwiderstand der Mäuse mit dem invasiven System der Firma BUXCO® gemessen. Hierbei wurden die anästhesierten Mäuse tracheal intubiert und mit steigenden Dosen des Bronchokonstriktors Methacholin provoziert. Die aufsteigenden Konzentrationen des Methacholins bewirken eine dosisabhängige Bronchokonstriktion. Wie aus der Grafik zu entnehmen ist, zeigen die OVA/OVA konditionellen Mäuse im Vergleich zu den OVA/OVA Wildtyp-Mäusen einen erkennbar höheren Atemwegwiderstand, was auf eine verstärkte Verengung der Bronchien zurückzuführen ist. Als Kontrollmäuse wurden sowohl Sirt1 Δ als auch

Sirt1 F Tiere verwendet. Es konnten keine Unterschiede zwischen den PBS-Gruppen bezüglich der Empfindlichkeit der Atemwege festgestellt werden.

3.3.3 Charakterisierung der humoralen Immunantwort in Sirt1^{F/F}CD4^{Cre/+} Mäusen

Allergisches Asthma Bronchiale ist durch eine Immunglobulin E vermittelte Überempfindlichkeitsreaktion charakterisiert, die in diesem Modell nach zweimaliger intraperitonealer Sensibilisierung der Tiere mit einem OVA/Alum-Komplex hervorgerufen wurde.

Um Unterschiede in der humoralen Immunantwort überprüfen zu können, wurde aus dem Blutserum von naiven und behandelten Tieren der IgE-Spiegel mittels ELISA bestimmt. Zum einen wurde der Gesamt IgE-Level und zum anderen der Allergen-spezifische IgE-Level nachgewiesen. Die Ergebnisse dargestellt in Abbildung 39 a und b zeigen einen signifikanten Anstieg an IgE in den OVA-behandelten Sirt1 Δ Mäusen im Gegensatz zu den OVA-behandelten Sirt1 F Mäusen. Eine Differenz zwischen den Kontrollgruppen wurde sowohl in dem Gesamt IgE- als auch in dem OVA-spezifischen IgE-Spiegel nicht festgestellt. So konnte eine generell vermehrte IgE-Produktion in den naiven Sirt1 Δ Mäusen ausgeschlossen werden.

Interleukin-4, bekannt auch als B-Zell stimulierender Faktor-1, der die IgE-Produktion fördert, zeigte ebenfalls hohe Werte (Abb. 43a). Es wurde eine Korrelation zwischen erhöhtem IL-4 Level und hohem IgE-Spiegel festgestellt [34]. Bei einer 100fach niedrigeren IL-4 Sezernierung dagegen wurde eine gesteigerte IgG1-Produktion beobachtet [88]. Und wie hier im Punktdiagramm deutlich zu erkennen ist, zeigt der IgG1-Level, gemessen im gleichen Serum, eine Absenkung in den OVA/OVA Sirt1 Δ Mäusen verglichen mit den asthmatischen Wildtyp-Mäusen, die eine leichte IgG1-Steigerung zeigen. Da es sich um eine T-B-Zell-vermittelte Immunantwort handelt, sind IgG1 Antikörper nachzuweisen, allerdings mit einer Erhöhung in den OVA/OVA behandelten Sirt1 F Mäusen aufgrund der niedrigen IL-4 Produktion wie später in den Zytokinergebnissen zu sehen ist. In Anbetracht der wissenschaftlichen Literatur erfolgt der Klassenwechsel sprunghaft [251]. Die OVA-spezifische Messung von IgG2b wird mit einer Th1-Immunantwort assoziiert. Hier ließ sich eine erhöhte Freisetzung von IgG2b Antikörper in den asthmatischen Sirt1 F Tieren im Gegensatz zu dem niedrigen IgG2b-Titer im Serum von Sirt1 Δ Mäusen messen. Die Ergebnisse

der IgG-Spiegel deuten, ebenso wie der IgE-Titer, auf eine verstärkte asthmatische Reaktion in den konditionellen Sirt1 Δ Mäusen vergleichbar zu den Kontrolltieren hin. Bei den unbehandelten Tieren wurde erwartungsgemäß kein OVA-spezifischer Immunglobulintiter nachgewiesen.

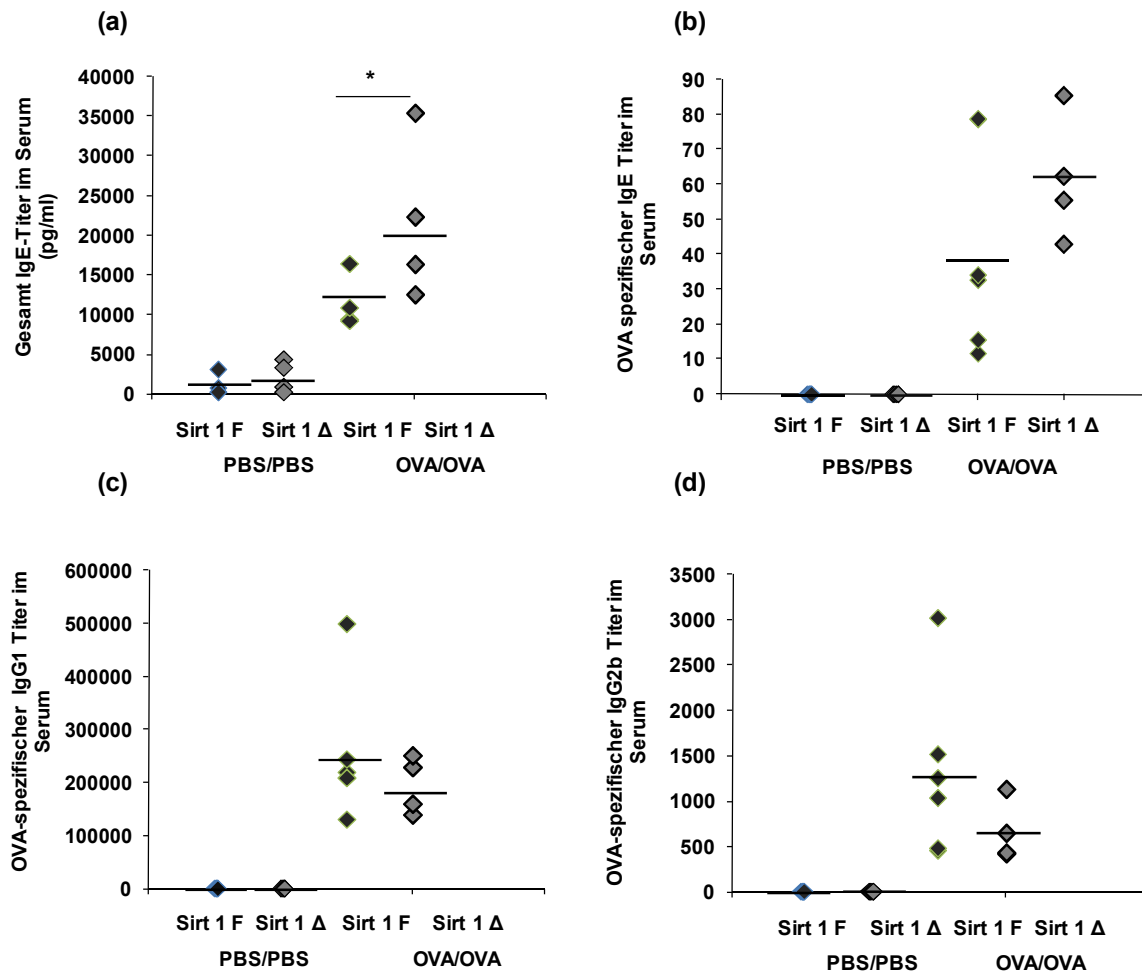


Abbildung 39: Analyse des spezifischen IgE-, IgG1- und IgG2b-Titers im Serum von Sirt1 Δ und Sirt1 F Mäusen

Der Gesamt-IgE- (a), der OVA-spezifische IgE-(b), IgG1- (c) und IgG2a-Titer (d) wurde im Blutserum, welches 24 Stunden nach der letzten OVA-, bzw. PBS-Provokation abgenommen wurde, mittels ELISA bestimmt. Der Gesamt IgE-Titer im Serum wurde in ng/ml und die OVA spezifischen IgE-(b), IgG1- (c) und IgG2a- (d) Konzentrationen wurden in Relation zum bekannten Standard in einer willkürlichen Einheit (Units) pro Milliliter dargestellt. Mittelwerte \pm SD (n=4-5); Signifikanzniveau: * (P<0,05).

3.3.4 Quantifizierung der Eosinophilie in Sirt1^{F/F}CD4^{Cre/+} Mäusen

Die Eosinophilie ist ein phänotypisches Merkmal des Asthma Bronchiale und meistens korreliert die Infiltration eosinophiler Granulozyten in den Respirationstrakt mit dem Schweregrad der Entzündung. Um dies zu ermitteln, wurden aus der Bronchoalveolarflüssigkeit gewonnener Zellen zu Cytospin-Präparaten verarbeitet und mit einer differenzierenden Zellfärbung gefärbt. So konnten die Zellen anhand morphologischer Besonderheiten charakterisiert werden. Von Interesse sind Eosinophile und Neutrophile, die in dem Balkendiagramm nach manueller Zellzählung dargestellt wurden.

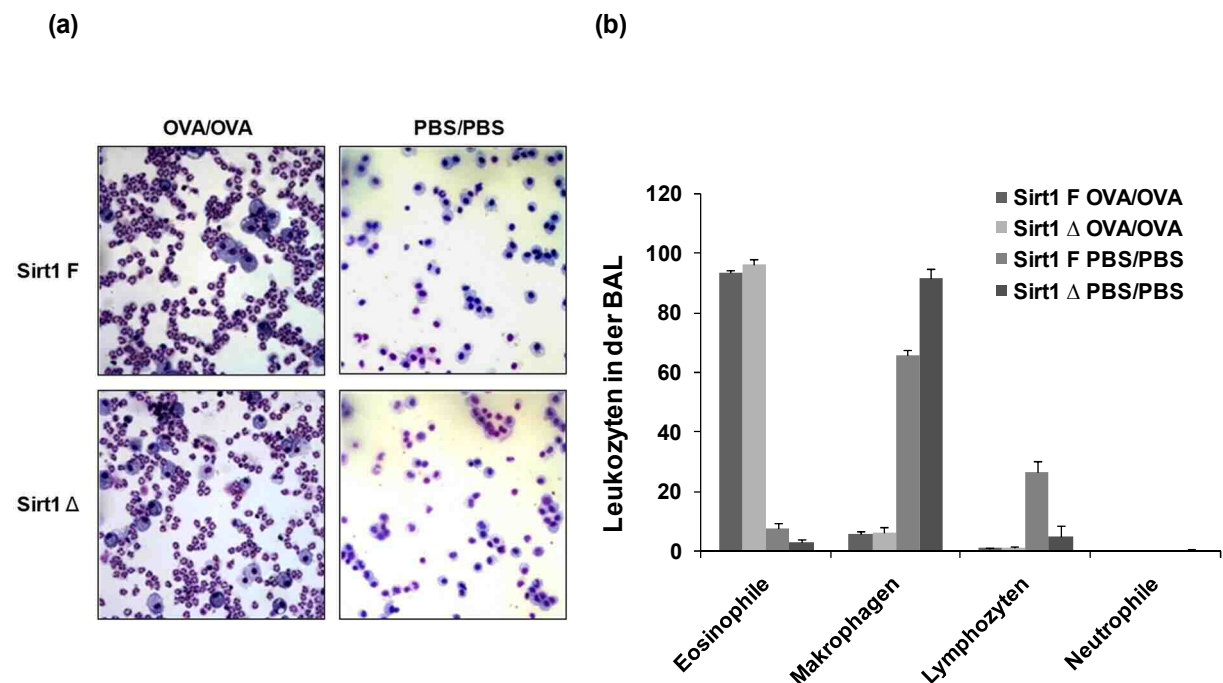


Abbildung 40: Morphologische Charakterisierung der Entzündungszellen im asthmatischen Respirationstrakt von Sirt1 Δ und Sirt1 F Mäusen

Aus der Bronchoalveolarflüssigkeit gewonnene Zellen wurden dazu genutzt Cytospin-Präparate anzufertigen. Zur Differenzierung der Zellen wurde eine Diff-Quick-Färbung durchgeführt. (a) Die bei einer 10-fachen Vergrößerung aufgenommenen Bilder dienen zur Auszählung der eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sowie Makrophagen. (b) Für die Quantifizierung der verschiedenen Zelltypen wurden 500 Zellen in unterschiedlichen Betrachtungsfeldern gezählt. Mittelwerte \pm SD (n=4-5).

Nach der quantitativen Bestimmung dieser Zellen wurde eine leicht erhöhte Eosinophilie, Steigerung von 5% in der asthmatischen Sirt1 Δ Gruppe im Gegensatz zu der vergleichbaren Sirt1 F Gruppe ermittelt. Allerdings ist dieser minimale Unterschied in den repräsentativen Cytospin-Fotos nicht erkennbar. In Hinsicht auf die signifikant hohe IL-5 Produktion in den OVA/OVA Sirt1 Δ Mäusen wäre eine viel stärkere Akkumulation von Eosinophilen in diesen Tiere verglichen mit den Wildtypen zu erwarten gewesen. Das Auszählen der eosinophilen Granulozyten in den PBS/PBS Gruppen wurde zu Kontrollzwecken durchgeführt aber dies ist nicht ausschlaggebend, da die Lunge naiver Tiere durch die überwiegende Persistenz von Makrophagen charakterisiert ist. Sowohl in den OVA/OVA als auch in den PBS/PBS Gruppen wurden kaum Differenzen in der Makrophagen-, Lymphozyten- und Neutrophilenanzahl festgestellt.

3.3.5 Inflammation in der Lunge von Sirt1^{F/F}CD4^{Cre/+} Mäusen

Zur Ermittlung des Entzündungsgrades wurden 3 μ m dicke histologische Schnitte des Lungenwebes angefertigt, die mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt wurden. Durch diese Färbung konnte die Infiltration inflammatorischer Zellen in der Lunge mit einer Skala von 1-4 quantitativ analysiert werden. Es zeigte sich eine erhöhte Migration von Entzündungszellen in der Lunge der OVA/OVA Sirt1 Δ Mäuse im Vergleich zu den OVA/OVA Sirt1 F Tieren. Trotzdem wurden keine signifikanten Differenzen zwischen den konditionellen- und Wildtyp-Mäusen ermittelt. Wie aber in Abbildung 41 zu sehen ist, liegt eine höhere Anzahl von intraepithelialen Lymphozyten im Lungengewebe der Sirt1 Δ Mäuse vor. Sogar eingedrungene Leukozyten in den Blutgefäßen der konditionellen Mäuse sind deutlich zu erkennen. Die nicht immunisierten Sirt1 Δ und Sirt1 F dienen zur Kontrolle und weisen keine Lymphozytenmigration in der Lunge auf.

Die pulmonale Mukusproduktion und -sekretion gehört zu den klassischen Eigenschaften des Asthma Bronchiale. Die Innenseite der Atemwege ist von einer hoch spezialisierten Schleimhaut ausgekleidet, bestehend aus zahlreichen Flimmerepithelzellen mit vereinzelt sitzenden becherförmigen Epithelzellen, die eine Schutzfunktion in der Lunge ausüben. Diese natürliche mukoziliäre Reinigung geht allerdings beim Vorliegen entzündlicher Erkrankungen in eine vermehrte Schleimabsonderung über, welche die Atmung erschwert.

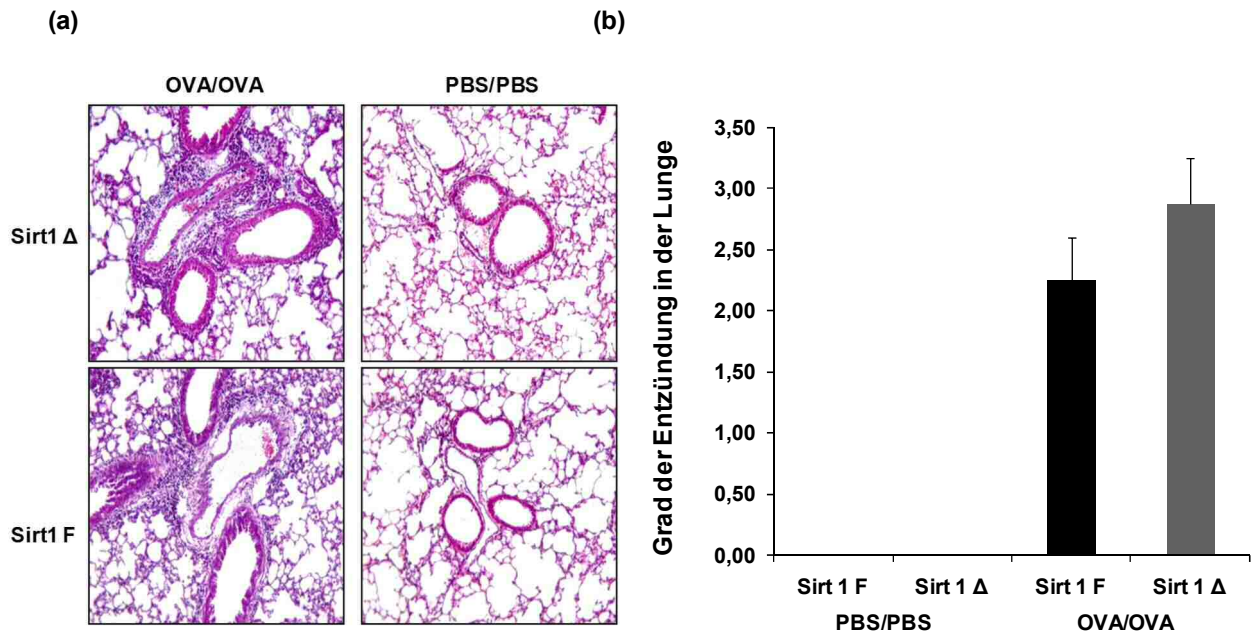


Abbildung 41: Nachweis inflammatorischer Zellen in Lungengewebschnitten

Mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde die Infiltration von Entzündungszellen in der Lunge ermittelt. **(a)** Darstellung der lichtmikroskopischen Aufnahmen in einer 10-fachen Vergrößerung. **(b)** Semiquantitative Auswertung. Grad 0: keine Entzündungszeichen; Grad 1: niedrige Infiltration von Entzündungszellen; Grad 2: mittlere Infiltration von Entzündungszellen; Grad 3: hohe Infiltration von Entzündungszellen; Grad 4: sehr starke Infiltration von Entzündungszellen. Mittelwerte \pm SD (n=4-5).

Die Mukushypersekretion ist die Folge einer Hyperplasie von Becherzellen oder/und einer transienten Transformation von Klara-Zellen in Becherzellen [252]. Diese becherförmigen Drüsen, auch Gobletzellen genannt, wurden in Paraffin eingebetteten Lungengewebsproben mittels Alzianblau-(2,5)-PAS-Färbung untersucht. Mit dieser histologischen Methode werden Schleimbestandteile magentarot bis pink im Präparat dargestellt. Die Analyse der Schnitte wies eine viel stärkere Färbung des Lungengewebes der asthmatischen Sirt1 Δ verglichen mit den asthmatischen Sirt1 F Mäusen auf. Der prozentuale Anteil der mukusproduzierenden Gobletzellen liegt bei den OVA/OVA Sirt1 Δ Tieren bei ca. 60% und den OVA/OVA Sirt1 F Tieren bei ca. 25%, wie die semiquantitative Berechnung ergab. Diese Auswertung erfolgte nach manueller Auszählung der schleimsezernierenden Becherzellen im Verhältnis zu den bronchialen Epithelzellen in der Lunge der immunisierten Mäuse, wie schon im Methodenteil beschrieben wurde. Eindeutig steht der Schweregrad der Entzündung der Atemwege in Korrelation zu dem erhöhten

Atemwegswiderstand in den vergleichenden Mausstämmen. Wie zu erwarten, zeigte die PAS-Färbung keine mukusproduzierenden Gobletzellen in beiden PBS/PBS-Tiergruppen.

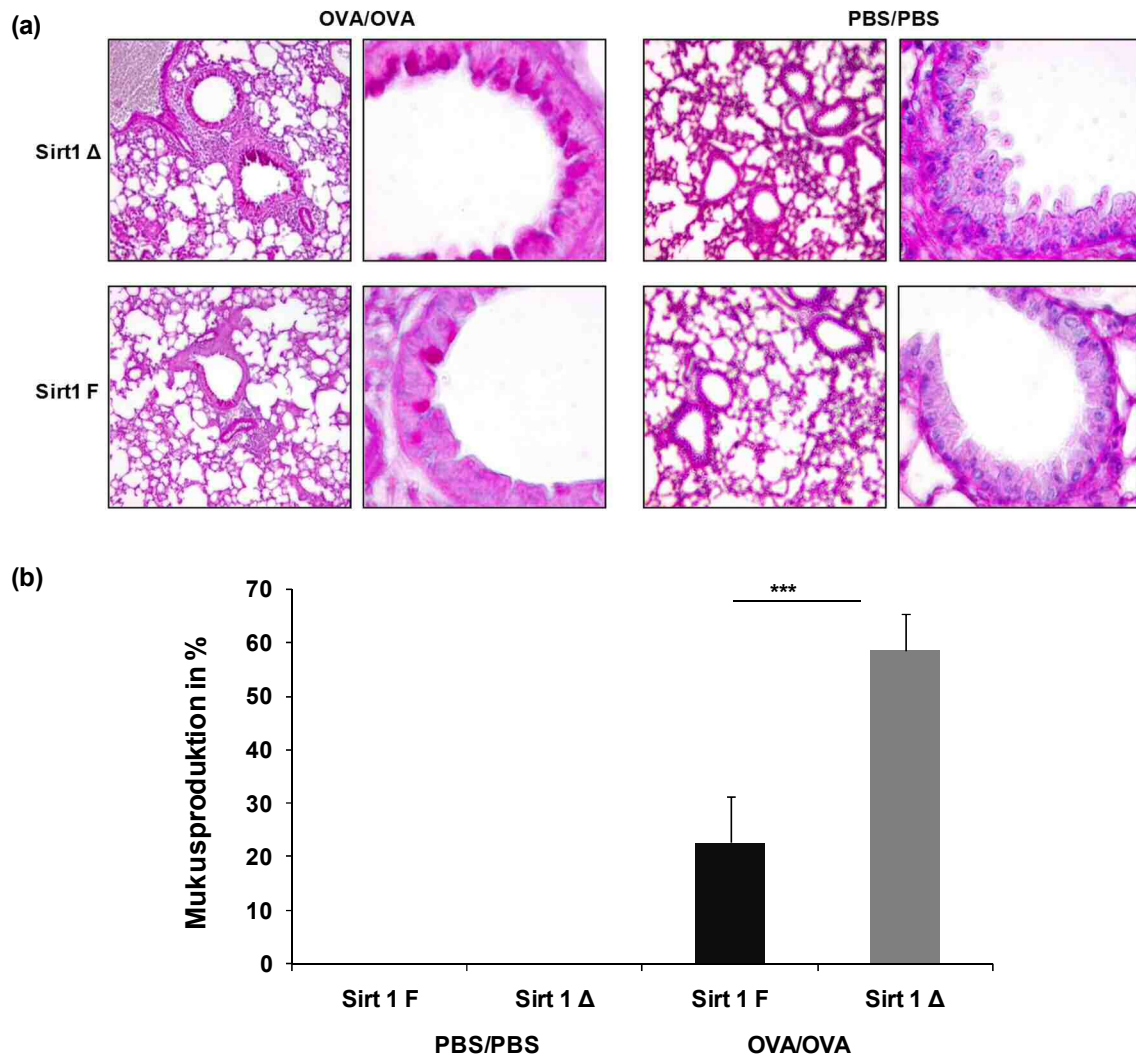


Abbildung 42: Bestimmung der Mukusproduktion in den asthmatischen Atemwegen von Sirt1 Δ und Sirt1 F Mäusen

Hierfür wurden Lungenschnitte aller Tiergruppen angefertigt. (a) Mittels einer PAS-Färbung wurde die Mukusproduktion untersucht und in einer 10- und 40-fachen Vergrößerung aufgenommen. (b) Der Grad der Vermehrung der mukusproduzierenden Becherzellen wurde im Verhältnis zu allen Epithelzellen pro Bronchus semiquantitativ ausgewertet. Grad 0: keine mukusproduzierende Becherzellen; Grad 1: bis 20% mukusproduzierende Becherzellen; Grad 2: 21-40% mukusproduzierende Becherzellen; Grad 3: 41-60% mukusproduzierende Becherzellen; Grad 4: 61-80% mukusproduzierende Becherzellen; Grad 5: ab 80% mukusproduzierende Becherzellen. (n=4; p=0,008). Mittelwerte \pm SD (n=4-5); Signifikanzniveau: *** (P<0,001).

3.3.6 Bestimmung der Th-Zytokinproduktion in der Lunge von Sirt1

^{F/F}CD4^{Cre/+} Mäusen

Diverse Studien, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, berichteten über die anti-inflammatorische Wirkung von Sirtuin1. Es wurde sogar gezeigt, dass Sirt1 die transkriptionelle Aktivität des c-Jun-Proteins durch unterbundene Acetylierung behindert und so die T-Zellaktivierung blockiert [221]. In dem vorliegenden Krankheitsmodell wurde untersucht, ob die Aktivität und/oder der partielle Verlust der Deacetylasefunktion in T-Zellen einen Einfluss auf die Zytokinfreisetzung haben. Um dies in Erfahrung zu bringen, wurden 24 Stunden nach der letzten OVA-Behandlung, Gesamtzellen aus den Lungen der vier zu untersuchenden Gruppen isoliert. Die Lungenzellen wurden in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml Medium ausgesät und mit verschiedenen Stimuli (α CD3 oder α CD3 und α CD28) für 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Abnahme der Überstände, die zur Untersuchung der sezernierten Interleukine verwendet wurden. Zum einen wurden die Th2 repräsentierenden Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, und zum anderen die Th1-Antwort, charakterisiert durch IFN- γ , analysiert. Dies erfolgte mittels der ELISA-Methode.

Die Gesamtzellen aus der Lunge der OVA/OVA immunisierten Sirt1 Δ Mäuse zeigen eine signifikante Erhöhung der Th2-freigesetzten Zytokine gegenüber denen der OVA/OVA behandelten Sirt1 F Mäusen. IL-4, welches als Zytokin die IgE Synthese durch Interaktion mit B-Zellen fördert, ist stark erhöht in den OVA/OVA konditionellen Tieren, was sich mit dem IgE-Level im Serum derselben Tiergruppe deckt. Die IL-13 Sekretion spiegelt sich in dem erhöhten Atemwegswiderstand und der massiven Mukusproduktion durch die Becherzellen in der Lunge wider. Eine Ausnahme bildet die IL-5 Sekretion, die signifikante Unterschiede zwischen den OVA/OVA Sirt1 Δ und Sirt1 F Mäusen zeigt, allerdings stehen die geringen Unterschiede in der Eosinophileninfiltration dem gegenüber.

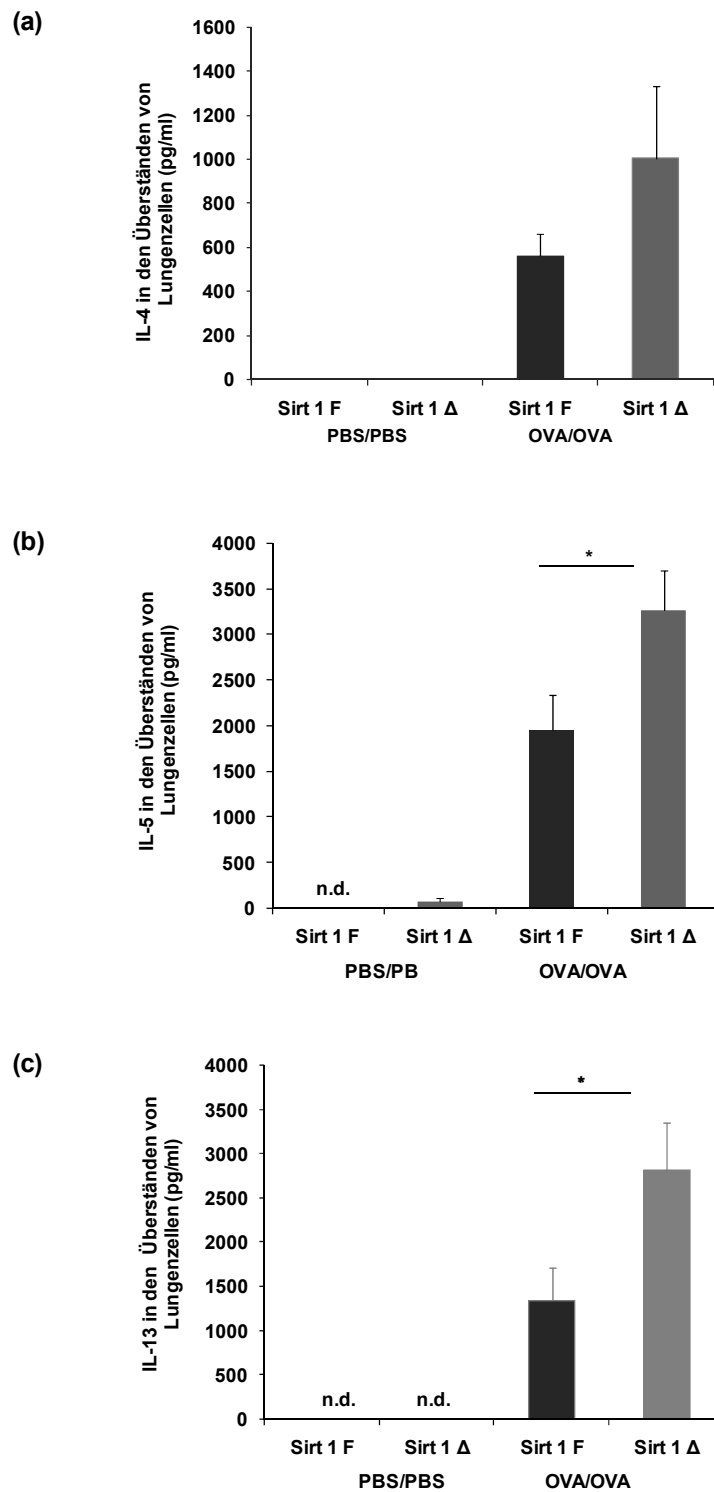


Abbildung 43: Bestimmung des Th2-Zytokinprofils in der Lunge von Sirt 1 Δ und Sirt 1 F Mäusen

Gesamtzellen aus der Lunge behandelter OVA und PBS Sirt1 Δ und Sirt1 F Mäusen wurden isoliert und mit 10 µg/ml αCD3 für 24 Stunden bei 37°C stimuliert. Die Sekretion der Th2-Zytokine IL-4 (a), IL-5 (b) und IL-13 (c) wurde in den Überständen der Lungenzellen mittels ELISA analysiert. Mittelwerte ± SD (n=4); Signifikanzniveau: * (P<0,05).

Um sich ein Bild über die Th1-Immunantwort zu machen, wurde die IFN- γ -Freisetzung in den Überständen der primären Lungenzellen analysiert. Die Zellen wurden, wie schon geschildert, mit α CD3 stimuliert, sodass gezielt eine Aktivierung der T-Lymphozyten über den T-Zellrezeptor stattfand.

Bereits publizierte *in vitro* Forschungen ergaben, dass der Verlust von HDAC1 in polarisierten Th1-Milzzellen, zu einer gesteigerten IFN- γ Produktion führt [253]. Hier allerdings zeigt der Deacetylaseverlust von Sirt1 in T-Zellen keine Differenzen bezüglich der Sezernierung von IFN- γ .

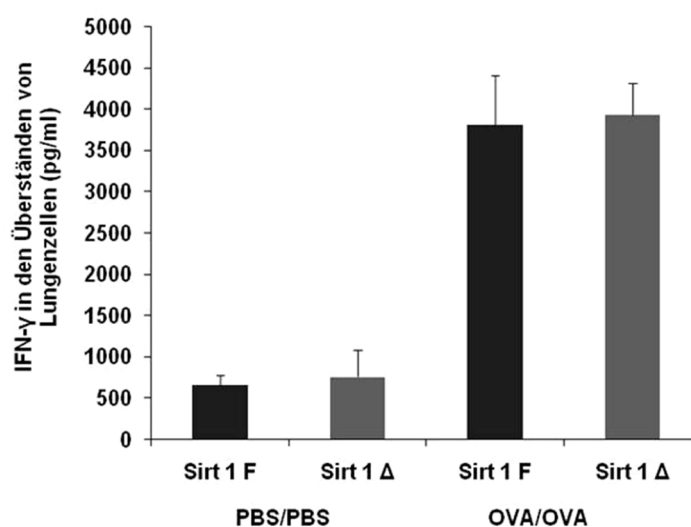


Abbildung 44: Bestimmung der IFN- γ Konzentration in der Lunge von Sirt 1 Δ und Sirt 1 F Mäusen

Gesamtzellen aus der Lunge behandelter OVA und PBS Sirt1 Δ und Sirt1 F Mäusen wurden mit α CD3 für 24 Stunden bei 37°C stimuliert. Die Freisetzung von IFN- γ wurde mit Hilfe von ELISA untersucht. Mittelwerte \pm SD (n=4-5).

Nicht zuletzt wurde die IL-17 Sekretion in der gleichen Zellpopulation mittels ELISA bestimmt. IL-17 ist ein entzündungsförderndes Zytokin, dessen Rolle bei Autoimmunerkrankungen sehr gut erforscht ist, jedoch noch nicht ausreichend bei allergischem Asthma. Die Expression von IL-17 wird durch den Transkriptionsfaktor STAT3 reguliert, der im Übrigen auch von Sirt1 deacetyliert und supprimiert wird. Auch über den Zusammenbruch der peripheren Immuntoleranz durch den Verlust von Sirt1 wurde schon berichtet, weswegen hier die Rolle von IL-17 erkundet wird.

Abbildung 45 zeigt die IL-17-Produktion in den Überständen von Lungenzellen, die mit α CD3 und α CD28 stimuliert wurden. Der IL-17 Level in den OVA/OVA behandelten Tieren korreliert mit dem Th2-Profil (siehe Abb.43) Es ist ein signifikanter Unterschied in der IL-17 Freisetzung zwischen den OVA/OVA Sirt1 Δ und Sirt1 F Tieren zu detektieren. Der stärker ausgeprägte IL-17 Spiegel in Sirt1 Δ Mäusen deutet auf die fehlende Deacetylasefunktion in den T-Lymphozyten hin. Sogar in den Überständen der PBS/PBS Sirt1 Δ Mäusen ist eine leichte Sekretion von IL-17 zu beobachten.

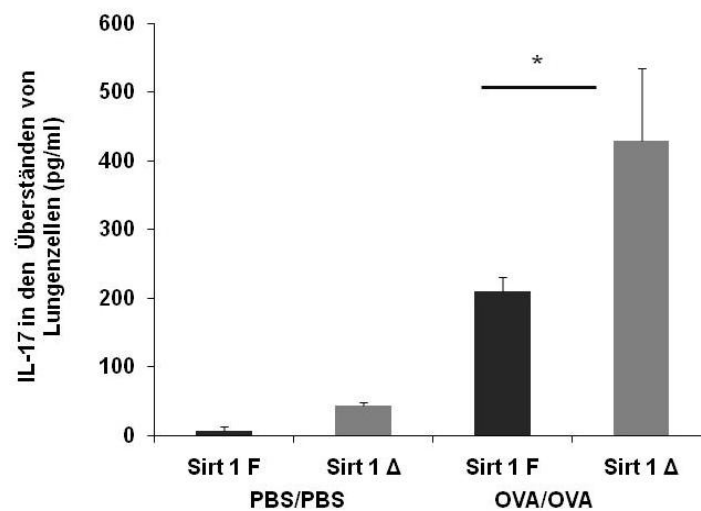


Abbildung 45: Bestimmung der IL-17 Konzentration in der Lunge von Sirt 1 Δ und Sirt 1 F Mäusen

Mittels ELISA wurde die Produktion von IL-17 in den Überständen primärer Lungenzellen, die aus behandelten OVA und PBS Sirt1 Δ und Sirt1 F Mäusen isoliert wurden, ermittelt. Die Zellen wurden mit anti-CD3 (10 μ g/ml) und anti-CD28 (2 μ g/ml) für 24 Stunden stimuliert. Mittelwerte \pm SD (n=4-5). Signifikanzniveau: * (P<0,05).

4 Diskussion

Asthma bronchiale manifestiert sich phänotypisch sehr unterschiedlich. Dies liegt an der Vielzahl von Mechanismen, die an dieser Erkrankung beteiligt sind. Es findet ein Zusammentreffen von angeborenem und erworbenem Immunsystem statt, welches physiologische und mechanische Veränderungen der Atemwege zur Folge hat. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich zum einen mit der Wirkung des Schwangerschaftshormons hCG in Asthma Bronchiale und zum anderen mit der Bedeutung der Sirt1-Deacetylase bei der Pathogenese dieser Erkrankung, die anhand von experimentellen Tiermodellen untersucht wurden.

4.1 HCG reduziert die bronchiale Hyperreaktivität

Die Hyperreaktivität des oberen und unteren Respirationstrakts ist ein wichtiger Indikator für die Schwere der Asthmaerkrankung. Aus diesem Grund wurde die Hyperreaktivität als erstes mittels zweier verschiedenen Messmethoden untersucht. In Anbetracht der mittels des Ganzkörperplethysmographen zuerst ermittelten Daten (Abb.12) wurde geringe Differenz in der Obstruktion der oberen Atemwege zwischen den OVA- und OVA-hCG-Gruppen festgestellt. Im Gegensatz dazu zeigten sich merkbare Unterschiede in der bronchialen Hyperreagibilität (Abb. 13), die mittels der invasiven Buxco-Methode gemessen wurde. Die OVA-Mäuse, welche mit 150U und 300U hCG behandelt wurden, wiesen eine reduzierte AHR nach Methacholinprovokation gegenüber der OVA-Gruppe auf. Bekanntlich zeigten sehr frühere humane Studien, dass Frauen gesteigerte Überempfindlichkeit der Atemwege gegenüber Männern aufweisen. Zu jener Zeit dokumentierten einige Forschungsgruppen die Verbindung zwischen dem Level der weiblichen Geschlechtshormone, dem Asthmaanfall und der Symptomatik, aber nicht mit der Obstruktion der Atemwege [254]. Jahre später bewiesen Dijkstra et. al, welche Rolle Estrogenrezeptor-Polymorphismen im Respirationstrakt spielen. Infolge der Mutationen wurde eine Abnahme der Lungenfunktion mit einer überschießenden bronchokonstriktorisches Antwort der Atemwege analysiert [255]. Diese Erkenntnisse wären mit einer Verringerung der weiblichen Hormone vergleichbar und eine

Estrogenerhöhung mit Aufheben oder Vermindern der Bronchokonstriktion. In Estrogenrezeptor defizienten-Mäuse beobachteten Carey et. al spontane Hyperreaktivität [256]. Mehats et. al zeigten den Relaxationseffekt des Schwangerschaftshormons hCG auf das Myometrium, das aus glatter Muskulatur besteht. Das Peptidhormon wirkt indem es die Menge der intrazellulären Calcium in der glatten Muskulatur senkt [178]. Zu diesem Zeitpunkt ist noch fraglich, ob es sich in diesem Modell um eine bronchodilatorische Eigenschaft von hCG handelt. Die aufgezeichnete Verringerung der Bronchokonstriktion in den OVA-hCG-Mäusen kann ebenfalls mit einem bestimmten Typ von Immunzellen in Korrelation stehen. Dies könnte einer der Gründe für die gering veränderte Empfindlichkeit der oberen Atemwege sein oder die Applikationsart. Bis zum heutigen Datum gibt es jedoch keine Berichte über die direkte Wirkung von hCG während der Schwangerschaft auf die Bronchien.

4.2 HCG hat keinen Effekt auf die Th2-vermittelte-Immunglobulinsekretion

Als nächstes wurde die Wirkung von hCG auf die humorale Immunantwort überprüft. Mittels ELISA wurde der Gesamt IgE-, sowie der OVA-spezifische IgE-, IgG1- und IgG2a-Titer bestimmt. In Anbetracht der Ergebnisse liesen sich keine Konzentrationsunterschiede zwischen der OVA-Gruppe und den zwei OVA-hCG-Gruppen ermitteln (Abb.14), was auf eine analoge asthmatische Reaktion in allen Modellen hinweist. Vor über 30 Jahre zeigten Christakos und Bahl, dass Gonadotropine exogenen Ursprungs über zwei verschiedene Bindungsstellen verfügen. Sie detektierten eine biologisch aktive Seite, die mit dem Rezeptor interagiert, und eine immunologisch wirksame Seite, bekannt als die Antigenbindungsstelle [257]. In Tierversuchen wurden erhöhte Immunglobulinwerte nach Zugabe exogenen Choriongonadotropins analysiert. Die Ergebnisse deuteten auf die neutralisierende Wirkung der Antikörper auf hCG, die seine Bioaktivität beeinflussten [258]. Da in dieser Studie der hCG-spezifische Antikörperlevel nicht gemessen wurde, lässt sich über eine potenzielle Inaktivierung des Peptidhormons in beiden OVA-hCG Modellen spekulieren. Um diese zu bestimmen, sollte eine hCG-

Therapie über eine längere Periode oder wiederholten Behandlungen durchgeführt werden. Laut der niedrigen Hyperreagibilität in den hCG behandelten Tieren wäre jedoch diese zu diesem frühen Zeitpunkt auszuschließen. Weiterhin zeigten Louvet et. al, dass die hCG-Immunität nicht immer mit der Produktion neutralisierender Antikörper verbunden sein muss. Zusätzlich wurde eine Immunglobulinbindung auf hCG nachgewiesen, welche dagegen die Hormonaktivität nicht beeinträchtigt. Diese Effekte lagen an der ausgewählten Peptidsequenz [259]. Des Weiteren bewiesen Fuchs et. al die immunsuppressive Wirkung von hCG auf T-Lymphozyten, die die polyklonale Immunglobulinsekretion mittels diversen B-Zellmitogenen dämpften [260]. Aufgrund des gleichen Immunglobulinlevels von IgE, IgG1 und IgG2a in den hier untersuchten Modellen lässt sich abschließen, dass hCG die Th2-vermittelte Antikörperproduktion weder positiv noch negativ moduliert.

4.3 HCG hat keinen Einfluss auf die Eosinophilie

Ferner wurden pathologische Gewebeveränderungen anhand von Paraffinschnitten untersucht. Die histologische Analyse zeigte nahezu keine Differenzen zwischen der OVA/OVA- und beiden OVA/hCG-Tiergruppen (Abb. 15). Diese Ergebnisse führten ebenfalls nicht zur Aufklärung der reduzierten AHR in den mit 150U und 300U hCG behandelten Mäusen. Da eine Differenzierung der Entzündungszellen mittels HE-Färbung nicht sehr aufschlußreich ist, wurden die Eosinophilie und die Ansammlung von CD4⁺ T-Zellen in der Lunge bestimmt. Das Ermitteln der Eosinophilenpopulation (Abb. 16), die als CD3⁺B220⁻GR-1^{int}CCR3^{high} charakterisiert wurde, führte ebenfalls nicht zur Erläuterung der schwächeren Bronchokonstruktion nach Metacholinprovokation in den OVA/hCG Tieren. In einem Allergendosismodell zeigten Bosnjak et. al, dass die Hyperreaktivität und die Eosinophilenakkumulation als unabhängige Vorgänge zu betrachten sind [261]. Zusätzlich stellte sich hier die Frage, ob eine höhere hCG-Konzentration oder längere Behandlungszeit mit den ausgewählten hCG-Dosen nicht zur Aufklärung beigetragen hätte. Eine andere Annahme wäre, dass hCG die Freisetzung einiger Mediatoren von inflammatorischen Zellen inhibiert und so die AHR-Antwort beeinflusst. Diese verstärkte sich nachdem die gleiche CD4⁺T-Zahl in den OVA/OVA und OVA/hCG-Mäusen gefunden wurde (Abb.19a). Außerdem konnten in Anbetracht der Aktivierungsmarker CD44 und

CD69 auf CD4⁺T-Zellen, die mittels FACS bestimmt wurden, keine eindeutigen Unterschiede in der Effektorzellzahl zwischen den asthmatischen und den Hormon behandelten asthmatischen Tiergruppen festgestellt werden (Abb.19b) Tamasi et. al dokumentierten signifikant erhöhte CD3⁺ Lymphozytenzahl in schwangeren im Gegensatz zu nicht-schwangeren Asthmatikerinnen. Sie fanden jedoch keine Differenzen zwischen schwangeren und nicht-schwangeren gesunden Probanden [262]. Allerdings exprimieren CD8⁺, $\gamma\delta$ - und NK-T-Zellen den CD3 Rezeptor, die in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden. Hinzu wurde in einer Vielzahl weiterer Publikationen über die unveränderte T-Zellzahl sowie Subpopulationen in PBMC von Schwangeren berichtet [263]. An der fetomaternalen Grenzschicht kommt es jedoch zur Induktion von CD4⁺ T-Zellen von Typ2 [263, 264]. Es wurde ebenfalls bewiesen, dass murine und humane Lymphozyten den LH/CG-Rezeptor exprimieren [204]. Die Expression des LH/CG-Rezeptors ist ein direkter Hinweis, dass hCG durchaus T-Zellen beeinflussen kann. In Hinsicht auf die geschilderten Daten betreffend die respiratorische Entzündung ist festzuhalten, dass hCG weder die Migration inflammatorischer Zellen noch die T-Zellproliferation fördert und somit die allergische Reaktion nicht verstärkt.

4.4 HCG beeinflusst die Immunantwort

Das in der Bronchoalveolarlavage analysierte Th2-Zytokinprofil gab eine Antwort über den akuten lokalen Immunität, der während des Zeitpunktes der AHR-Messung in der Lunge herrschte. Begutachtend Abbildung 17c fiel der niedrige Wert von IL-13 in den OVA-Mäusen auf, die zusätzlich mit dem Peptidhormon hCG zweier verschiedener Konzentrationen (150U und 300U) therapiert wurden. Diese Ergebnisse erklären womöglich die reduzierte Hyperreagibilität gemessen in den tiefen Atemwegen der OVA/hCG Mäuse im Vergleich zu den oberen Atemwegen. IL-13 ist das Zytokin, das die bronchiale Überempfindlichkeit induziert und modelliert. IL-13 kann die Calcium-Homöostase in glatten Muskelzellen, sowohl durch Calcium-abhängige und -unabhängige Wege, verändern und demzufolge die Kontraktilität bestimmen [66]. Zusätzlich löst IL-13 Hyperreaktivität durch den direkten Effekt auf respiratorische Epithelzellen aus [63]. Auf welche Weise die hCG-Applikation den IL-13 Level beeinflusst ist noch fraglich, insbesondere weil einige T-Zelltypen und Granulozyten dieses Zytokin produzieren. Ferner erklärte die gleiche gefundene

Konzentration von IL-4 und IL-5 in der BAL der OVA/OVA und OVA/hCG Mäusen (Abb. 17 a, b), wieso keine merklichen Unterschiede im Entzündungsgrad zu finden waren. IL-5 ist ein wichtiger Wachstums-, Migrations- und Lebensdauerfaktor für Eosinophile [265] und IL-4 führt nicht nur zur Th2-Differenzierung, sondern trägt ebenfalls zum Immunglobulinklassenwechsel und Synthese von IgE und IgG1 Antikörper bei [266].

Piccinni et. al demonstrierten, dass Progesteron Th-Lymphozyten zur IL-4 und IL-5 Produktion und Relaxin zur IFN- γ Sekretion fördern [267]. Die gleiche Arbeitsgruppe bewies allerdings, dass hCG keine Auswirkung auf die T-Zelldifferenzierung von Helfer T0-Zellen in Th1 oder Th2 Zellen hat [268]. Dies ist von entscheidender Bedeutung um eine asthmatische Reaktion nicht durch die hCG-Behandlung komplementär anzutreiben. So wurde zunächst die direkte Wirkung von hCG auf T-Zellen, die in der Lunge infolge der Allergenexposition infiltriert waren, analysiert. Gezielt wurden diese mit α CD3 und α CD3/hCG *in vitro* stimuliert und anschließend auf die gleichen Th2-Interleukine (IL-4, IL-5 und IL-13) in den Überständen untersucht. Die Daten wiesen ein gleichartiges Muster aller drei Zytokine (Abb. 18) auf. Es wurden leicht erhöhte Werte der Th2-Zytokine in den Überständen der OVA/hCG Mäuse im Gegensatz zu den OVA/OVA Mäuse gefunden, die auf eine stärkere Th2-Immunantwort hindeuteten. Suzuki et. al fanden allerdings einen Zusammenhang zwischen dem Th2-Zytokin- und hCG-Level im Laufe der Schwangerschaft heraus [269]. Selbst in Mausversuchen wurde viel früher über die Wichtigkeit der Th2-Zytokinproduktion an der fetomaternalen Grenzschicht berichtet [270]. Dagegen zeigte die *in vitro* Stimulation mit hCG keinen Effekt auf die Interleukinfreisetzung (Abb. 18). Daraus lässt sich schließen, dass unter diesen *in vitro* Bedingungen das Schwangerschaftshormon hCG die Th2-Zytokinproduktion nicht steigert, wie in allen Modellen dokumentiert wurde. Vergleichend die Zytokinwerte ermittelt in der BAL und den Überständen ist eine gewisse Diskrepanz zu finden. Das lässt die Behauptung aufstellen, dass für die Unstimmigkeiten im Zytokinprofil andere Zelltypen verantwortlich sind.

4.5 Die Wirkung von hCG auf Makrophagen

Die angeborene Immunität ist unspezifisch und erkennt Strukturen, die für Krankheitserreger typisch sind und kann auf diese Weise körperfremde und körpereigene Strukturen grob differenzieren. Eine sehr wichtige Aufgabe des angeborenen Immunsystems besteht jedoch in der Induktion des erworbenen Immunsystems. Makrophagen gehören zum angeborenen Immunsystem und stellen in der Lunge eine primäre Barriere zur Absorption verschiedener Makromoleküle dar [127]. Ferner bestimmt das umgebende Milieu im Respirationstrakt die Plastizität von Makrophagen und demzufolge ihrer Funktionalität [137]. Demzufolge wurden die Makrophagen in der Lunge immunhistologisch untersucht. Hierfür wurde der Reifungsmarker F4/80, der konstitutiv auf der Oberfläche von Makrophagen exprimiert wird, ausgewählt. Es wurde eine signifikant niedrigere Infiltration von F4/80⁺ Zellen in den Lungen der Tiere, welche mit 300U hCG therapiert wurden, im Gegensatz zu der OVA/OVA Tiergruppe analysiert (Abb. 20). Die Mäuse, die 150U hCG intranasal bekamen, zeigten ebenfalls eine reduzierte F4/80 Zellzahl. Untersuchungsberichte über F4/80 wiesen auf eine Herunterregulation auf Makrophagen hin nachdem sie aktiviert wurden [271]. So stellte sich die Frage, inwiefern die Erkennung und Aufnahme von hCG mittels Makrophagen den Phänotyp und ihre Migrationsfähigkeiten beeinflusst. An dieser Stelle wäre eine Doppelfärbung für F4/80 und CD11b optional gewesen, da die Expression des CD11b Rezeptors infolge einer Zellaktivierung unverändert bleibt oder sich erhöht, aber nicht herunterreguliert wird [272]. Da CD11b auch auf bestimmten CD8 und B-Zellpopulationen, sowie NK-Zellen, die im Lungengewebe zu finden sind, exprimiert wird [246], wäre eine CD11b Einzelfärbung ebenfalls nicht aufschlußreich gewesen. Lombry et. al führten Studien über die pulmonare Bioverfügbarkeit einiger wichtigen Stoffe durch. Sie dokumentierten eine systemische Resorption von hCG nach Makrophageneliminierung in der Lunge. Fernerhin zeigte die Arbeitsgruppe, dass alveolare Makrophagen nach intratrachealer Verabreichung das Peptidhormon aufnehmen [127]. Experimente von Pouliot et. al bewiesen, wie ausschlaggebend das umgebende Milieu für das Makrophagenverhalten bezogen auf die Induktion oder Repression der bronchialen Hyperreagibilität ist [273]. Außerdem können alveolare Makrophagen sowohl Th1- als auch Th2-Zytokine produzieren und somit die Asthma Erkrankung modulieren [274].

Folglich wurde anhand von *in vitro* Experimenten die Wirkung von hCG auf die Funktionalität der Makrophagen untersucht. Vorerst wurden Knochenmarkzellen isoliert, die dann unter den schon angegebenen Bedingungen (siehe: 2.3.12) zu Makrophagen differenziert wurden. In Abbildung 21 sind die mikroskopischen Aufnahmen der Makrophagen dargestellt, die durch die Oberflächenmarker F4/80 und CD11b charakterisiert wurden. Diese ausdifferenzierten Makrophagen wurden weiter unter den Konditionen, beschrieben im Kapitel 2.3.13, stimuliert und anschließend analysiert.

4.6 HCG fördert die Expression von Aktivierungsmolekülen auf Makrophagen

Inwiefern das Schwangerschaftshormon hCG die Aktivierung von Makrophagen beeinflusst wurde in diesem Abschnitt untersucht. Wan et. al zeigten, dass hCG die Leistung der angeborenen Immunität durch die von Makrophagen freigesetzten Zytokine steigert. Allerdings konnten sie keinen hCG Effekt auf die Expression von CD11b, MHC-II und CD40 auf Makrophagen, die mit IFN- γ vorbehandelt waren, feststellen [180]. Sie berichteten jedoch nie über die alleinige Wirkung von hCG auf unbehandelte Makrophagen. Begutachtend Abbildung 22/23 zeigten die Makrophagen, die ausschließlich mit hCG behandelt wurden, eine circa 2,5fach erhöhte CD11b Expression nach 24 und 48 Stunden gegenüber unbehandelten Makrophagen und circa eine 1,5fach höhere CD11b Expression im Gegensatz zu OVA-stimulierten Makrophagen. CD11b bildet zusammen mit CD18 den Mac-1 Rezeptor, der *in vivo* zu einer starken Adhäsion zwischen Leukozyten und Endothelzellen und einer späteren Extravasion führt [275]. Ob hCG-behandelte Makrophagen eine gesteigerte Migration aufweisen, ist zu diesem Zeitpunkt noch fraglich. Zu diesem Zweck sollten Migrationsstudien durchgeführt werden. Ruhende Makrophagen besitzen auf ihrer Oberfläche wenige oder keine MHC-Klasse-II-Moleküle [275], wie ebenfalls im Histogramm zu erkennen ist (Abb. 24). Durch die Detektion des MHC-II-Moleküls auf den Makrophagen, stimuliert mit dem Peptidhormon hCG, lässt sich die Vermutung über eine potentielle Aktivierung von Immunzellen erstellen. In einer weiteren Publikation über Dendritische Zellen dokumentierten Wan et. al, dass hCG die MHC-II Expression beeinträchtigt [184]. In

der vorliegenden *in vitro* Studie wurde bestätigt, dass hCG keinen ähnlichen Effekt im Bezug auf die Expression von MHC-II in Makrophagen hat. Dagegen zeigte hCG einen Einfluss auf die CD40 Expression. CD40 gehört zur Familie der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren (TNFR) und ist wesentlich an der Auslösung einer Immunantwort beteiligt. Er erzeugt Aktivierungssignale, die diverse zelluläre Immunantworten, wie Proliferation, Differenzierung, aber auch Wachstumshemmung und Zelltod, regulieren [276]. In Anbetracht der hier erzeugten Daten (Abb. 22) wurde 24 Stunden später auf hCG-stimulierten Makrophagen CD40 Expression nachgewiesen, die nach weiteren 24 Stunden eine ca. 3,5fach erhöhte Expression aufwies. Im Gegensatz dazu wurde keine CD40 Expression weder 24 noch 48 Stunden später auf den Makrophagen, die mit Ovalbumin stimuliert wurden, nachgewiesen. Tang et. al gaben den Hinweis über die suppressorische Wirkung von CD40, der auf alveolaren Makrophagen exprimiert ist, in Kontakt mit Th2-Zellen. In athopischen asthmatischen verglichen mit athopischen nicht-asthmatischen Patienten wurde eine signifikant erniedrigte Expression von CD40 auf alveolaren Makrophagen gefunden. Einige *in vitro* Untersuchungen bestätigten, dass eine Blockade, bzw niedrige Expression von CD40 auf Makrophagen Asthma bronchiale begünstigt [277]. Im Hinblick auf die Histogramme in Abbildung 22 ist zu erkennen, dass das hCG-Hormon zur CD40 Hochregulation in den OVA-behandelten Makrophagen beiträgt und zwar im gleichen Ausmass, wie in den allein mit hCG stimulierten Zellen zu detektieren ist. Beachtlich sind die Ergebnisse, die in der hCG-LPS Zellkultur nachzuweisen sind. Sie zeigten, dass hCG die Expression von CD40 (siehe: 24 Stundenwert) in LPS-stimulierten Makrophagen herunterreguliert. Dabei ist über die nachgewiesene starke Gentranskription und Expression von CD40 auf Makrophagen mittels LPS hinzuweisen [278]. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Schwangerschaftshormon hCG einen viel größeren Einfluss auf die Regulation von CD40 in Makrophagen als LPS ausübt. Die kostimulatorischen Moleküle CD80/B7.1 und CD86/B7.2, die ebenfalls eine essentielle Rolle in der Differenzierung von Th0 zu einem Th1- und Th2-Phänotyp spielen [279], wurden ebenfalls untersucht. Beide Moleküle arbeiten komplementär, aber es wird vermutet, dass CD86 verglichen mit CD80 die Th2-Immunantwort stärker unterstützt. Allerdings wurde eine sehr schnelle Expression von CD86 und eine verspätete Expression von CD80 auf APC nach Stimulation nachgewiesen, die mit einer Früh- und Spätaktivierung des

Immunsystems in Verbindung gebracht wird [280, 281]. Die FACS-Ergebnisse (Abb. 23) weisen auf eine sehr niedrige CD86 Expression nach 24 Stunden, die nach 48 Stunden nicht mehr zu detektieren ist. Gleichzeitig ist eine mediäre CD80 Expression auf den hCG behandelten Makrophagen zu finden, die sich nach 48 Stunden verdoppelt. Im Gegensatz dazu wurde weder nach 24 noch nach 48 Stunden eine CD86 Expression auf den LPS-stimulierten Makrophagen detektiert. Zusätzlich wurde die höchste CD80 Rezeptordichte bei dem 24 Stundenwert, der um die Hälfte nach 48 Stunden später abfällt, gefunden. Vergleicht man die Expression von CD80 und CD86 unter den OVA-Konditionen sind keine große Unterschiede zwischen den 24 und 48 Stundenwerten zu finden (Abb. 23). Aus den FACS Daten ist zu entnehmen, dass hCG einen sehr späten CD80 Regulator (Peak-48 Stundenwert) darstellt. Fernerhin ist schwer zu beurteilen, ob hCG nur sehr schwach die CD86 Expression fördert oder nicht. Aus diesem Grund sollte dieser Oberflächenmarker zu einem viel früheren Zeitpunkt (6 Stundenwert) untersucht werden. Dies wäre aufschlußreich, besonders weil in murinen *in vivo* Versuchen eine reduzierte AHR nach CD86 Antisenseoligonukleotidbehandlung analysiert wurde [282].

Die phänotypischen Veränderungen, welche infolge der hCG-Stimulation in der Zellkultur gefunden wurden, die sich von den LPS oder OVA behandelten Makrophagen unterschieden, tragen zur Annahme bei, dass die hCG-stimulierten Makrophagen womöglich *in vivo* das Immunsystem anders lenken. Vorerst sollten jedoch *in vitro* Studien in Kokultur durchgeführt werden. Zum Einen, weil die Expression von CD80 und CD86 auf Makrophagen durch die CD28 bzw. CTLA-4 Interaktion auf T-Zellen beeinflusst wird und zum Anderen, weil die gegenseitigen Signale, die beiden Zelltypen in ihrem Verhalten beeinflussen. Weiterhin weil die Interaktion von CD40 auf Makrophagen mit CD154 auf T-Zellen ebenfalls auf die Expression dieser kostimulatorischen Moleküle einwirkt. Ferner wird die zellvermittelte Immunantwort moduliert [283].

4.7 HCG hat einen starken Einfluss auf die Aktinpolymerisierung

Eine Zellaktivierung und Zelldifferenzierung geht mit einer aktiven Verformung der Zelle daher, die über intrazelluläre variable Elemente des Zytoskeletts, wie Aktin, Mikrotubuli und Intermediärfilamente, ermöglicht wird. Man spricht von Zellplastizität, die für Makrophagen charakteristisch ist. Diese wurde durch die verschiedenen Substanzen, hCG, OVA und LPS, stark und unterschiedlich beeinflusst, wie die konfokalmikroskopischen Aufnahmen zeigen (Abb. 25-28). Es ist bekannt, dass LPS sowie IFN- γ das klassisch aktivierte Makrophagenprofil (M Φ 1) induzieren. Demgegenüber steht das alternativ aktivierte Makrophagenprofil (M Φ 2) unter dem Einfluss der Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 [138]. Ein mittels IL-4 polarisierter Makrophage (M Φ 2) ist durch seine gestreckte längliche Struktur gekennzeichnet. Und ein Typ1 Makrophage (M Φ 1) scheint abgeflacht und rundlich zu sein [284]. Betrachtet man die OVA-behandelten Makrophagen in diesem *in vitro* Modell (Abb. 27) lässt sich die gleiche gestreckte und lange Zellstruktur erkennen, die für die alternativ aktivierten Makrophagen (M Φ 2) typisch ist. Diese Zellmorphologie spricht für die Beweglichkeit der Makrophagen. Eine Zellwanderung erfolgt durch das Zusammenspiel dieser zweier Zellausstülpungen an den Vorderseiten der Makrophagenzelle sowie der meist rückwärts gerichteten Stressfilamente [285, 286]. Die von Vereyken et. al durchgeführten Migrations- und Mortalitätsstudien bestätigten, dass Typ2 Makrophagen (M Φ 2) beweglicher und migrationsfähiger im Vergleich zu Typ1 Makrophagen (M Φ 1) sind [284]. Ferner wurde eine Aktinanreicherung in diesen Zellausstülpungen und zum Teil auch am Zellrand detektiert, die die Bewegungsrichtung angibt. Im Gegensatz dazu ist bei den LPS-stimulierten Makrophagen nach 8 Stunden keine gerichtete Aktinpolymerisierung zu beobachten, sondern eine Anlagerung von F-Aktin nahe des Zellkerns (Abb. 28). Allerdings wurde 24 Stunden später eine Aktinreorganisation beobachtet, die von einer starken Ausprägung dornförmiger Filopodien begleitet war. Williams et. al zeigten, dass LPS nicht nur den Aktinumbau in Monozyten und Makrophagen, sondern auch die Adhäsion und das Zellspreiten fördert. Diese sind in einem *in vivo* System sowohl für die Transmigration über Endothelialzellen als auch zur Rekrutierung von Makrophagen am Ort der Entzündung von großer Wichtigkeit [287]. Einen anderen morphologischen Charakter zeigten die hCG-behandelten Makrophagen (Abb. 25-26). Sie weisen weder ein klassisch noch ein alternativ aktiviertes Makrophagenprofil

auf. In den mikroskopischen Aufnahmen sind die Aktinfilamente um und nahe dem Zellkern verteilt, die die Mikrotubuli bedecken. Zur Zeit ist noch fraglich, ob es sich um eine strukturelle oder regulatorische Interaktion zwischen Aktin und Tubulin oder eine zeitliche Überlappung handelt. Im Hinblick auf Abbildung 25 und 26 lässt sich die Vermutung erstellen, dass das hCG-Hormon einen starken Einfluss auf die Aktinpolymerisierung hat. Die Organisation und das Verhalten der Aktinfilamente wird von einer Vielzahl Aktin bindender Proteine bestimmt. Sie wirken auf den Auf- und Abbau der Filamente, sowie auf ihre physikalischen Eigenschaften und Wechselwirkungen untereinander und mit anderen Zellorganellen [286]. Um eine Antwort über diese Aktinmodulation infolge der hCG-Behandlung zu bekommen, wären Untersuchungen an einigen der kleinen GTPasen, wie Rho, Rac, Cdc42 von Interesse. Diese regulieren die Organisation und den Umbau des Aktinzytoskeletts, die Zellmigration und Zelladhäsion [284, 288]. Zusätzlich stellt sich die Frage, ob es sich bei den Makrophagen, welche mit 300U hCG stimuliert wurden, um die Bildung von dorsalen „Ruffles“, die mit Makropinozytose in Verbindung stehen, handelt.

4.8 HCG induziert die Synthese und Produktion von IL-10 in Makrophagen

IL-10 ist durch seine immunregulatorische Rolle nicht nur im erworbenen sondern auch im angeborenen Immunsystem bekannt, wie Siewe et. al *in vivo* demonstrierten [289]. Des Weiteren werden dem Schwangerschaftshormon hCG sowie IL-10 immunsuppressorische Eigenschaften zugeschrieben. In der vorliegenden *in vitro* Untersuchung konnte gezeigt werden, dass hCG die IL-10 Produktion in Makrophagen steuern kann (Abb. 29). Da die Aktivierung der Erk und NF- κ B Signalwege in Makrophagen, die Synthese und Freisetzung von IL-10 auslösen [247], wurden diese untersucht. Die kinetische Analyse ergab einen ausgesprochen starken Phosphorylierungsgrad der Signalwegsmolekülen Erk1/2 nach 30 minütiger Stimulation mit hCG, der anschließend (1h, 2h, 4h und 8h) abnahm (Abb. 30). Ein Transkriptionsfaktor, der am IL-10 Promotor bindet und die Transkription induziert, ist der ubiquitär exprimierte Aktivator Creb. Die Aktivität von Creb kann durch Phosphorylierung mittels spezifischer Kinasen verändert werden [247]. Wie die Westernblot Daten zeigten, wurde nach halbstündiger Behandlung mit hCG eine rapide Phosphorylierung dieses TFs ermittelt (Abb. 30). Creb wird durch die Mitogen-

und Stress- aktivierten Proteinkinasen MSK1 und MSK2 phosphoryliert, die wiederum von Erk1/2 aktiviert werden [290]. Creb kann jedoch direkt von Erk1/2 phosphoryliert werden [291]. Deswegen stellte sich die Frage, ob es sich bei der Phosphorylierung von Erk1/2 und Creb um ein simultanes zeitliches Muster handelt. Dies muss noch überprüft werden, indem die hCG Behandlung zu einem früheren Zeitpunkt ermittelt wird. Zusätzlich wäre das Untersuchen der Kinasen MSK1 und MSK2 von Interesse, um die von hCG induzierten Signalkaskaden zum Teil vervollständigen zu können. Fernerhin wurde nach 30 Minuten ebenfalls eine Phosphorylierung von NF- κ B (p65) nach hCG Stimulation beobachtet, die allerdings nicht so stark ausgeprägt war. Dies könnte damit erklärt werden, dass NF- κ B schon funktionsbereit im Zytoplasma zu finden ist und die optionale Zeit für eine starke Phosphorylierung dieses Molekül bei 15 Minuten liegt. Saraiva et. al demonstrierten in murinen und humanen Makrophagen, dass die NF- κ B Untereinheit p65 an einem konservierten Sequenzmotiv (NF- κ B-binding motif) im IL-10 Promotorbereich bindet und die IL-10 Expression verstärkt [146]. An dieser Stelle wäre eine Chromatin-Immunpräzipitation sehr aufklärerisch gewesen. Die hier analysierten Signalmoleküle, involviert in der IL-10 Expression in Makrophagen, wurden allerdings bis jetzt durch die Stimulation einiger TLRs, wie TLR2, TLR3, TLR4 und TLR9, die Strukturen und Moleküle von Pilzen, Bakterien und Viren erkennen und binden, erforscht [247]. Die schnelle Aktivierung von Erk1/2, NF- κ B und Creb deutete auf eine rezeptorvermittelte Erkennung. Anhand von Oberflächenfärbungen für den LHCG-Rezeptor (Abb. 32) konnte nachgewiesen werden, dass murine Makrophagen den Rezeptor exprimieren.

4.9 Sirt1 hat keinen Einfluss auf die Entwicklung von CD4⁺T-Zellen

Veröffentlichungen zeigten die essentielle Rolle von Sirt1 in zahlreichen Entwicklungsprozessen. Der komplette Verlust dieses Sirtuins führt zu schweren embryonalen Fehlentwicklungen, wie z.B. sporadische Enzephalitis, Herzfehler, retinale Anomalitäten, Knochen-, Lungen- und Pankreasdefekte, und infolgedessen zu perinataler oder früher postnataler Sterblichkeit [292]. Die Wichtigkeit seiner Expression wurde nicht nur im embryonalen sondern auch in adulten Geweben beobachtet. Um die individuelle Funktion von Sirt1 in Asthma bronchiale zu

untersuchen, wurde in der vorliegenden Studie eine konditionale Mutagenese in einem Mausstamm erzielt, wie Abb. 33 verdeutlicht. Cheng et al. belegten zum ersten Mal im Jahr 2003 einen signifikant erhöhten Sirt1-Level in CD4⁺ CD8⁺ Thymozyten. Des Weiteren stellten sie in Sirt1-defizienten Mäusen (Sirt1^{Δex4/Δex4}), die durch das Ausknocken von Exon 4 ein Protein mit gestörter Deacetylasefunktion produzieren, eine normale Thymozytenzellzahl fest [293]. Um sicher zu stellen, dass die Expression des beeinträchtigten Sirt1 Proteins in Sirt1^{F/F}CD4^{Cre/+}Mäuse, sowie das Einfügen der Flox-Sequenzen in Sirt1^{F/F} Mäusen, keinen negativen Einfluss auf die Entwicklung der Lymphozyten in Thymus und Milz naiver Mäuse hat, wurden zunächst diese Organe untersucht. Gleichzeitig konnten spätere Fehlinterpretationen bei dem murinen OVA-Modell ausgeschlossen werden. Die Analyse der Thymozytenpopulation zeigte keine Anomalien in der Zahl doppelt positiver und einzelpositiver Zellen (Abb. 34) zwischen beiden Mutanten. Weiter wurden im peripheren lymphatischen Gewebe, wie die Milz, keine Differenzen in der Expression von CD4 und CD8 auf reifen T-Zellen (Abb. 35), als auch in der Population regulatorischer (CD4⁺CD25⁺Foxp3) (Abb. 36) und naiver (CD4⁺CD62L⁺) Lymphozyten (Abb. 37) festgestellt. Aus diesen Untersuchungen kann abgeleitet werden, dass Sirt1 nicht an der Entwicklung von T-Zellen beteiligt ist. Zusätzlich wurde auch diese durch das eingebaute Konstrukt nicht gestört.

4.10 Sirt1 besitzt eine antiinflammatorische Wirkung in einem Mausmodell des Asthma bronchiale

Laut Literaturquellen wurde der Atemwegswiderstand von Sirt1^{F/F}CD4^{Cre/+}Mäusen bis dato nicht bestimmt. Allerdings wurde die Rolle einer anderen Histon-Deacetylase, HDAC-1, in einem allergischen Asthma-Modell untersucht Grausenburger et. al dokumentierten in HDAC1^{F/F}CD4^{Cre/+} im Vergleich zu HDAC1^{F/F} Tieren gesteigerte bronchiale Hyperreagibilität, die auf eine verstärkte Mukusproduktion und Infiltration von Entzündungszellen in der Lunge zurückzuführen war [253]. Zum Nachweis, ob und in wie fern mit Allergenen sensibilisierte und provozierte Sirt1^{F/F}CD4^{Cre/+} Tiere überempfindliche Atemwege aufweisen, diente eine Lungenfunktionsmessung zur Aufklärung. Eine eindeutige bronchokonstriktorische Reaktion infolge der Methacholinprovokation konnte in den Sirt1^{F/F}CD4^{Cre/+} Mäusen hervorgerufen werden (Abb. 38), die wie in den später ermittelten Daten in Korrelation mit der vermehrten

Mukussekretion und erhöhten IL-13 Produktion steht. Hingegen stehen die Ergebnisse von Lee et. al in Widerspruch zu diesen, die auf eine verminderte Hyperreagibilität in Folge einer Sirtinolbehandlung hinweisen. Da aber Sirtinol, ein Bekannter Sirt-1 Inhibitor, intraperitoneal verabreicht wurde, stellt sich die Frage über seine Spezifität und demzufolge über seine vielfältige Wirkung auf alle Zellen die Sirt1 exprimieren [227]. Unterstützung fanden diese Daten bei Aichet. al, die ebenfalls ein murines Ovalbumin-Modell verwendet haben. Sie konnten zeigen, dass die Aktivierung von Sirt1 eine suppressorische Wirkung auf die ausgelöste asthmatische Immunantwort hat, was sich auch in der reduzierten bronchialen Hyperreaktivität widerspiegelte [294]. Daraus ist zu schließen, dass bei einer Störung in der katalytischen Aktivität oder einer Herunterregulation von Sirt1 ein entgegengesetzter Effekt zu erwarten wäre.

Weiter wurde die Wichtigkeit von Sirt1 in der ausgelösten humoralen Immunantwort, infolge der T-B-Zellinteraktion in diesem OVA-Modell, geprüft. Es wurden signifikante Unterschiede in der Synthese von IgE, verbunden mit der Aktivierung und Proliferation einer größeren Anzahl von B-Lymphozyten [87], zwischen den Sirt1^{F/F}CD4^{Cre/+} und Sirt1^{F/F} Mäusen analysiert. Die hohen IgE Werte in den Sirt1^{F/F}CD4^{Cre/+} Mäusen deuten auf eine verstärkte IL-4 und IL-13 Sekretion in diesen Tieren (Abb. 39a/b) hin. Eine allergische Reaktion ist zusätzlich mit einer vermehrten Produktion von IgG1 Antikörper charakterisiert, die jedoch IL-4 konzentrationsabhängig ist [88], wie im Serum der Sirt1^{F/F}CD4^{Cre/+} Tiere durch die deutliche Verringerung dieses Antikörpers bestätigt wurde (Abb. 39c). Zusätzlich wurde die Th1-Antwort mittels der IgG2b-Titerbestimmung nachgewiesen, die in den Sirt1^{F/F} im Gegensatz zu den Sirt1^{F/F}CD4^{Cre/+} eine signifikante Erhöhung aufwies (Abb. 39d). Das Gesamtbild ermittelter Immunoglobuline deutet auf eine deutlich stärkere allergische Reaktion in den Sirt1^{F/F}CD4^{Cre/+} vergleichbar zu den Wildtypen.

Asthma bronchiale ist charakterisiert durch diverse Atemwegsveränderungen, die sich symptomatisch in Form von Atembeschwerden bemerkbar machen und in verschiedene Schweregrade eingeteilt werden. Zu diesen strukturellen Modifikationen im Respirationstrakt gehören epithelialer Zellverlust, Verdickung der Basalmembran, subepitheliale Fibrose, Goblet-Zell-Hyperplasie, Hypertrophie der glatten Muskulatur, Angiogenese usw. Diese Veränderungen sind die Folgen eines

inflammatorischen Prozesses, indem verschiedene Zelltypen wie z.B. T-Zellen, Eosinophile, Neutrophile und Mastzellen involviert sind [252, 295]. Die hier ausgeführten histologischen Methoden trugen zur Aufklärung der Entzündungsstärke in den zu untersuchenden konditionellen Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen bei. So wurde mittels HE-Färbung ein stärkerer Influx verschiedenartiger Leukozyten in der Lunge von $Sirt1^{F/F}CD4^{Cre/+}$ Mäusen analysiert (Abb. 41). Aichet. al berichteten, dass die Behandlung von OVA-Mäusen mit dem Sirt1 Aktivator, Resveratrol, die Infiltration von Entzündungszellen im Respirationstrakt inhibiert [294]. Des Weiteren beobachteten Ichikawa T. et. al die gleiche Wirkung von Sirt1 Aktivator, SRT1720, auf die Zellmigration in einem ähnlichen murinen Modell [296]. Diese Forschungsergebnisse verstärken die in dieser Arbeit ermittelten Resultate, in Bezug auf die Wichtigkeit eines normal funktionierenden Sirt1 Proteins in $CD4^+$ T-Zellen. Ferner wurde in humanen Studien ein signifikant verminderter Sirt1 Level im Lungengewebe von COPD-Patienten mit einer erhöhten Atemwegsinfammation, infolge der nicht erfolgten Deacetylierung von RelA/p65 NF- κ B, beschrieben [226]. Für eine weitere Differenzierung der Entzündungszellen in der Lunge wurden Cytospinpräparate hergestellt. Allerdings wurden sehr geringe Differenzen (circa 5,3 %) in der Eosinophilifiltrate zwischen den $Sirt1^{F/F}CD4^{Cre/+}$ und $Sirt1^{F/F}$ Mäusen gefunden (Abb. 40). Außerdem wurde die gleiche Makrophagenzahl bestimmt. Diese Daten erklären wieso trotz der gestiegenen Migration inflammatorischer Zellen in der Lunge von $Sirt1^{F/F}CD4^{Cre/+}$ Mäusen keine signifikanten Unterschiede in den HE-Schnitten zu den $Sirt1^{F/F}$ Tieren beobachtet wurden. Dagegen spricht aber die ausgeprägte bronchiale Hyperreagibilität und die später gemessene IL-5 Produktion in den $Sirt1^{F/F}CD4^{Cre/+}$ Mäusen. Angesichts dieser wäre in den $Sirt1^{F/F}CD4^{Cre/+}$ Tieren eine deutlich stärkere Rekrutierung eosinophiler Granulozyten zu erwarten. Da eine sehr starke Vermehrung der schleimproduzierenden Becherzellen und die zusätzliche Schädigung von Epithelzellen ebenfalls mit Obstruktion der Atemwege zusammenhängen können, wurde eine PAS-Färbung auf Lungenschnitten durchgeführt. Diese zeigte eine signifikant starke Goblet-Zell-Hyperplasie in den $Sirt1^{F/F}CD4^{Cre/+}$ im Gegensatz zu den $Sirt1^{F/F}$ Mäusen (Abb. 42), die einen direkten Hinweis auf die erhöhte Mukushypersekretion in den konditionellen Tieren gab.

4.11 Sirt1 hemmt die T-Zell-Aktivierung

Weiter konnte nachgewiesen werden, dass Sirt1 die Th2-Immunantwort reguliert. Dies wurde durch die Bestimmung der klassischen Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 in den Überständen von stimulierten T-Zellen ermittelt. In der Lunge asthmatischer Sirt1^{F/F}CD4^{Cre/+} Mäuse wurden signifikant erhöhte Werte aller drei Zytokine im Gegensatz zu den Sirt1^{F/F}Mäusen gefunden (Abb. 43). Die T-Zelldifferenzierung wird durch diverse Faktoren, welche Einfluss auf die DNA-Methylierung, Histonmodifikationen und Dnase1 Sensitivität haben, kontrolliert [29]. Grausenburger et. al. zeigten in HDAC1^{F/F}CD4^{Cre/+} Mäusen ebenfalls einen verstärkten Th2-Level. Zusätzlich demonstrierten sie, dass HDAC-1 an einigen *cis*-regulatorischen Elementen im Th2-Genlokus von unstimulierten CD4⁺ T-Zellen bindet [253]. Die Acetylierung von Transkriptionsfaktoren korreliert mit der Genaktivierung. Und Yamagata et. al. berichteten über die Acetylierung von GATA-3 mittels des Transkriptions-Coaktivator p300, welcher über eine intrinsische Acetyltransferaseaktivität verfügt [297]. Es wurde bewiesen, dass dieses Protein (p300) nicht nur mit GATA-3 sondern mit allen drei RNA-Polymerasen, NF- κ B, CREB, sowie mit weiteren Transkriptionsfaktoren in Form von Komplexen interagiert und sie demzufolge reguliert [298]. Andererseits dokumentierten Kong et. al. die Komplexbildung von Sirt1, p300 und NF- κ B im Zusammenhang mit der Suppression der T-Zellaktivierung. NF- κ B ist ein endogenes Substrat von Sirt1 und p300.[299]. GATA-3 ist der bekannte Transkriptionsfaktor, der nicht nur für die Polarisierung von Th0 zu Th2-Zellen, sondern auch für das weitere Differenzieren und Überleben von Th2-Zellen essentiell ist [300-302].

Aufgrund noch fehlender Forschungsergebnisse in dieser Studie bleiben nur die Spekulationen, wie Sirt1 die Th2-Immunantwort auf epigenetischer Ebene reguliert. Eine der Hypothesen wäre, dass Sirt1 GATA-3 deacetyliert. Die Gene für die Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 sind in einem Gencluster organisiert, sodass eine direkte Interaktion der Deacetylase Sirt1 mit dem Th2-Lokus eine weitere Möglichkeit darstellt.

Ferner wurde die Produktion des typischen Th1-Zytokins IFN- γ in diesem Modell untersucht. Allerdings wurde keine Differenz in der IFN- γ -Freisetzung zwischen den

Sirt1^{F/F}CD4^{Cre/+} und Sirt1^{F/F}Mäusen analysiert, die wahrscheinlich auf die Stimulation der Gesamtzellpopulation zurückzuführen ist (Abb. 44). Th1-Zellen sind nicht die einzige IFN- γ Quelle. Im Vergleich zu den Th2-Zytokinen, die ausschließlich von CD4⁺T-Zellen sezerniert werden. Wie die signifikant erzielten Ergebnisse zeigen, sind sie ebenfalls in den Überständen von Gesamtlungenzellen leicht nachzuweisen. IFN- γ wird außerdem vermehrt von CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen, aber auch von $\gamma\delta$ -T-Zellen, NK T-Zellen, Makrophagen und einigen weiteren Immunzellen sezerniert [94, 96]. In Betracht dieser Daten lässt sich die Vermutung aufstellen, dass der gleichwertige IFN- γ Level nicht mit den geringen Eosinophilienunterschieden im Zusammenhang steht. Lamkhioed et. al zeigten, dass IFN- γ die Expression von CCR3 herunterreguliert und demzufolge die Aktivierung, Differenzierung und Ansammlung von eosinophilen Granulozyten beeinflusst [99]. Widerum stellte sich hier die Frage, ob Sirt1 die IFN- γ Produktion reguliert. Andere murine Krankheitsmodelle sprechen dagegen. Zum Beispiel Li et. al und Xia et. Al, die von der suppressorischen Wirkung von IFN- γ auf Sirt1 auf Transkriptionsebene berichteten [303, 304].

Einige Studien demonstrierten, dass Sirt1 den Transkriptionsfaktor STAT-3 deacetyliert, folglich herunterreguliert und die Expression von IL-22 reduziert [305, 306]. STAT-3 reguliert seinerseits die Expression von ROR γ t, der die IL-17 Produktion induziert [307]. Im Laufe der letzten Jahre wurden immer wieder erhöhte IL-17 Werte in Patienten, die an einem schwergradigen Asthma leiden, detektiert [114, 308]. Aus diesen Gründen wurde dieses proinflammatorische Zytokin in den Zellkulturüberständen isolierter Mauslungen gemessen. Die Resultate ergaben eine signifikante Erhöhung von IL-17 in den asthmatischen Sirt1^{F/F}CD4^{Cre/+} gegenüber den Sirt1^{F/F} Mäusen. Sie sind gleichzeitig ein Indiz, dass die Sirt1 Dysfunktion die Th17-Immunantwort neben der Th2-Antwort negativ reguliert.

4.12 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal die Rolle des Schwangerschaftshormons hCG in einem murinen Asthmodell untersucht. Im Vordergrund wurde die Frage über die Interaktion des hCG Hormons mit Zellen des Immunsystems gestellt. Vorerst fand allerdings Beachtung die reduzierte bronchiale Hyperreagibilität infolge der hCG Therapie in den OVA behandelten Mäusen. Diese Daten fanden Unterstützung in den verminderten IL-13 Werten, die in der Bronchoalveolarlavage der OVA/hCG Mäusen analysiert wurden. Hingegen zeigte hCG keinen Effekt auf die Migration eosinophiler Granulozyten in die Lunge. Ferner wurde bewiesen, dass hCG die humorale Immunantwort, repräsentiert durch die IgE, IgG1 und IgG2a Immunglobulinproduktion, nicht moduliert. Das Th2-Zytokinprofil, das in den Überständen bestimmt wurde, lässt die Vermutung entstehen, dass hCG die Th2-Synthese beeinflusst, jedoch nicht *in vitro*. Wiederum zeigte hCG keine Wirkung auf die CD4⁺ T-Zellzahl und deren Aktivierungsmuster. Im Hinblick auf die verminderte Makrophageninfiltration, die in der Lunge von OVA/hCG Mäuse ermittelt wurde, wurde das angeborene Immunsystem in den Fokus gestellt. Mittels der Aktin- und Tubulinumstrukturierung konnte nachgewiesen werden, dass Makrophagen unter dem Einfluss von hCG weder zu dem klassisch aktivierten (MΦ1) noch zu dem alternativ aktivierten Makrophagentyp (MΦ2) polarisierten. Zusätzlich bewirkte hCG die Oberflächenexpression von costimulatorischen Molekülen auf Makrophagen. Das Binden von hCG an den LH/CG-Rezeptor auf Makrophagen führte zu einer raschen Aktivierung der Signalmoleküle Erk1/2, NF-κB und Creb und schließlich zur Synthese und Freisetzung des immunsupressorischen Zytokins IL-10.

Zeitgleich wurde die Rolle der Deacetylase Sirt1 in der Thymozytenentwicklung und in Asthma bronchiale erforscht. Diese Studie zeigte, dass ein Defekt in der katalytischen Domäne von Sirt1 weder die CD4 Entwicklung im Thymus beeinträchtigt, noch zu einer spontanen Th2-Immunantwort führt. Bleibt jedoch die Allergenexposition nicht aus, äußert sich der partielle Verlust der Sirt1 Deacetylaseaktivität in einer deutlich verstärkten allergischen Reaktion, die durch den Atemwegswiderstand, die IgE-Immunglobulinwerte, Mukusproduktion und Th2- und Th17-Zytokinproduktion gekennzeichnet ist.

Aufgrund des bekannten bronchodilatatorischen Effekts von hCG am Myometrium, wäre von Interesse die Wirkung von hCG auf, aus der Lunge isolierte glatte Muskelzellen zu überprüfen. Außerdem sollte der Einfluss von hCG stimulierten Makrophagen auf die glatte Muskulatur in *in vitro* Versuchen beobachtet werden. Desweiteren sollte die Kommunikation zwischen hCG behandelten Makrophagen und CD4⁺ T-Zellen in Kokultur beschrieben werden. Darüber hinaus ist noch ungeklärt welche anderen Moleküle in der IL-10 Signalkaskade involviert sind.

Des Weiteren steht noch zur Untersuchung die Interaktion von Sirt1 mit Transkriptionsfaktoren, die die Th2-Immunantwort regulieren. Weiterhin sollte die immunoregulatorische Wirkung von hCG sowohl in Sirt1^{F/F} CD4^{Cre/+} als auch in Sirt1^{F/F} LysM^{Cre/+} Mäusen untersucht werden.

5 Literatur

1. McFadden, E.R., Jr., *A century of asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2004. **170**(3): p. 215-21.
2. Sakula, A., *Henry Hyde Salter (1823-71): a biographical sketch*. Thorax, 1985. **40**(12): p. 887-8.
3. Ober, C. and T.C. Yao, *The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective*. Immunol Rev, 2011. **242**(1): p. 10-30.
4. Umetsu, D.T. and R.H. DeKruyff, *The regulation of allergy and asthma*. Immunol Rev, 2006. **212**: p. 238-55.
5. Umetsu, D.T., et al., *Asthma: an epidemic of dysregulated immunity*. Nat Immunol, 2002. **3**(8): p. 715-20.
6. Holt, P.G. and A.H. van den Biggelaar, *99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: the role of infections in allergy: atopic asthma as a paradigm*. Clin Exp Immunol, 2010. **160**(1): p. 22-6.
7. Fuhlbrigge, A.L., *Asthma severity and asthma control: symptoms, pulmonary function, and inflammatory markers*. Curr Opin Pulm Med, 2004. **10**(1): p. 1-6.
8. *New NHLBI guidelines for the diagnosis and management of asthma*. National Heart, Lung and Blood Institute. Lippincott Health Promot Lett, 1997. **2**(7): p. 1, 8-9.
9. Holgate, S.T., *Pathogenesis of asthma*. Clin Exp Allergy, 2008. **38**(6): p. 872-97.
10. Murphy, D.M. and P.M. O'Byrne, *Recent advances in the pathophysiology of asthma*. Chest, 2010. **137**(6): p. 1417-26.
11. *Encyclopædia Britannica, Inc.* 2001.
12. Humbert, M., et al., *The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences*. Immunol Today, 1999. **20**(11): p. 528-33.
13. Hurwitz, S.H., *Nonallergic asthma; differential diagnosis and treatment*. Calif Med, 1955. **83**(2): p. 61-7.

14. Kay, A.B., *Immunomodulation in asthma: mechanisms and possible pitfalls*. Curr Opin Pharmacol, 2003. **3**(3): p. 220-6.
15. Kim, H.Y., R.H. DeKruyff, and D.T. Umetsu, *The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity*. Nat Immunol, 2010. **11**(7): p. 577-84.
16. Bloemen, K., et al., *The allergic cascade: review of the most important molecules in the asthmatic lung*. Immunol Lett, 2007. **113**(1): p. 6-18.
17. Galli, S.J., M. Tsai, and A.M. Piliponsky, *The development of allergic inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 445-54.
18. Georas, S.N., et al., *T-helper cell type-2 regulation in allergic disease*. Eur Respir J, 2005. **26**(6): p. 1119-37.
19. Georas, S.N., *Inhaled glucocorticoids, lymphocytes, and dendritic cells in asthma and obstructive lung diseases*. Proc Am Thorac Soc, 2004. **1**(3): p. 215-21.
20. Gao, H., T. Neff, and P.A. Ward, *Regulation of lung inflammation in the model of IgG immune-complex injury*. Annu Rev Pathol, 2006. **1**: p. 215-42.
21. Galli, S.J. and M. Tsai, *IgE and mast cells in allergic disease*. Nat Med, 2012. **18**(5): p. 693-704.
22. Schwartz, L.B., *Mast cells and basophils*. Clin Allergy Immunol, 2002. **16**: p. 3-42.
23. Gauvreau, G.M. and M.Y. Evans, *Allergen inhalation challenge: a human model of asthma exacerbation*. Contrib Microbiol, 2007. **14**: p. 21-32.
24. *Asthma Part 1*.
25. Hogan, S.P., et al., *Eosinophils: biological properties and role in health and disease*. Clin Exp Allergy, 2008. **38**(5): p. 709-50.
26. Holgate, S.T., *The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma*. Allergol Int, 2008. **57**(1): p. 1-10.
27. Herrick, C.A. and K. Bottomly, *To respond or not to respond: T cells in allergic asthma*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(5): p. 405-12.
28. Lloyd, C.M. and E.M. Hessel, *Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(12): p. 838-48.
29. Gilmour, J. and P. Lavender, *Control of IL-4 expression in T helper 1 and 2 cells*. Immunology, 2008. **124**(4): p. 437-44.

30. Coffman, R.L. and T. von der Weid, *Multiple pathways for the initiation of T helper 2 (Th2) responses*. J Exp Med, 1997. **185**(3): p. 373-5.
31. Tamada, K., et al., *IL-4-producing NK1.1+ T cells are resistant to glucocorticoid-induced apoptosis: implications for the Th1/Th2 balance*. J Immunol, 1998. **161**(3): p. 1239-47.
32. Yoshimoto, T. and W.E. Paul, *CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3*. J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1285-95.
33. Rincon, M., et al., *Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells*. J Exp Med, 1997. **185**(3): p. 461-9.
34. Finkelman, F.D., et al., *IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses*. J Immunol, 1988. **141**(7): p. 2335-41.
35. Hasbold, J., et al., *Integrating signals from IFN-gamma and IL-4 by B cells: positive and negative effects on CD40 ligand-induced proliferation, survival, and division-linked isotype switching to IgG1, IgE, and IgG2a*. J Immunol, 1999. **163**(8): p. 4175-81.
36. Song, Z., et al., *Polymorphic nucleotides within the human IL-4 promoter that mediate overexpression of the gene*. J Immunol, 1996. **156**(2): p. 424-9.
37. Soto-Ramirez, N., et al., *The interaction of genetic variants and DNA methylation of the interleukin-4 receptor gene increase the risk of asthma at age 18 years*. Clin Epigenetics, 2013. **5**(1): p. 1.
38. Paul, W.E., *Interleukin 4/B cell stimulatory factor 1: one lymphokine, many functions*. FASEB J, 1987. **1**(6): p. 456-61.
39. Peschel, C., et al., *Effects of B cell stimulatory factor-1/interleukin 4 on hematopoietic progenitor cells*. Blood, 1987. **70**(1): p. 254-63.
40. Chatila, T.A., *Interleukin-4 receptor signaling pathways in asthma pathogenesis*. Trends Mol Med, 2004. **10**(10): p. 493-9.
41. Kirstein, F., et al., *Expression of IL-4 receptor alpha on smooth muscle cells is not necessary for development of experimental allergic asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **126**(2): p. 347-54.
42. Kotsimbos, T.C., et al., *Expression of the IL-4 receptor alpha-subunit is increased in bronchial biopsy specimens from atopic and nonatopic asthmatic subjects*. J Allergy Clin Immunol, 1998. **102**(5): p. 859-66.

43. Henderson, W.R., Jr., E.Y. Chi, and C.R. Maliszewski, *Soluble IL-4 receptor inhibits airway inflammation following allergen challenge in a mouse model of asthma*. J Immunol, 2000. **164**(2): p. 1086-95.
44. Cohn, L., et al., *Induction of airway mucus production By T helper 2 (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production*. J Exp Med, 1997. **186**(10): p. 1737-47.
45. Takatsu, K., A. Tominaga, and T. Hamaoka, *Antigen-induced T cell-replacing factor (TRF). I. Functional characterization of a TRF-producing helper T cell subset and genetic studies on TRF production*. J Immunol, 1980. **124**(5): p. 2414-22.
46. Sanderson, C.J., H.D. Campbell, and I.G. Young, *Molecular and cellular biology of eosinophil differentiation factor (interleukin-5) and its effects on human and mouse B cells*. Immunol Rev, 1988. **102**: p. 29-50.
47. Wang, J.M., et al., *Recombinant human interleukin 5 is a selective eosinophil chemoattractant*. Eur J Immunol, 1989. **19**(4): p. 701-5.
48. Vaux, D.L., et al., *In vivo expression of interleukin 5 induces an eosinophilia and expanded Ly-1B lineage populations*. Int Immunol, 1990. **2**(10): p. 965-71.
49. Coeffier, E., D. Joseph, and B.B. Vargaftig, *Role of interleukin-5 in enhanced migration of eosinophils from airways of immunized guinea-pigs*. Br J Pharmacol, 1994. **113**(3): p. 749-56.
50. Minnicozzi, M., et al., *Tissue eosinophilia induced by recombinant human interleukin-5 in the hamster cheek pouch membrane*. Mediators Inflamm, 1995. **4**(5): p. 331-8.
51. Dent, L.A., et al., *Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5*. J Exp Med, 1990. **172**(5): p. 1425-31.
52. Moon, B.G., et al., *The role of IL-5 for mature B-1 cells in homeostatic proliferation, cell survival, and Ig production*. J Immunol, 2004. **172**(10): p. 6020-9.
53. Takatsu, K. and H. Nakajima, *IL-5 and eosinophilia*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(3): p. 288-94.
54. Takatsu, K., *Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2011. **87**(8): p. 463-85.

55. Lee, J.J., et al., *Interleukin-5 expression in the lung epithelium of transgenic mice leads to pulmonary changes pathognomonic of asthma*. J Exp Med, 1997. **185**(12): p. 2143-56.
56. Tanaka, H., et al., *Role of interleukin-5 and eosinophils in allergen-induced airway remodeling in mice*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. **31**(1): p. 62-8.
57. Robinson, D.S., et al., *Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma*. N Engl J Med, 1992. **326**(5): p. 298-304.
58. Shi, H.Z., et al., *Effect of inhaled interleukin-5 on airway hyperreactivity and eosinophilia in asthmatics*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(1): p. 204-9.
59. Hogan, S.P., et al., *Interleukin-5-producing CD4+ T cells play a pivotal role in aeroallergen-induced eosinophilia, bronchial hyperreactivity, and lung damage in mice*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(1): p. 210-8.
60. Foster, P.S., et al., *Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model*. J Exp Med, 1996. **183**(1): p. 195-201.
61. McKenzie, A.N., et al., *Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3735-9.
62. Zhu, Z., et al., *Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production*. J Clin Invest, 1999. **103**(6): p. 779-88.
63. Kuperman, D.A., et al., *Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma*. Nat Med, 2002. **8**(8): p. 885-9.
64. Fulkerson, P.C., et al., *Persistent effects induced by IL-13 in the lung*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006. **35**(3): p. 337-46.
65. Wills-Karp, M., et al., *Interleukin-13: central mediator of allergic asthma*. Science, 1998. **282**(5397): p. 2258-61.
66. Tliba, O., et al., *IL-13 enhances agonist-evoked calcium signals and contractile responses in airway smooth muscle*. Br J Pharmacol, 2003. **140**(7): p. 1159-62.
67. Booth, B.W., et al., *Interleukin-13 induces proliferation of human airway epithelial cells in vitro via a mechanism mediated by transforming growth factor-alpha*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001. **25**(6): p. 739-43.

68. Borowski, A., et al., *Interleukin-13 acts as an apoptotic effector on lung epithelial cells and induces pro-fibrotic gene expression in lung fibroblasts*. Clin Exp Allergy, 2008. **38**(4): p. 619-28.
69. Doucet, C., et al., *Interleukin (IL) 4 and IL-13 act on human lung fibroblasts. Implication in asthma*. J Clin Invest, 1998. **101**(10): p. 2129-39.
70. Donaldson, D.D., et al., *The murine IL-13 receptor alpha 2: molecular cloning, characterization, and comparison with murine IL-13 receptor alpha 1*. J Immunol, 1998. **161**(5): p. 2317-24.
71. Heinzmann, A., et al., *Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(4): p. 549-59.
72. Munitz, A., et al., *Distinct roles for IL-13 and IL-4 via IL-13 receptor alpha1 and the type II IL-4 receptor in asthma pathogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(20): p. 7240-5.
73. Wills-Karp, M., *Interleukin-13 in asthma pathogenesis*. Immunol Rev, 2004. **202**: p. 175-90.
74. Ohno, I., *Eosinophils are now recognized to play a role in health and disease, with a functional diversity due to multifaceted biological properties. Preface*. Int Arch Allergy Immunol, 2012. **158 Suppl 1**: p. 1.
75. Uhm, T.G., B.S. Kim, and I.Y. Chung, *Eosinophil development, regulation of eosinophil-specific genes, and role of eosinophils in the pathogenesis of asthma*. Allergy Asthma Immunol Res, 2012. **4**(2): p. 68-79.
76. Kita, H., *Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease*. Immunol Rev, 2011. **242**(1): p. 161-77.
77. Rothenberg, M.E. and S.P. Hogan, *The eosinophil*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 147-74.
78. Jacoby, D.B., G.J. Gleich, and A.D. Fryer, *Human eosinophil major basic protein is an endogenous allosteric antagonist at the inhibitory muscarinic M2 receptor*. J Clin Invest, 1993. **91**(4): p. 1314-8.
79. Shi, H.Z., et al., *Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils*. J Clin Invest, 2000. **105**(7): p. 945-53.
80. Del Pozo, V., et al., *Eosinophil as antigen-presenting cell: activation of T cell clones and T cell hybridoma by eosinophils after antigen processing*. Eur J Immunol, 1992. **22**(7): p. 1919-25.

81. Esnault, S. and J.S. Malter, *Granulocyte macrophage-colony-stimulating factor mRNA is stabilized in airway eosinophils and peripheral blood eosinophils activated by TNF-alpha plus fibronectin*. J Immunol, 2001. **166**(7): p. 4658-63.
82. Moqbel, R., et al., *Expression of mRNA and immunoreactivity for the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in activated human eosinophils*. J Exp Med, 1991. **174**(3): p. 749-52.
83. Moqbel, R. and P. Lacy, *New concepts in effector functions of eosinophil cytokines*. Clin Exp Allergy, 2000. **30**(12): p. 1667-71.
84. Gould, H.J., et al., *The biology of IGE and the basis of allergic disease*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 579-628.
85. Harriman, W., et al., *Immunoglobulin class switch recombination*. Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 361-84.
86. McCall, M.N. and P.D. Hodgkin, *Switch recombination and germ-line transcription are division-regulated events in B lymphocytes*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1447**(1): p. 43-50.
87. Rush, J.S., J. Hasbold, and P.D. Hodgkin, *Cross-linking surface Ig delays CD40 ligand- and IL-4-induced B cell Ig class switching and reveals evidence for independent regulation of B cell proliferation and differentiation*. J Immunol, 2002. **168**(6): p. 2676-82.
88. Snapper, C.M., F.D. Finkelman, and W.E. Paul, *Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4*. J Exp Med, 1988. **167**(1): p. 183-96.
89. Iio, A., T.A. Waldmann, and W. Strober, *Metabolic study of human IgE: evidence for an extravascular catabolic pathway*. J Immunol, 1978. **120**(5): p. 1696-701.
90. Romagnani, S., et al., *In vitro production of IgE by human peripheral blood mononuclear cells. II. Cells involved in the spontaneous IgE production in atopic patients*. Clin Exp Immunol, 1980. **42**(3): p. 579-88.
91. Ying, S., et al., *Local expression of epsilon germline gene transcripts and RNA for the epsilon heavy chain of IgE in the bronchial mucosa in atopic and nonatopic asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **107**(4): p. 686-92.
92. Kinet, J.P., *The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 931-72.
93. Teixeira, L.K., et al., *The role of interferon-gamma on immune and allergic responses*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2005. **100 Suppl 1**: p. 137-44.

94. Boehm, U., et al., *Cellular responses to interferon-gamma*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 749-95.
95. Frucht, D.M., et al., *IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge*. Trends Immunol, 2001. **22**(10): p. 556-60.
96. Szabo, S.J., et al., *Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 713-58.
97. Nakagome, K., et al., *IFN-gamma attenuates antigen-induced overall immune response in the airway as a Th1-type immune regulatory cytokine*. J Immunol, 2009. **183**(1): p. 209-20.
98. Frandji, P., et al., *Presentation of soluble antigens by mast cells: upregulation by interleukin-4 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and downregulation by interferon-gamma*. Cell Immunol, 1995. **163**(1): p. 37-46.
99. Lamkhioed, B., et al., *The CCR3 receptor is involved in eosinophil differentiation and is up-regulated by Th2 cytokines in CD34+ progenitor cells*. J Immunol, 2003. **170**(1): p. 537-47.
100. Patel, H.J., et al., *Constitutive expressions of type I NOS in human airway smooth muscle cells: evidence for an antiproliferative role*. FASEB J, 1999. **13**(13): p. 1810-6.
101. Deenick, E.K., J. Hasbold, and P.D. Hodgkin, *Switching to IgG3, IgG2b, and IgA is division linked and independent, revealing a stochastic framework for describing differentiation*. J Immunol, 1999. **163**(9): p. 4707-14.
102. Daines, M.O. and G.K. Hershey, *A novel mechanism by which interferon-gamma can regulate interleukin (IL)-13 responses. Evidence for intracellular stores of IL-13 receptor alpha -2 and their rapid mobilization by interferon-gamma*. J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 10387-93.
103. Refaeli, Y., et al., *Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes*. J Exp Med, 2002. **196**(7): p. 999-1005.
104. Smart, J.M., et al., *Polyclonal and allergen-induced cytokine responses in adults with asthma: resolution of asthma is associated with normalization of IFN-gamma responses*. J Allergy Clin Immunol, 2002. **110**(3): p. 450-6.
105. Magnan, A.O., et al., *Assessment of the Th1/Th2 paradigm in whole blood in atopy and asthma. Increased IFN-gamma-producing CD8(+) T cells in asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(6): p. 1790-6.

106. Schmidt-Weber, C.B., M. Akdis, and C.A. Akdis, *TH17 cells in the big picture of immunology*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(2): p. 247-54.
107. Huang, W., et al., *Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice*. J Infect Dis, 2004. **190**(3): p. 624-31.
108. Kelly, M.N., et al., *Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against Toxoplasma gondii infection*. Infect Immun, 2005. **73**(1): p. 617-21.
109. Schwarzenberger, P., et al., *Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colony-stimulating factor for IL-17-mediated granulopoiesis*. J Immunol, 2000. **164**(9): p. 4783-9.
110. Bettelli, E., M. Oukka, and V.K. Kuchroo, *T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity*. Nat Immunol, 2007. **8**(4): p. 345-50.
111. Doe, C., et al., *Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD*. Chest, 2010. **138**(5): p. 1140-7.
112. Al-Ramli, W., et al., *T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(5): p. 1185-7.
113. Molet, S., et al., *IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(3): p. 430-8.
114. Oboki, K., et al., *Th17 and allergy*. Allergol Int, 2008. **57**(2): p. 121-34.
115. Louis, R., et al., *The relationship between airways inflammation and asthma severity*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(1): p. 9-16.
116. Woodruff, P.G., et al., *Relationship between airway inflammation, hyperresponsiveness, and obstruction in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(5): p. 753-8.
117. Schnyder-Candrian, S., et al., *Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma*. J Exp Med, 2006. **203**(12): p. 2715-25.
118. Nembrini, C., B.J. Marsland, and M. Kopf, *IL-17-producing T cells in lung immunity and inflammation*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(5): p. 986-94; quiz 995-6.
119. Wingerson, L., *Killers on call*.
120. Takahashi, K., M. Naito, and M. Takeya, *Development and heterogeneity of macrophages and their related cells through their differentiation pathways*. Pathol Int, 1996. **46**(7): p. 473-85.

121. Heidenreich, S., *Monocyte CD14: a multifunctional receptor engaged in apoptosis from both sides*. J Leukoc Biol, 1999. **65**(6): p. 737-43.
122. Naito, M., et al., *Development, differentiation, and phenotypic heterogeneity of murine tissue macrophages*. J Leukoc Biol, 1996. **59**(2): p. 133-8.
123. Schneberger, D., K. Aharonson-Raz, and B. Singh, *Monocyte and macrophage heterogeneity and Toll-like receptors in the lung*. Cell Tissue Res, 2011. **343**(1): p. 97-106.
124. Liddiard, K., et al., *Macrophage heterogeneity and acute inflammation*. Eur J Immunol, 2011. **41**(9): p. 2503-8.
125. Lambrecht, B.N., *Alveolar macrophage in the driver's seat*. Immunity, 2006. **24**(4): p. 366-8.
126. Minnicozzi, M., R.T. Sawyer, and M.J. Fenton, *Innate immunity in allergic disease*. Immunol Rev, 2011. **242**(1): p. 106-27.
127. Lombry, C., et al., *Alveolar macrophages are a primary barrier to pulmonary absorption of macromolecules*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **286**(5): p. L1002-8.
128. Siekmeier, R. and G. Scheuch, *Treatment of systemic diseases by inhalation of biomolecule aerosols*. J Physiol Pharmacol, 2009. **60 Suppl 5**: p. 15-26.
129. Moreira, A.P. and C.M. Hogaboam, *Macrophages in allergic asthma: fine-tuning their pro- and anti-inflammatory actions for disease resolution*. J Interferon Cytokine Res, 2011. **31**(6): p. 485-91.
130. Thepen, T., N. Van Rooijen, and G. Kraal, *Alveolar macrophage elimination in vivo is associated with an increase in pulmonary immune response in mice*. J Exp Med, 1989. **170**(2): p. 499-509.
131. Bang, B.R., et al., *Alveolar macrophages modulate allergic inflammation in a murine model of asthma*. Exp Mol Med, 2011. **43**(5): p. 275-80.
132. Bedoret, D., et al., *Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(12): p. 3723-38.
133. Murray, P.J. and T.A. Wynn, *Protective and pathogenic functions of macrophage subsets*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(11): p. 723-37.
134. Biswas, S.K. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm*. Nat Immunol, 2010. **11**(10): p. 889-96.

135. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 958-69.
136. Edwards, J.P., et al., *Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(6): p. 1298-307.
137. Redente, E.F., et al., *Differential polarization of alveolar macrophages and bone marrow-derived monocytes following chemically and pathogen-induced chronic lung inflammation*. J Leukoc Biol, 2010. **88**(1): p. 159-68.
138. Sica, A. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas*. J Clin Invest, 2012. **122**(3): p. 787-95.
139. Martinez, F.O., L. Helming, and S. Gordon, *Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 451-83.
140. Gwinn, M.R. and V. Vallyathan, *Respiratory burst: role in signal transduction in alveolar macrophages*. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2006. **9**(1): p. 27-39.
141. Bowdish, D.M., et al., *Macrophage receptors implicated in the "adaptive" form of innate immunity*. Microbes Infect, 2007. **9**(14-15): p. 1680-7.
142. Taylor, P.R., et al., *Macrophage receptors and immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 901-44.
143. Ernst, J.D., *Macrophage receptors for Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 1998. **66**(4): p. 1277-81.
144. Ouyang, W., et al., *Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 71-109.
145. Fiorentino, D.F., M.W. Bond, and T.R. Mosmann, *Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones*. J Exp Med, 1989. **170**(6): p. 2081-95.
146. Saraiva, M., et al., *Identification of a macrophage-specific chromatin signature in the IL-10 locus*. J Immunol, 2005. **175**(2): p. 1041-6.
147. Murai, M., et al., *Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis*. Nat Immunol, 2009. **10**(11): p. 1178-84.
148. Boonstra, A., et al., *Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-*

- dependent TLR signals, and TLR-independent signals.* J Immunol, 2006. **177**(11): p. 7551-8.
149. Fillatreau, S., et al., *B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10.* Nat Immunol, 2002. **3**(10): p. 944-50.
150. Mehrotra, P.T., et al., *Production of IL-10 by human natural killer cells stimulated with IL-2 and/or IL-12.* J Immunol, 1998. **160**(6): p. 2637-44.
151. Rhodes, K.A., et al., *A subset of IL-10-producing gammadelta T cells protect the liver from Listeria-elicited, CD8(+) T cell-mediated injury.* Eur J Immunol, 2008. **38**(8): p. 2274-83.
152. Hedrich, C.M. and J.H. Bream, *Cell type-specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease.* Immunol Res, 2010. **47**(1-3): p. 185-206.
153. Lyon, H., et al., *IL10 gene polymorphisms are associated with asthma phenotypes in children.* Genet Epidemiol, 2004. **26**(2): p. 155-65.
154. Nakagome, K., et al., *In vivo IL-10 gene delivery suppresses airway eosinophilia and hyperreactivity by down-regulating APC functions and migration without impairing the antigen-specific systemic immune response in a mouse model of allergic airway inflammation.* J Immunol, 2005. **174**(11): p. 6955-66.
155. Murray, P.J., *Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response.* Curr Opin Pharmacol, 2006. **6**(4): p. 379-86.
156. Pengal, R.A., et al., *Lipopolysaccharide-induced production of interleukin-10 is promoted by the serine/threonine kinase Akt.* Mol Immunol, 2006. **43**(10): p. 1557-64.
157. Giambartolomei, G.H., et al., *Autocrine and exocrine regulation of interleukin-10 production in THP-1 cells stimulated with Borrelia burgdorferi lipoproteins.* Infect Immun, 2002. **70**(4): p. 1881-8.
158. Zhang, Y., et al., *Regulation of interleukin-10 gene expression in macrophages engulfing apoptotic cells.* J Interferon Cytokine Res, 2010. **30**(3): p. 113-22.
159. Xu, W., et al., *IL-10-producing macrophages preferentially clear early apoptotic cells.* Blood, 2006. **107**(12): p. 4930-7.

160. Grutz, G., *New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression*. J Leukoc Biol, 2005. **77**(1): p. 3-15.
161. Carter, N.A., E.C. Rosser, and C. Mauri, *Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis*. Arthritis Res Ther, 2012. **14**(1): p. R32.
162. Faith, A., et al., *T cells producing the anti-inflammatory cytokine IL-10 regulate allergen-specific Th2 responses in human airways*. Allergy, 2012. **67**(8): p. 1007-13.
163. Wu, K., et al., *IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy*. Cell Mol Immunol, 2007. **4**(4): p. 269-75.
164. Sabat, R., et al., *Biology of interleukin-10*. Cytokine Growth Factor Rev, 2010. **21**(5): p. 331-44.
165. Geginat, J., F. Sallusto, and A. Lanzavecchia, *Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells*. J Exp Med, 2001. **194**(12): p. 1711-9.
166. Wolk, K., et al., *Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members?* J Immunol, 2002. **168**(11): p. 5397-402.
167. Sheikh, F., et al., *Cutting edge: IL-26 signals through a novel receptor complex composed of IL-20 receptor 1 and IL-10 receptor 2*. J Immunol, 2004. **172**(4): p. 2006-10.
168. Donnelly, R.P., et al., *The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(2): p. 314-21.
169. Hinz, W.R.u.G., ed. *Endokrinologische Forschung an der Charite-Frauenklinik 1908-1951* 2010.
170. Alevizaki, M. and I. Huhtaniemi, *Structure-function relationships of glycoprotein hormones; lessons from mutations and polymorphisms of the thyrotrophin and gonadotrophin subunit genes*. Hormones (Athens), 2002. **1**(4): p. 224-32.
171. Buttstedt, A., *Wachstumsfaktoren der Cystin-Knoten-Familie und ihre Pro-Formen*. 2011.
172. Moyle, W.R., et al., *Model of human chorionic gonadotropin and lutropin receptor interaction that explains signal transduction of the glycoprotein hormones*. J Biol Chem, 1995. **270**(34): p. 20020-31.

173. Cole, L.A., *hCG, five independent molecules*. Clin Chim Acta, 2012. **413**(1-2): p. 48-65.
174. Keay, S.D., et al., *The role of hCG in reproductive medicine*. BJOG, 2004. **111**(11): p. 1218-28.
175. Yang, M., Z.M. Lei, and V. Rao Ch, *The central role of human chorionic gonadotropin in the formation of human placental syncytium*. Endocrinology, 2003. **144**(3): p. 1108-20.
176. Tsampalas, M., et al., *Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties*. J Reprod Immunol, 2010. **85**(1): p. 93-8.
177. Ticconi, C., et al., *Pregnancy-promoting actions of HCG in human myometrium and fetal membranes*. Placenta, 2007. **28 Suppl A**: p. S137-43.
178. Mehats, C., et al., *Pregnancy induces a modulation of the cAMP phosphodiesterase 4-conformers ratio in human myometrium: consequences for the utero-relaxant effect of PDE4-selective inhibitors*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **292**(2): p. 817-23.
179. Morin, M., et al., *Elevated levels of macrophage migration inhibitory factor in the peripheral blood of women with endometriosis*. Fertil Steril, 2005. **83**(4): p. 865-72.
180. Wan, H., et al., *Chorionic gonadotropin can enhance innate immunity by stimulating macrophage function*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(4): p. 926-33.
181. Alexander, H., et al., *HCG secretion by peripheral mononuclear cells during pregnancy*. Domest Anim Endocrinol, 1998. **15**(5): p. 377-87.
182. Kosaka, K., et al., *Human chorionic gonadotropin (HCG) activates monocytes to produce interleukin-8 via a different pathway from luteinizing hormone/HCG receptor system*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(11): p. 5199-208.
183. Schumacher, A., et al., *Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal-maternal interface during early human pregnancy*. J Immunol, 2009. **182**(9): p. 5488-97.
184. Wan, H., et al., *Chorionic gonadotropin induces dendritic cells to express a tolerogenic phenotype*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(4): p. 894-901.
185. Cole, L.A. and S.A. Khanlian, *Hyperglycosylated hCG: a variant with separate biological functions to regular hCG*. Mol Cell Endocrinol, 2007. **260-262**: p. 228-36.

186. Cole, L.A., *Hyperglycosylated hCG*. Placenta, 2007. **28**(10): p. 977-86.
187. Cole, L.A. and S. Butler, *Hyperglycosylated hCG, hCGbeta and Hyperglycosylated hCGbeta: interchangeable cancer promoters*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **349**(2): p. 232-8.
188. Gospodarowicz, D., *Properties of the luteinizing hormone receptor of isolated bovine corpus luteum plasma membranes*. J Biol Chem, 1973. **248**(14): p. 5042-9.
189. McFarland, K.C., et al., *Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family*. Science, 1989. **245**(4917): p. 494-9.
190. Tsai-Morris, C.H., et al., *Structural organization of the rat luteinizing hormone (LH) receptor gene*. J Biol Chem, 1991. **266**(17): p. 11355-9.
191. Loosfelt, H., et al., *Cloning and sequencing of porcine LH-hCG receptor cDNA: variants lacking transmembrane domain*. Science, 1989. **245**(4917): p. 525-8.
192. Minegishi, T., et al., *Expression of luteinizing hormone/human chorionic gonadotrophin (LH/HCG) receptor mRNA in the human ovary*. Mol Hum Reprod, 1997. **3**(2): p. 101-7.
193. Jia, X.-C., *Expression of Human Luteinizing Hormone (LH) Receptor: Interaction with LH and Chorionic Gonadotropin from Human but not Equine, Rat, and Ovine Species*. 1991.
194. Segaloff, D.L. and M. Ascoli, *The lutropin/choriogonadotropin receptor ... 4 years later*. Endocr Rev, 1993. **14**(3): p. 324-47.
195. Luttrell, L.M., *Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors*. Mol Biotechnol, 2008. **39**(3): p. 239-64.
196. Dufau, M.L., *The luteinizing hormone receptor*. Annu Rev Physiol, 1998. **60**: p. 461-96.
197. Ascoli, M., F. Fanelli, and D.L. Segaloff, *The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective*. Endocr Rev, 2002. **23**(2): p. 141-74.
198. Zhang, M., et al., *Expression and localization of luteinizing hormone receptor in the female mouse reproductive tract*. Biol Reprod, 2001. **64**(1): p. 179-87.

199. Apaja, P.M., et al., *Identification and structural characterization of the neuronal luteinizing hormone receptor associated with sensory systems*. J Biol Chem, 2004. **279**(3): p. 1899-906.
200. Pakarainen, T., et al., *Fertility in luteinizing hormone receptor-knockout mice after wild-type ovary transplantation demonstrates redundancy of extragonadal luteinizing hormone action*. J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1862-8.
201. Sonoda, N., et al., *Expression of variant luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors and degradation of chorionic gonadotropin in human chorionic villous macrophages*. Placenta, 2005. **26**(4): p. 298-307.
202. Katabuchi, H. and T. Ohba, *Human chorionic villous macrophages as a fetal biological shield from maternal chorionic gonadotropin*. Dev Growth Differ, 2008. **50**(5): p. 299-306.
203. Abdallah, M.A., et al., *Human fetal nongonadal tissues contain human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptors*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(2): p. 952-6.
204. Lin, J., et al., *Lymphocytes from pregnant women express human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene*. Mol Cell Endocrinol, 1995. **111**(1): p. R13-7.
205. Barnes, P.J., I.M. Adcock, and K. Ito, *Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases*. Eur Respir J, 2005. **25**(3): p. 552-63.
206. Ito, K., C.E. Charron, and I.M. Adcock, *Impact of protein acetylation in inflammatory lung diseases*. Pharmacol Ther, 2007. **116**(2): p. 249-65.
207. Haberland, M., R.L. Montgomery, and E.N. Olson, *The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(1): p. 32-42.
208. Blander, G. and L. Guarente, *The Sir2 family of protein deacetylases*. Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 417-35.
209. Klar, A.J., S. Fogel, and K. Macleod, *MAR1-a Regulator of the HMa and HMalpha Loci in SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. Genetics, 1979. **93**(1): p. 37-50.
210. Michan, S. and D. Sinclair, *Sirtuins in mammals: insights into their biological function*. Biochem J, 2007. **404**(1): p. 1-13.

211. Kaeberlein, M., M. McVey, and L. Guarente, *The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in Saccharomyces cerevisiae by two different mechanisms*. Genes Dev, 1999. **13**(19): p. 2570-80.
212. Tissenbaum, H.A. and L. Guarente, *Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2001. **410**(6825): p. 227-30.
213. Astrom, S.U., T.W. Cline, and J. Rine, *The Drosophila melanogaster sir2+ gene is nonessential and has only minor effects on position-effect variegation*. Genetics, 2003. **163**(3): p. 931-7.
214. Brachmann, C.B., et al., *The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability*. Genes Dev, 1995. **9**(23): p. 2888-902.
215. North, B.J. and E. Verdin, *Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases*. Genome Biol, 2004. **5**(5): p. 224.
216. Michishita, E., et al., *Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(10): p. 4623-35.
217. Smith, B.C., W.C. Hallows, and J.M. Denu, *Mechanisms and molecular probes of sirtuins*. Chem Biol, 2008. **15**(10): p. 1002-13.
218. Finkel, T., C.X. Deng, and R. Mostoslavsky, *Recent progress in the biology and physiology of sirtuins*. Nature, 2009. **460**(7255): p. 587-91.
219. Yamamoto, H., K. Schoonjans, and J. Auwerx, *Sirtuin functions in health and disease*. Mol Endocrinol, 2007. **21**(8): p. 1745-55.
220. Afshar, G. and J.P. Murnane, *Characterization of a human gene with sequence homology to Saccharomyces cerevisiae SIR2*. Gene, 1999. **234**(1): p. 161-8.
221. Zhang, J., et al., *The type III histone deacetylase Sirt1 is essential for maintenance of T cell tolerance in mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(10): p. 3048-58.
222. van Loosdregt, J., et al., *Rapid temporal control of Foxp3 protein degradation by sirtuin-1*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e19047.
223. van Loosdregt, J., et al., *Regulation of Treg functionality by acetylation-mediated Foxp3 protein stabilization*. Blood, 2010. **115**(5): p. 965-74.
224. Bhavsar, P., T. Ahmad, and I.M. Adcock, *The role of histone deacetylases in asthma and allergic diseases*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(3): p. 580-4.

225. Nakamaru, Y., et al., *A protein deacetylase SIRT1 is a negative regulator of metalloproteinase-9*. FASEB J, 2009. **23**(9): p. 2810-9.
226. Rajendrasozhan, S., et al., *SIRT1, an antiinflammatory and antiaging protein, is decreased in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **177**(8): p. 861-70.
227. Kim, S.R., et al., *Involvement of sirtuin 1 in airway inflammation and hyperresponsiveness of allergic airway disease*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2): p. 449-460 e14.
228. Legutko, A., et al., *Sirtuin 1 promotes Th2 responses and airway allergy by repressing peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity in dendritic cells*. J Immunol, 2011. **187**(9): p. 4517-29.
229. Yoshizaki, T., et al., *SIRT1 inhibits inflammatory pathways in macrophages and modulates insulin sensitivity*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **298**(3): p. E419-28.
230. Sasaki, T., et al., *Phosphorylation regulates SIRT1 function*. PLoS One, 2008. **3**(12): p. e4020.
231. Nasrin, N., et al., *JNK1 phosphorylates SIRT1 and promotes its enzymatic activity*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8414.
232. Alcain, F.J. and J.M. Villalba, *Sirtuin activators*. Expert Opin Ther Pat, 2009. **19**(4): p. 403-14.
233. Villalba, J.M. and F.J. Alcain, *Sirtuin activators and inhibitors*. Biofactors, 2012. **38**(5): p. 349-59.
234. Kong, S., M.W. McBurney, and D. Fang, *Sirtuin 1 in immune regulation and autoimmunity*. Immunol Cell Biol, 2012. **90**(1): p. 6-13.
235. Holgate, S.T. and R. Polosa, *Treatment strategies for allergy and asthma*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(3): p. 218-30.
236. Rothe, T., *Allergisches Asthma:Therapeutische Optionen*. 2008.
237. Gruenberg, D. and W. Busse, *Biologic therapies for asthma*. Curr Opin Pulm Med, 2010. **16**(1): p. 19-24.
238. Hansbro, P.M., G.E. Kaiko, and P.S. Foster, *Cytokine/anti-cytokine therapy - novel treatments for asthma?* Br J Pharmacol, 2011. **163**(1): p. 81-95.
239. Rastogi, D., et al., *T-helper type 2 polarization among asthmatics during and following pregnancy*. Clin Exp Allergy, 2006. **36**(7): p. 892-8.

240. Ali, Z. and C.S. Ulrik, *Incidence and risk factors for exacerbations of asthma during pregnancy*. J Asthma Allergy, 2013. **6**: p. 53-60.
241. Henderson, A.J., *Bronchoalveolar lavage*. Arch Dis Child, 1994. **70**(3): p. 167-9.
242. www.epitomics.com.
243. Kaneko, M., et al., *Allergen-specific IgG1 and IgG3 through Fc gamma RII induce eosinophil degranulation*. J Clin Invest, 1995. **95**(6): p. 2813-21.
244. Williams, J.W., M.Y. Tjota, and A.I. Sperling, *The contribution of allergen-specific IgG to the development of th2-mediated airway inflammation*. J Allergy (Cairo), 2012. **2012**: p. 236075.
245. Yang, M., R.K. Kumar, and P.S. Foster, *Interferon-gamma and pulmonary macrophages contribute to the mechanisms underlying prolonged airway hyperresponsiveness*. Clin Exp Allergy, 2010. **40**(1): p. 163-73.
246. Leenen, P.J., et al., *Markers of mouse macrophage development detected by monoclonal antibodies*. J Immunol Methods, 1994. **174**(1-2): p. 5-19.
247. Saraiva, M. and A. O'Garra, *The regulation of IL-10 production by immune cells*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(3): p. 170-81.
248. Lund, T. and P.J. Delves, *Immunological analysis of epitopes on hCG*. Rev Reprod, 1998. **3**(2): p. 71-6.
249. <Gewebeprotective und antiinflammatorische Wirkung von humanem Choriogonadotropin in Mausmodellen mit autoimmunem Leberschaden.pdf>.
250. Grailer, J.J., M. Kodera, and D.A. Steeber, *L-selectin: role in regulating homeostasis and cutaneous inflammation*. J Dermatol Sci, 2009. **56**(3): p. 141-7.
251. Abbas, A.K. and C.A. Janeway, Jr., *Immunology: improving on nature in the twenty-first century*. Cell, 2000. **100**(1): p. 129-38.
252. Tagaya, E. and J. Tamaoki, *Mechanisms of airway remodeling in asthma*. Allergol Int, 2007. **56**(4): p. 331-40.
253. Grausenburger, R., et al., *Conditional deletion of histone deacetylase 1 in T cells leads to enhanced airway inflammation and increased Th2 cytokine production*. J Immunol, 2010. **185**(6): p. 3489-97.
254. Leynaert, B., et al., *Is bronchial hyperresponsiveness more frequent in women than in men? A population-based study*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(5): p. 1413-20.

255. Dijkstra, A., et al., *Estrogen receptor 1 polymorphisms are associated with airway hyperresponsiveness and lung function decline, particularly in female subjects with asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(3): p. 604-11.
256. Carey, M.A., et al., *Spontaneous airway hyperresponsiveness in estrogen receptor-alpha-deficient mice*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **175**(2): p. 126-35.
257. Christakos, S. and O.P. Bahl, *Pregnant mare serum gonadotropin. Purification and physicochemical, biological, and immunological characterization*. J Biol Chem, 1979. **254**(10): p. 4253-61.
258. Swanson, W.F., D.W. Horohov, and R.A. Godke, *Production of exogenous gonadotrophin-neutralizing immunoglobulins in cats after repeated eCG-hCG treatment and relevance for assisted reproduction in felids*. J Reprod Fertil, 1995. **105**(1): p. 35-41.
259. Louvet, J.P., et al., *Absence of neutralizing effect of antisera to the unique structural region of human chorionic gonadotropin*. J Clin Endocrinol Metab, 1974. **39**(6): p. 1155-8.
260. Fuchs, T., et al., *In vitro induction of human suppressor T cells by a chorionic gonadotropin preparation*. J Reprod Immunol, 1981. **3**(2): p. 75-84.
261. Bosnjak, B., et al., *Intranasal challenge with increasing ovalbumin doses differently affects airway hyperresponsiveness and inflammatory cell accumulation in mouse model of asthma*. Inflamm Res, 2009. **58**(11): p. 773-81.
262. Tamasi, L., et al., *Increased interferon-gamma- and interleukin-4-synthesizing subsets of circulating T lymphocytes in pregnant asthmatics*. Clin Exp Allergy, 2005. **35**(9): p. 1197-203.
263. Aagaard-Tillery, K.M., R. Silver, and J. Dalton, *Immunology of normal pregnancy*. Semin Fetal Neonatal Med, 2006. **11**(5): p. 279-95.
264. U.Herz1 · H.Renz1, *Fetomaternale Immunität*. 2001.
265. Kouro, T. and K. Takatsu, *IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy*. Int Immunol, 2009. **21**(12): p. 1303-9.
266. Choi, P. and H. Reiser, *IL-4: role in disease and regulation of production*. Clin Exp Immunol, 1998. **113**(3): p. 317-9.
267. Piccinni, M.P., et al., *Role of hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines in successful pregnancy*. J Neuroimmunol, 2000. **109**(1): p. 30-3.

268. Piccinni, M.P., *T cells in pregnancy*. Chem Immunol Allergy, 2005. **89**: p. 3-9.
269. Suzuki, S. and S. Okudaira, *Maternal peripheral T helper 1-type and T helper 2-type immunity in women during the first trimester of twin pregnancy*. Arch Gynecol Obstet, 2004. **270**(4): p. 260-2.
270. Lin, H., et al., *Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface*. J Immunol, 1993. **151**(9): p. 4562-73.
271. Ezekowitz, R.A., et al., *Surface properties of bacillus Calmette-Guerin-activated mouse macrophages. Reduced expression of mannose-specific endocytosis, Fc receptors, and antigen F4/80 accompanies induction of Ia*. J Exp Med, 1981. **154**(1): p. 60-76.
272. Ezekowitz, R.A. and S. Gordon, *Down-regulation of mannosyl receptor-mediated endocytosis and antigen F4/80 in bacillus Calmette-Guerin-activated mouse macrophages. Role of T lymphocytes and lymphokines*. J Exp Med, 1982. **155**(6): p. 1623-37.
273. Pouliot, P., et al., *Alveolar macrophages from allergic lungs are not committed to a pro-allergic response and can reduce airway hyperresponsiveness following ex vivo culture*. Clin Exp Allergy, 2008. **38**(3): p. 529-38.
274. Sirois, J. and E.Y. Bissonnette, *Alveolar macrophages of allergic resistant and susceptible strains of rats show distinct cytokine profiles*. Clin Exp Immunol, 2001. **126**(1): p. 9-15.
275. Janeway, C.A., *Immunologie*. Spektrum Lehrbuch.
276. van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(1): p. 2-17.
277. Tang, C., et al., *Normally suppressing CD40 coregulatory signals delivered by airway macrophages to TH2 lymphocytes are defective in patients with atopic asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **107**(5): p. 863-70.
278. Dong, L., et al., *The activation of macrophage and upregulation of CD40 costimulatory molecule in lipopolysaccharide-induced acute lung injury*. J Biomed Biotechnol, 2008. **2008**: p. 852571.
279. Slavik, J.M., J.E. Hutchcroft, and B.E. Bierer, *CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families: signaling and function*. Immunol Res, 1999. **19**(1): p. 1-24.
280. Rutkowski, R., et al., *CD80 and CD86 expression on LPS-stimulated monocytes and the effect of CD80 and CD86 blockade on IL-4 and IFN-*

- gamma production in nonatopic bronchial asthma*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2003. **51**(6): p. 421-8.
281. Mondino, A. and M.K. Jenkins, *Surface proteins involved in T cell costimulation*. J Leukoc Biol, 1994. **55**(6): p. 805-15.
282. Crosby, J.R., et al., *Inhaled CD86 antisense oligonucleotide suppresses pulmonary inflammation and airway hyper-responsiveness in allergic mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **321**(3): p. 938-46.
283. Grewal, I.S. and R.A. Flavell, *CD40 and CD154 in cell-mediated immunity*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 111-35.
284. Vereyken, E.J., et al., *Classically and alternatively activated bone marrow derived macrophages differ in cytoskeletal functions and migration towards specific CNS cell types*. J Neuroinflammation, 2011. **8**: p. 58.
285. Löffler, G., *Biochemie und Pathobiochemie*.
286. Karp, G., *Molekulare Zellbiologie*.
287. Williams, L.M. and A.J. Ridley, *Lipopolysaccharide induces actin reorganization and tyrosine phosphorylation of Pyk2 and paxillin in monocytes and macrophages*. J Immunol, 2000. **164**(4): p. 2028-36.
288. Burridge, K. and K. Wennerberg, *Rho and Rac take center stage*. Cell, 2004. **116**(2): p. 167-79.
289. Siewe, L., et al., *Interleukin-10 derived from macrophages and/or neutrophils regulates the inflammatory response to LPS but not the response to CpG DNA*. Eur J Immunol, 2006. **36**(12): p. 3248-55.
290. Ananieva, O., et al., *The kinases MSK1 and MSK2 act as negative regulators of Toll-like receptor signaling*. Nat Immunol, 2008. **9**(9): p. 1028-36.
291. Costes, S., et al., *ERK1/2 control phosphorylation and protein level of cAMP-responsive element-binding protein: a key role in glucose-mediated pancreatic beta-cell survival*. Diabetes, 2006. **55**(8): p. 2220-30.
292. McBurney, M.W., et al., *The mammalian SIR2alpha protein has a role in embryogenesis and gametogenesis*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(1): p. 38-54.
293. Cheng, H.L., et al., *Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(19): p. 10794-9.

294. Aich, J., et al., *Resveratrol attenuates experimental allergic asthma in mice by restoring inositol polyphosphate 4 phosphatase (INPP4A)*. Int Immunopharmacol, 2012. **14**(4): p. 438-43.
295. Bergeron, C., W. Al-Ramli, and Q. Hamid, *Remodeling in asthma*. Proc Am Thorac Soc, 2009. **6**(3): p. 301-5.
296. Ichikawa, T., et al., *Sirtuin 1 activator SRT1720 suppresses inflammation in an ovalbumin-induced mouse model of asthma*. Respirology, 2013. **18**(2): p. 332-9.
297. Yamagata, T., et al., *Acetylation of GATA-3 affects T-cell survival and homing to secondary lymphoid organs*. EMBO J, 2000. **19**(17): p. 4676-87.
298. Ghosh, A.K. and J. Varga, *The transcriptional coactivator and acetyltransferase p300 in fibroblast biology and fibrosis*. J Cell Physiol, 2007. **213**(3): p. 663-71.
299. Kong, S., et al., *The type III histone deacetylase Sirt1 protein suppresses p300-mediated histone H3 lysine 56 acetylation at Bclaf1 promoter to inhibit T cell activation*. J Biol Chem, 2011. **286**(19): p. 16967-75.
300. Ho, I.C., et al., *Human GATA-3: a lineage-restricted transcription factor that regulates the expression of the T cell receptor alpha gene*. EMBO J, 1991. **10**(5): p. 1187-92.
301. Asselin-Labat, M.L., et al., *Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(2): p. 201-9.
302. Van Stry, M. and M. Bix, *Explaining discordant coordination*. Nat Immunol, 2011. **12**(1): p. 16-7.
303. Xia, J., et al., *SIRT1 deacetylates RFX5 and antagonizes repression of collagen type I (COL1A2) transcription in smooth muscle cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **428**(2): p. 264-70.
304. Li, P., et al., *Interferon gamma (IFN-gamma) disrupts energy expenditure and metabolic homeostasis by suppressing SIRT1 transcription*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(4): p. 1609-20.
305. Nie, Y., et al., *STAT3 inhibition of gluconeogenesis is downregulated by SirT1*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(4): p. 492-500.

306. Sestito, R., et al., *STAT3-dependent effects of IL-22 in human keratinocytes are counterregulated by sirtuin 1 through a direct inhibition of STAT3 acetylation*. FASEB J, 2011. **25**(3): p. 916-27.
307. Zhou, L. and D.R. Littman, *Transcriptional regulatory networks in Th17 cell differentiation*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(2): p. 146-52.
308. Al-Ramli, W., *TH17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma*. 2009.

6 Lebenslauf