Aus der Hautklinik und Poliklinik der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Die Beeinflussung einer Th2 Zell-vermittelten Immunantwort durch Interleukin-1α am Beispiel des murinen allergischen Asthmas

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
vorgelegt von

Daniel Teschner
aus Speyer

Mainz, 2010

Wissenschaftlicher Vorstand:	*aufgrund datenschutzrechtlicher Gründe gelöscht*
1. Gutachter:	*aufgrund datenschutzrechtlicher Gründe gelöscht*
2. Gutachter:	*aufgrund datenschutzrechtlicher Gründe gelöscht*
Tag der Promotion:	25. Februar 2010

Inhaltsverzeichnis **I - V**

Abkürzungsverzeichnis **VI - X**

1. Einleitung **1**

1.1 Die T-Zelle **1**
1.2 Das Th1/Th2- Konzept **3**
1.2.1 Allgemeines 3
1.2.2 Th1-vermittelte Immunantworten 5
1.2.3 Th2-vermittelte Immunantworten 6
1.2.4 Wann Th1, wann Th2? 6
1.3 Interleukin-1α **7**
1.3.1 Allgemeines 7
1.3.2 Die Rolle von Interleukin-1α im Th1/Th2- Konzept 10
1.4 Allergisches Asthma **11**
1.4.1 Allgemeines 11
1.4.2 OVA-induziertes allergisches Asthma im Mausmodell 13
1.5 Ziele der Dissertation **14**

2. Materialien **15**

2.1 Tiere **15**
2.2 häufig verwendete Medien **15**
2.3 Induktion des experimentellen Asthmas und Behandlung mit IL-1α **16**
2.4 Lungenentnahme **16**
2.5 Zellgewinnung **17**
2.6 Broncheoalveoläre Lavage (BAL) **18**

2.7 Kultivierung und Restimulation **18**

2.8 Cytospin **19**

2.9 FACS-Analyse **19**

2.9.1 Antikörper 19

2.9.2 sonstige Materialien 20

2.10 ELISA **21**

2.10.1 IL-4 ELISA 21

2.10.2 IL-10 ELISA 22

2.10.3 IFN-γ ELISA 22

2.10.4 IL-5 ELISA 22

2.10.5 IL-13 ELISA 23

2.10.6 allgemeine Materialien für ELISA 23

2.11 Verbrauchsmaterialien und sonstige Geräte **24**

2.11.1 Verbrauchsmaterialien 24

2.11.2 Behältnisse 25

2.11.3 Pipetten 25

2.11.4 Zentrifugen 26

2.11.5 Mikroskope und Kamera 26

2.11.6 Kühl- und Gefrierschränke 27

2.11.7 sonstige Geräte 27

3. Methoden **29**

3.1 Induktion des experimentellen Asthmas und Behandlung mit IL-1α **29**

3.2 Lungenentnahme **30**

3.3 Zellgewinnung **31**

3.3.1. Mechanische Separation mittels Medimachine 31

3.3.2. Mechanische Separation mittels Pinzette 31

3.3.3 Enzymatischer Verdau 31

3.3.4 Mechanische Separation mittels Spritze und Zellsieb 32

3.3.5 Erythrozytenlyse 32

3.3.6 Zellzählung 33

3.4 Gewinnung der BAL **33**
3.5 Kultivierung und Restimulation **34**
3.5.1 Restimulation mit OVA-Protein und OVA-Peptid 34
3.6 Cytospin **34**
3.6.1 Präparation der Cytospins 34
3.6.2 Färbung und Auswertung 35
3.7 FACS-Analyse **37**
3.7.1 FACS-Färbung 39
3.7.2 FACS-Messung und -Auswertung 40
3.8 ELISA **42**
3.8.1 IL-4 ELISA 44
3.8.2 IL-10 ELISA 44
3.8.3 IFN-γ ELISA 45
3.8.4 IL-5 ELISA 45
3.8.5 IL-13 ELISA 45
3.9 Statistische Auswertung **46**

4. Ergebnisse **47**

4.1 Methodenetablierung zur Zellgewinnung, -ausbeute und Restimulation **47**
4.1.1 Mechanische und enzymatische Prozessierung 47
4.1.2 Gesamtzahl der aus der Lunge bzw. BAL gewonnenen Zellen 47
4.1.3 Restimulation der isolierten Zellen mit OVA-Protein bzw. OVA-Peptid 48
4.2 Histologische Differenzierung mittels Cytospin **50**
4.3 FACS-Charakterisierung der gewonnenen Zellen **53**
4.4 Bestimmung der durch die gewonnen Zellen gebildeten Zytokine **58**
4.4.1 IL-4 58
4.4.2 IL-5 59
4.4.3 IL-10 60
4.4.4 IL-13 60
4.4.5 IFN-γ 61

4.5 Zusammenfassende, abschließende Betrachtung der Ergebnisse **63**
4.5.1 Ergebnisse der Cytospins 63
4.5.2 Ergebnisse der Durchflusszytometrie 63
4.5.3 Ergebnisse der ELISAs 64

5. Diskussion **67**

5.1 Einführung **67**
5.2 Interpretation der Ergebnisse bezüglich der Zellisolation, Restimulation und dem Vergleich gesamte Lunge versus BAL **68**
5.2.1 Gewinnung inflammatorischer Zellen aus der gesamten Lunge 68
5.2.2 Unterschiede in der Restimulation mit OVA-Protein bzw. -Peptid 70
5.2.3 Vergleich des Untersuchungsmaterials gesamte Lunge versus BAL 71
5.3 Inwieweit wird die immunologische Reaktion durch den Einsatz von IL-1α beeinflusst? **74**
5.3.1 Allgemeines 74
5.3.2 Effekte auf die Zelluläre Zusammensetzung 76
5.3.2.1 Interpretation der mittels Cytospin generierten Daten 76
5.3.2.2 Interpretation der Ergebnisse der Durchflusszytometrie 78
5.3.2 Interpretation der gemessenen Zytokinmuster 81
5.3.3 Zusammenfassende Betrachtung der Effekte durch IL-1α 83
5.4 Vergleich mit ähnlichen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe **86**
5.5 Ausblick **87**

6. Zusammenfassung **89**

7. Literaturverzeichnis **91**

8. Anhang **127**

8.1 Abbildungsverzeichnis **127**

8.2 Tabellenverzeichnis **128**

8.3 Danksagung **129**

8.4 Lebenslauf **130**

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ACK	Ammonium-Chloride lysing buffer
AHR	airway hyperesponsibility
Ak	Antikörper
Alum	Aluminium Potassium Sulfat
APC	Antigen presenting cell(s)
BSA	Bovines Serum-Albumin
°C	Grad Celsius
CC	chemotaktisches Chemokin
CCR	chemotaktischer Chemokin Rezeptor
CD	Cluster of differentiation (üblicherweise von Ziffer gefolgt)
cm	Zentimeter
CO_2	Kohlendioxid
CpG	Cytosin-Guanosin-Dinukleotid
CTL	Cytotoxic T lymphocytes
CSIF	Cytokine synthesis inhibitory factor = IL-10
CXCR	Alpha Chemokine Receptor
DC	Dendritic cell(s)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immuno-sorbent assay
ELAM	endothelial-leukocyte adhesion molecule
Fab	Fragment antigen-binding
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FAS	Apoptosis Stimulating Fragment
Fc	Fragment crystallizable
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	Forward scatter (FACS)
g	Gravitation / x-faches der Erdbeschleunigung (9,81 m/s2)

G	γ-Hydroxybutyrat
H	Wasserstoff
H_2O	Wasser
H_2SO_4	Schwefelsäure
H_3PO_4	Phosphorsäure
HCl	Salzsäure
HRP	Horseradish Peroxidase
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IFN-γ	Interferon-γ
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin (üblicherweise von Ziffer gefolgt)
IL-1α	Interleukin-1α
IL-1β	Interleukin-1β
IL-1RA	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
IL-1RI	Interleukin-1 Rezeptor I
IL-1RII	Interleukin-1 Rezeptor II
IL-1RrP	Interleukin-1 Receptor related protein
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
i.p.	intraperitoneal
kDa	Kilodaltons
l	Liter
L. m.	*Leishmania major*
LFA	Lymphocyte Function Associated Antigen
LPG	Lipophosphoglykane
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
M.	Mykobakterium
M.	Morbus
MBP	myelobasisches Protein
MCF	Macrophage chemotactic factor
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
mg	Milligramm

MHC	Major histocompatibility complex
MHC-I	Major histocompatibility complex class I
MHC-II	Major histocompatibility complex class II
min	Minuten
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Milli-Mol
mTEC	medullare Thymusepithelzelle
N	1 molar
NaCl	Natriumchlorid
NaH_2PO_4	Natriumhydrogenphosphat
$NaHCO_3$	Natriumhydrogenkarbonat
NaN_3	Natriumazid
ng	Nanogramm
NK	Natural killer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
OVA	Ovalbumin (Albumin aus Hühnereiern)
p	p-Wert des student's-*t*-test
PBS	Phosphate Buffer Solution
PE	Phycoerythricin
PFA	Paraformaldehyd
PGE	Prostaglandin E
pH	pondus Hydrogenii
PMN	Polymorphonuclear Neutrophils
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Medium)
SEB	Staphylococcal Enterotoxin B Fragment
SEM	Standard error of the mean
spp.	*Species*
Stck.	Stück
TCR	T cell receptor
TDI	Toluene Diisocyanat

TdT	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
Th	T Helfer Zelle(n)
Th0	T Helfer Zelle(n) Typ 0
Th1	T Helfer Zelle(n) Typ 1
Th2	T Helfer Zelle(n) Typ 2
Th3	T Helfer Zelle(n) Typ 3, regulatorische T-Zelle
Th17	T Helfer Zelle(n) Typ 17, Interleukin-17 produzierend
TMB	Tetramethylbenzidine
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-α
TNF-β	Tumor Nekrose Faktor-β
Treg	regulatorische T-Zelle
U	units
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
WHO	World health organisation
ZNS	zentrales Nervensystem
ZVTE	Zentrale Versuchstiereinrichtung

1. Einleitung

1.1 Die T-Zelle

Wenn man sich das Immunsystem von Säugetieren betrachtet, so kann man dieses grob in eine angeborene unspezifische Immunität („innate immunity“) und eine erworbene spezifische Abwehr („adaptive immunity“) differenzieren [1].
Zur angeborenen Immunität zählen neben physikalischen Barrieren wie Epithelien, Mukus etc. vor allem das Komplementsystem und phagozytierende Zellen, wie z. B. Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Letztere erkennen ein in den Organismus eindringendes Pathogen mittels spezieller, mustererkennender Rezeptoren (pattern-recognition receptors, PRR), welche auf die Wahrnehmung von hochkonservierten, pathogenen Zielstrukturen, wie etwa Lipopolysacchariden (LPS), Peptidoglykanen (PG), Lipoteichonsäuren (LTA), bakterielle DNA und doppelsträngige RNA spezialisiert sind. Nach Antigenkontakt kommt es zu einer unmittelbaren Abwehrreaktion; die Fähigkeiten hierzu sind bereits in der Keimbahn genetisch verankert und stehen somit mit der Geburt zur Verfügung [2-5].

Über den Mechanismus der Antigenpräsentation via Haupthistokompatibilitätskomplexen (major histocompatibility complex class II, MHC-II) und die Sekretion von Zytokinen und Mediatoren interagieren die Zellen der innaten Abwehr mit dem erworbenen Immunsystem [6]. Dieses beinhaltet als Haupteffektorzellen die B- und T-Lymphozyten, welche im Unterschied zu den Zellen der innaten Immunität nicht über ein breites Repertoire von PRRs verfügen, sondern jeweils auf die Erkennung einer einzigen Antigenstruktur mittels spezifischer Rezeptoren spezialisiert sind [7]. Die Hauptaufgabe der B-Zellen besteht in der Antigenerkennung und Antikörperproduktion.

Reife T-Zellen lassen sich in CD8-positive, zytotoxische T-Zellen (CTL) und CD4-positive T-Helferzellen einteilen. Beiden Gruppen gemein ist ein ausgefeiltes Muster an Oberflächenmolekülen. Besonders hervorzuheben ist hier der T-Zell-Rezeptorkomplex (TCR), ein Molekül, welches aus mehreren Untereinheiten besteht (u.a. CD3 und CD4 bzw. CD8) und für die Interaktion mit Körperzellen und antigenpräsentierenden Zellen (APC) verantwortlich ist. CTL erkennen mit ihrem TCR die von Körperzellen via MHC-I

präsentierten Antigene, welche z. B. auf eine intrazelluläre Infektion der Zelle mit Viren oder speziellen Bakterien (Listerien, Chlamydien) oder eine maligne Entartung der Zelle hinweisen, und zerstören diese mittels Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose) [8-10]. Der TCR der T-Helferzellen interagiert vornehmlich mit APCs über den MHC-II [11,12]. Ein weiteres wichtiges Oberflächenpeptid stellt der CD28-Rezeptor dar, welcher durch den Kontakt mit den kostimulierenden Molekülen CD80 und CD86 (auch B7.1 und B7.2) entscheidend für eine Aktivierung der T-Zellen ist [13-15]. Um aus der Blutbahn ins Zielgewebe zu migrieren (Rolling und Diapedese), nutzen die T-Zellen den LFA-1-Rezeptor, welcher mit dem endothelständigen ICAM-1 interagiert [16].

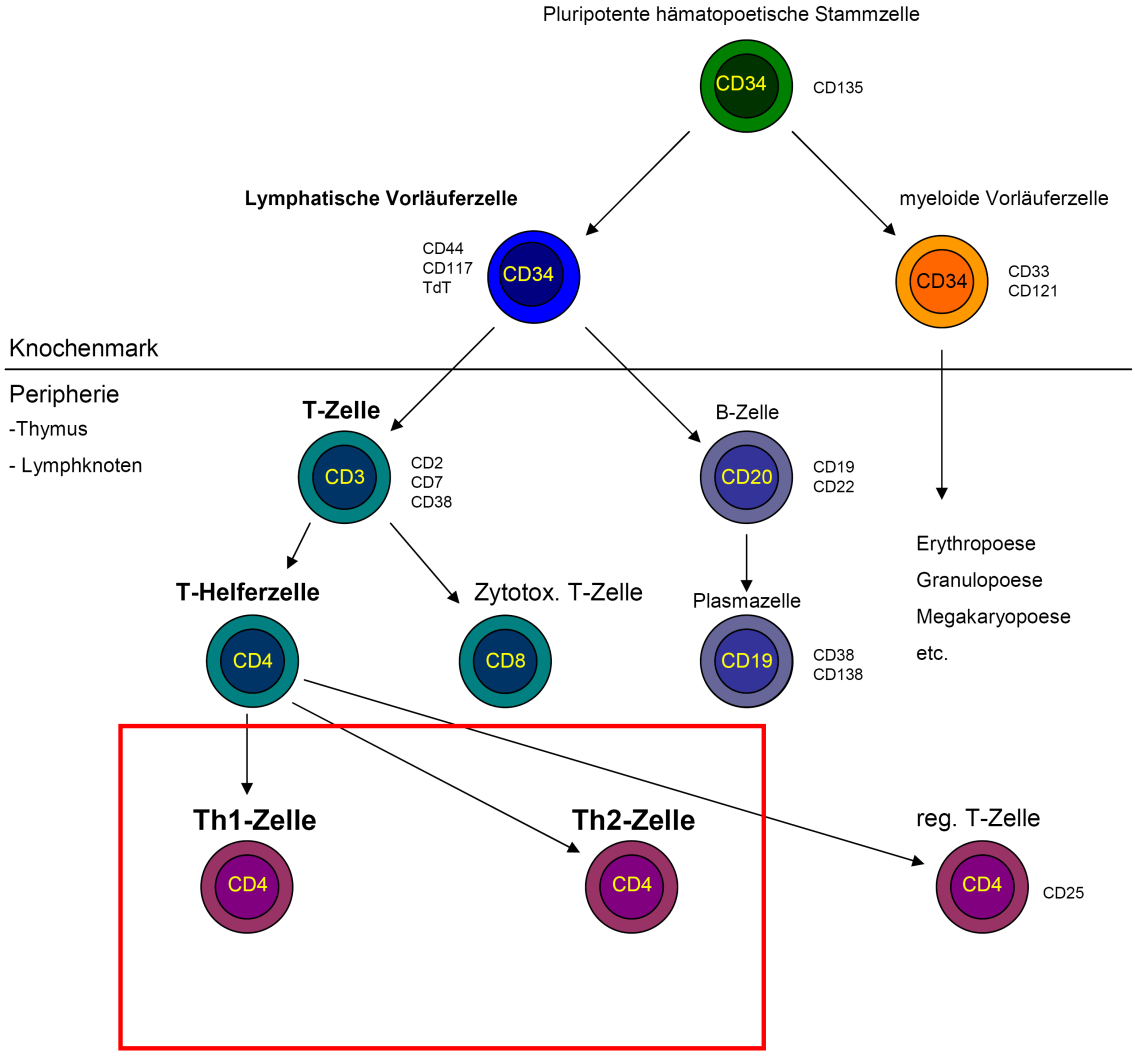

Abb. 1.1: Ontogenese der T-Helferzelle

1.2 Das Th1/Th2-Konzept

1.2.1 Allgemeines

Wie erwähnt wechselwirkt der TCR der CD4-positiven T-Helferzellen im Unterschied zu den CTL mit dem MHC-II, welcher auf APCs exprimiert wird und der Präsentation zuvor prozessierter Antigene dient. Abhängig von der erforderlichen Immunantwort ist es den T-Helferzellen möglich mit einer Aktivierung der zellulären Abwehr (z. B. Makrophagen) zu reagieren, oder eine humoral getragene Abwehr über die Aktivierung von B-Zellen zu initiieren. Diese Mechanismen sind in dem Modell des Th1/Th2-Paradigmas zusammengefasst und werden im folgenden Abschnitt ausführlich beschrieben [17,18].

Mitte der achtziger Jahre wurden zwei unterschiedliche Populationen von T-Helferzellen beschrieben, welche sich durch ihr unterschiedliches Zytokinprofil charakterisieren ließen. Grundlage dieses seither viel beforschten Th1/Th2-Paradigmas ist die Annahme, dass sich unstimulierte T-Helferzellen (Th0) abhängig von den Umgebungsbedingungen in T-Helferzellen vom Typ 1 (Th1) oder T-Helferzellen vom Typ 2 (Th2) differenzieren können. Die Entscheidung, welchen Weg die Th0-Zelle einschlägt, wird dabei von der genetischen Disposition des beherbergenden Organismus, von der Art der Antigenpräsentation und vom Zytokinmilieu bestimmt [19-21].
Erkennt beispielsweise eine dendritische Zelle (DC) eine mit intrazellulären Erregern infizierte Körperzelle (z. B. über die Wechselwirkung von Toll-like-Rezeptor 9 und den Cytosin/Guanin-Motiven bakterieller DNA), so aktiviert sie über die Interaktion von MHC-II und TCR und die erforderliche zusätzliche Kostimulation (CD28 und CD80/CD86) die Th0-Zelle und sezerniert außerdem IL-12 und IL-18. Beide Zytokine bewirken eine präferentielle Differenzierung der Th0 zu einer Th1-Zelle, welche wiederum INF-γ, TNF-α und IL-2 produziert und damit ihre Proliferation und Reifung zusätzlich stimuliert. Über INF-γ erfolgt zusätzlich eine Suppression der Th2-Differenzierung. Die nun einsatzbereite Th1-Zelle aktiviert vornehmlich die zelluläre Abwehr und kurbelt beispielsweise die NO-Synthese in Makrophagen an, welche diese befähigt phagozytierte Erreger zu zerstören.
Das Schlüsselzytokin zur Th2-Determinierung ist IL-4 und wird vornehmlich von Th2-Zellen selbst, basophilen und eosinophilen Granulozyten, Mast- und NK-Zellen gebildet. Auslöser

für eine IL-4 Produktion ist u. a. die Stimulation durch extrazelluläre Antigene, wie z. B. Fremdeiweiße und andere Allergene. IL-4 hemmt die Th-Differenzierung und bewirkt eine Reifung und Proliferation der Th2-Zellen, welche ihrerseits zusätzlich zu IL-4 u. a. noch IL-5, IL-10 und IL-13 sezernieren. Des Weiteren begünstigt IL-4 das Wachstum von Mastzellen und die Migration von eosinophilen Granulozyten, es aktiviert B-Zellen und fördert unter anderem die Synthese von IgE [22-24].
Das durch Th2-Zellen gebildete IL-5 ist ein entscheidender Faktor für die Entstehung, Reifung und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten [25]. IL-10 werden mehrere Funktionen zugeschrieben: Zum Einen aktiviert es die Th2-Zellen und bremst die Produktion von Th1-Zytokinen, zum Anderen wird es auch von Tregs gebildet und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Immunsystems [26-28].
Ähnlich wie IL-4 schreibt man IL-13 eine Bedeutung bei der Antikörpersynthese durch B-Zellen zu. Unter dem Einfluss beider Zytokine kann es zu einem Antikörperklassenwechsel in Richtung IgE kommen. Zusätzlich spielt IL-13 eine Rolle bei der Mukusproduktion und der Entwicklung eines erhöhten Atemwegswiderstandes (AHR) in der Lunge [29-32].
Zusammenfassend bewirkt eine Dominanz der Th2-Immunantwort als Reaktion auf ein extrazelluläres Antigen eine Verstärkung der humoralen Abwehr und stimuliert die Entstehung und Aktivität von eosinophilen und auch basophilen Granulozyten.

Als eine spezielle Untergruppe der T-Helferzellen sind die regulatorischen T-Zellen (Treg, auch Th3-Zellen, CD4/CD25-positiv) zu erwähnen. Mittels ihres vorherrschenden Zytokins TGF-β dienen sie unter anderem der Suppression von Immunantworten (vor allem T-Zell-Reaktionen) und sind vornehmlich in Schleimhäuten zu finden [33].

Abschließend sei noch auf die Existenz der kürzlich entdeckten Th17-Zellen hingewiesen. Ihre Entstehung und Entwicklung wird durch die Zytokine IL-6, TGF-β, IL-21, IL-1 und IL-23 gesteuert und sie produzieren IL-17, IL-21 und IL-22 [34,35]. Funktionell scheinen sie bei autoimmunologischen Phänomenen eine Rolle zu spielen [36,37].

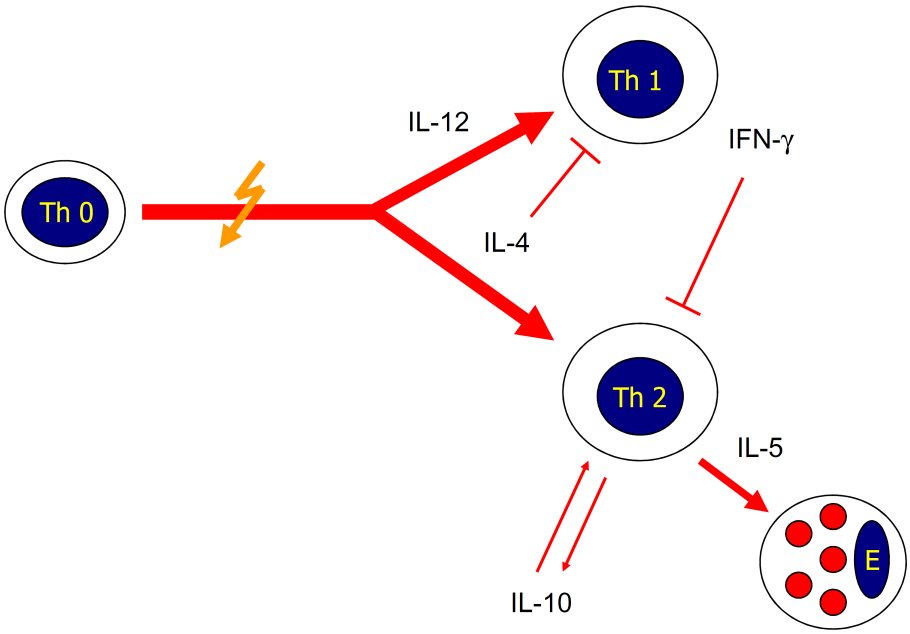

Abb. 1.2: Th1/Th2-Differenzierung

1.2.2 Th1-vermittelte Immunantworten

Bei der Betrachtung des Th1/Th2-Paradigmas ist es unzulässig, von reinen Th1- oder Th2-Immunantworten zu sprechen, da in einem funktionierenden Immunsystem immer beide Arten der Th-Reaktion koexistieren. Bei einigen Erkrankungen ist allerdings ein Überwiegen der Th1- oder Th2-vermittelten Abwehr ein wesentlicher Bestandteil der Pathophysiologie, daher dienen sie als Modellerkrankungen.

Ein Beispiel für eine Th1-assoziierte Erkrankung ist der Morbus Crohn (Colitis granulomatosa). Hier konnten erhöhte Werte der Th1-Zytokine TNF-α, IL-12 und IL-18 in der betroffenen Darmmukosa nachgewiesen werden. Experimentelle Ansätze mit monoklonalen Antikörpern gegen oben genannte Zytokine zeigen vielversprechende Ergebnisse und untermauern die Hypothese einer tragenden Rolle der Th1-Zellen bei der Krankheitsentstehung [38-40]. Neueste Erkenntnisse zeigen, dass neben Th1-Lymphozyten auch Tregs und proinflammatorische Th17-Zellen eine Rolle in der Pathogenese des M. Crohn spielen. Im Rahmen von Genomanalysen konnte ein Zusammenhang zwischen Genen, welche bei der Th17-Differenzierung involviert sind, und der Empfindlichkeit gegenüber M. Crohn und teilweise auch gegenüber der Colitis ulcerosa hergestellt werden [41].

1.2.3 Th2-vermittelte Immunantworten

Eine pathologische Dominanz der Th2-Immunantwort wurde unter anderem bei Erkrankungen des allergischen Formenkreises, wie der atopischen Dermatitis und dem Asthma bronchiale beschrieben, letzteres wird im Abschnitt 1.4 ausführlich erläutert. Bei der atopischen Dermatitis lassen sich in frühen Läsionen erhöhte Anteile von Th2-Zellen nachweisen. Diese produzieren IL-4 und andere Th2-Zytokine, wodurch konsekutiv die Th1-Immunität gehemmt wird, infolgedessen es gehäuft zu Superinfektionen der entzündeten Haut kommt [42-45].
Zu erwähnen ist außerdem beispielhaft der systemische Lupus erythematodes, ein Leiden, bei welchem es Th2-vermittelt zu der Bildung von antinukleären und gegen doppelsträngige DNA gerichteten Antikörpern kommt. Besonders im Stadium IV lassen sich erhöhte Spiegel des Th2-Zytokins IL-10 nachweisen und im Verhältnis supprimierte Konzentrationen von IFN-γ messen [46-48].

1.2.4 Wann Th1 und wann Th2?

Abschließend sei noch erwähnt, dass die Einordnung von ausgewählten Erkrankungen anhand der zugrunde liegenden Th-Zell-Immunität keinen starren Gesetzmäßigkeiten folgt. Vielmehr ist zu beachten, dass wie unter 1.2.1 beschrieben vielfältige Faktoren zur Bevorzugung einer Th-Zell-Antwort beitragen. So ist z. B. die miliare Form der Tuberkulose tendenziell mit einer Th2-Immunantwort vergesellschaftet, wohingegen eine Lymphknotentuberkulose eine Th1-Zell-Reaktion induziert. In Untersuchungen an Tuberkulose-Patienten konnte gezeigt werden, dass bei klinisch manifest Erkrankten häufig eine Minderung der Th1-Reaktivität nachgewiesen werden kann, was allerdings nicht zwangsläufig mit einer gegenläufigen Verstärkung der Th2-Immunität einhergeht [49]. Nach Kontakt mit *M. tuberculosis* hat die Dominanz von Th1 oder Th2 demnach einen entscheidenden Einfluss auf den Krankheitsverlauf: Ein Überwiegen von Th1 hilft den Erreger suffizient zu bekämpfen, Th2 bewirkt dagegen tendenziell ein Fortschreiten der Infektion [50].
Bei der Leishmaniasis ist die Th-Zell-Antwort vom genetischen Hintergrund des befallenen Organismus abhängig. So reagiert im Tierexperiment die überwiegende Zahl von

Mausstämmen (inklusive C57BL/6) mit einer protektiven und effektiven Th1-vermittelten Immunreaktion auf eine Infektion mit *Leishmania major*. Mäuse mit BALB/c Hintergrund dagegen zeigen stärkere klinische Manifestationen der Erkrankung und sterben unbehandelt nach Progress, welches einem stärkeren Gewicht der Th2-Zellen geschuldet ist [51-53].

Neben der Erbanlage entscheidet auch die Art der Antigen-Präsentation über die Ausrichtung der Immunantwort. So ist es beschrieben, dass Th-Zellen nach Restimulation mit B-Zellen höhere Raten an IFN-γ sezernieren, wohingegen eine Restimulation durch Makrophagen eine höhere Sekretion von IL-4 zu Folge hat [54]. Prinzipiell ist es aber beiden APC möglich, eine Th1- oder Th2-Immunantwort zu induzieren oder zu verstärken [55]. Die Reaktion des Organismus auf ein bestimmtes Antigen unterliegt offensichtlich einem evolutionären Prozess und die Effektivität bzw. der Überlebensvorteil, welcher eine bestimmte Immunantwort gegenüber dem Antigen bietet, entscheidet über deren präferentielle Vererbung.

1.3 Interleukin-1α

1.3.1 Allgemeines

Interleukin-1α (IL-1α) gehört zur IL-1 Familie, deren engster Kreis aus IL-1α, IL-1β, und dem IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1RA) besteht und wird von einer eigenständigen genetischen Region kodiert. Bei der Translation wird zunächst ein aus 271 Aminosäuren bestehendes und 33 kDA schweres Prozytokin (IL-1αPre) synthetisiert. Mittels enzymatischer Spaltung durch eine Protease (Calpain) entsteht daraus neben einer Prosequenz das biologisch aktive 17 kDa schwere und aus 159 Aminosäuren bestehende Zytokin.
IL-1αPre verbleibt überwiegend intrazellulär und wird im Zytosol assoziiert mit Zytoskelett-Strukturen (Mikrotubuli) vorgefunden [56]. Immunhistochemische Markierung LPS-stimulierter humaner Makrophagen mit einem IL-1α Antikörper zeigt eine gleichmäßige, diffuse Anfärbung von Zellen [57]. Normalerweise bleibt IL-1αPre auch nach starker Stimulierung zellassoziiert [58]. Im Falle des Zelltodes kann es freigesetzt und durch extrazelluläre Proteasen gespaltet werden [59]. Ein kleiner Teil des IL-1αPre wird in humanen und murinen Monozyten und Makrophagen zur Oberfläche der Zellen transportiert,

wo dieses Protein (vermutlich durch Mannose-spezifische Interaktion mit Lektinen) verankert wird [60-62]. Auch humane glatte Gefäßmuskelzellen exprimieren IL-1α auf der Zell-Oberfläche [63]. Dieses membrangebundene IL-1α wird als autokriner Stimulator betrachtet, der möglicherweise zur Aktivierung von Nachbarzellen beitragen kann und somit eine Rolle bei lokalen Entzündungsprozessen spielt. Ebenfalls wird vermutet, dass IL-1α intrazelluläre Funktionen besitzt. So konnte gezeigt werden, dass ein IL-1αPre/IL-1 Rezeptor Komplex an DNA im Kern bindet [64]. Innerhalb der ersten 115 Aminosäuren der IL-1α Vorstufe wurde eine Kernlokalisierungssequenz gefunden [65]. Transfektion von Endothelzellen mit einem Plasmid, das diese Sequenz enthielt, führte zur Lokalisation des entsprechenden IL-1α im Kern und zur Beeinflussung der Proliferation der Zellen. Auch radioaktiv markiertes, rekombinantes, matures IL-1α konnte als Komplex mit dem IL-1RI kernassoziiert gefunden werden [66,67].

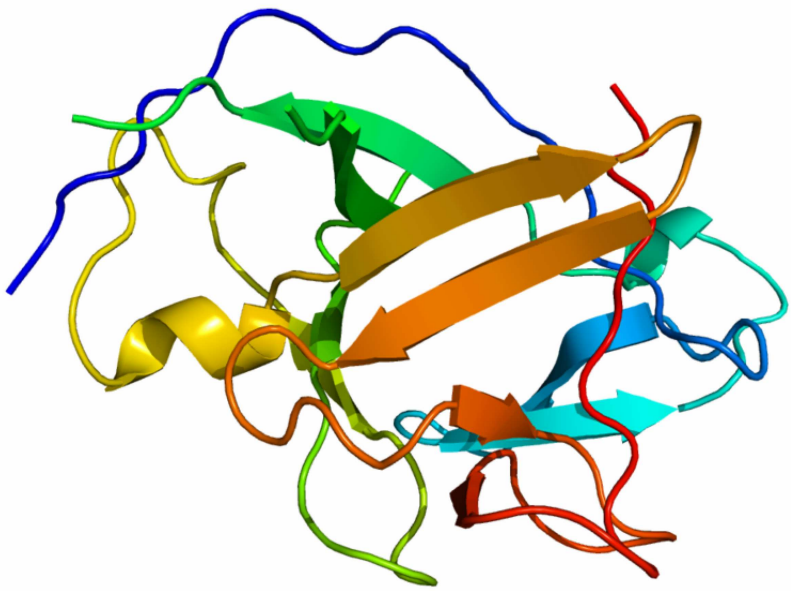

Abb. 1.3: Interleukin-1α, Tertiärstruktur (Quelle: Wikipedia, the free encyclopedia, „Crystal structure of IL-1α“, Copyright released into public domain, 2008)

Von einer Vielzahl weiterer Zellen ist bekannt, dass sie IL-1α exprimieren können, so wurde eine Produktion u. a. bei Astrozyten, Alveolarzellen Typ II, T-Zellen und DC beschrieben. IL-1α interagiert präferentiell über ein IL-1-Rezeptor akzessorisches Protein (IL-1RAcP) mit dem IL-1-Rezeptor Typ I (IL-1RI, auch CD121a), des Weiteren besteht eine Affinität zu dem IL-1-Rezeptor Typ II (IL-1RII, auch CD121b) [68,69].

Funktionell spielt IL-1α eine entscheidende Rolle bei lokalen und systemischen Entzündungen. So induziert es beispielsweise bei Endothelzellen die Sekretion chemotaktischer Zytokine, wie MCP-1, und fördert die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, welche die Diapedese und Migration von T-Zellen in das entzündete Gewebe erleichtern. In inaktiven Monozyten stimuliert IL-1α seine eigene Produktion und verstärkt damit seine inflammatorischen Effekte. Über die Wirkung auf zentrale hypothalamische Regionen beeinflusst es die Thermoregulation und hat eine pyrogene Wirkung (Fieber). Bei der Sekretion von IFN-γ spielt IL-1α ebenfalls eine entscheidende Rolle; so wurde zum Beispiel bei NK-Zellen eine Induktion der IFN-γ-Sekretion durch IL-1α gemeinsam mit IL-12 beschrieben [70,71].

IL-1α bzw. IL-1 ist bei der Entstehung und Manifestation von speziellen Erkrankungen maßgeblich beteiligt. So besteht beispielsweise bei der rheumatoiden Arthritis ein ständiger IL-1-Überschuß in der Synovia und die Plasma-Konzentration von IL-1 korreliert mit der systemischen Krankheitsaktivität [72-74].
Ähnlich verhält es sich bei der Psoriasis. Der Erkrankung zugrunde liegt eine Zytokindysregulation, wobei die freigesetzten proinflammatorischen und wachstumsfördernden Zytokine gemeinsam mit IL-1 die T-Zell-APC-Interaktion und die Aktivität der Immunzellen stimulieren. Zusätzlich aktiviert IL-1 Fibroblasten und steigert die Adhäsion zwischen Endothelzellen und Leukozyten, was zu einem Eindringen der Leukozyten in die psoriatische Haut führt. In normaler Haut besteht ein Verhältnis von IL-1α zu IL-1β von 40:1. In psoriatischer Haut besteht aufgrund der IL-1α-Reduktion und der IL-1β-Steigerung ein Verhältnis von IL-1α zu IL-1β von 1:1. Jedoch ist auch das IL-1β der psoriatischen Läsionen inaktiv und es ist ausschließlich das IL-1α für die biologische Aktivität verantwortlich, obwohl es reduziert ist [75].

1.3.2 Die Rolle von Interleukin-1α im Th1/ Th2- Konzept

Im Zusammenhang mit dem Th1/Th2-Paradigma werden für IL-1α mehrere Effekte postuliert. Wie unter 1.3.1 bereits erwähnt wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass unterschiedliche Mausstämme mit einer differenten Th-Zell-Antwort auf eine Infektion mit *Leishmania major* reagieren. Verantwortlich hierfür scheint eine im Vergleich zu der Sekretion durch DCs aus C57BL/6-Mäusen erniedrigte Produktion von IL-1β durch aktivierte BALB/c DCs zu sein [76]. Zeitgleich kann man beobachten, dass für eine effektive Th1-Differenzierung in BALB/c Tieren (welche präferentiell eine Th2-Immunantwort ausbilden, siehe 1.3.1) aus APCs stammendes IL-1α und TNF-α gemeinsam mit IL-12 vonnöten war, wohingegen Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund lediglich IL-12 zur Entwicklung einer effektiven immunologischen Th1-Reaktion benötigten [77]. Unabhängig davon wird bei DCs aus BALB/c Mäusen ein geringeres Maß an IL-1α-Sekretion als bei DCs aus C57BL/6 Tieren gefunden [78]. Werden BALB/c Mäuse unter Infektion mit *Leishmania major* zusätzlich mit IL-1α behandelt, so lässt sich beobachten, dass eine Behandlung während der Th-Zell Differenzierung zu einer verstärkten Ausbildung einer protektiven Th1-Immunantwort führt. Wird IL-1α über die initiale Phase hinaus appliziert, so verschlechterte sich der Krankheitsverlauf, was einer Betonung der Th2-Zell-Reaktion anzulasten ist [79].

Zusammenfassend kann man ableiten, dass IL-1α zu unterschiedlichen Zeiten auf unterschiedliche Zellen wirkt. So gibt es Hinweise, dass in der frühen Phase einer Infektion IL-1α eine vorrangige Differenzierung der Th0-Zellen (über IL-1RI) zu Th1 bewirkt. Zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt besteht offenbar eine verstärkte Wechselwirkung mit Th2-Zellen (ebenfalls über IL-1RI), bei welchen es durch IL-1α zu einer Verstärkung ihrer eigenen Proliferation und Aktivierung zu kommen scheint [80-84].

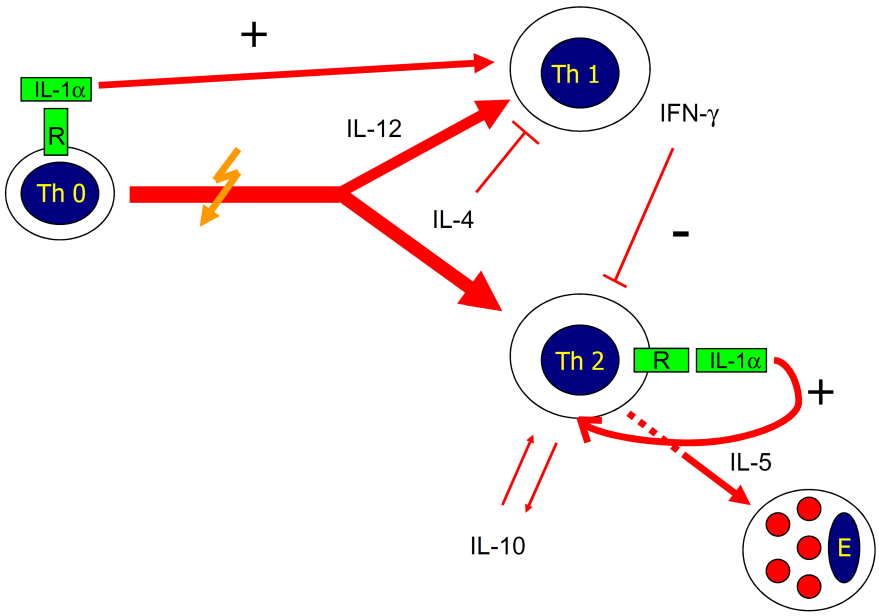

Abb. 1.4: Der Einfluss von IL-1α auf die Th-Zell-Differenzierung

1.4 Allergisches Asthma

1.4.1 Allgemeines

Asthma bronchiale, kurz Asthma, gilt als die häufigste chronisch-entzündliche Erkrankung des Menschen. Die Prävalenz ist regional sehr unterschiedlich, in Deutschland sind etwa 5 Prozent der erwachsenen und etwa 10 Prozent der kindlichen Bevölkerung betroffen. Ätiologisch kann man das nicht-allergische (intrinsische) Asthma, welches z. B. durch Infektionen oder durch Medikamente getriggert wird, vom allergischen (extrinsischen) Asthma unterscheiden [85]. Die folgenden Aussagen beziehen sich ausschließlich auf das allergische Asthma.

Pathogenetisch handelt es sich beim allergischen Asthma um eine allergische Reaktion vom Soforttyp (Typ I nach Coombs und Gell). Nach Aufnahme und Prozessierung des Allergens durch APCs kommt es unter Beteiligung von IL-13 über eine Th2-vermittelte-Reaktion zur B-Zell-Aktivierung (Vgl. Abschnitt 1.2.3). Die B-Zellen differenzieren sich zu Plasmazellen, welche allergenspezfisches IgE synthetisieren. Die Antikörper binden an spezifische Oberflächenrezeptoren von APCs, Mastzellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten und

mediieren bei erneutem Allergenkontakt eine spontane IgE-vermittelte Degranulation der Mastzellen und Granulozyten, wobei unter anderem Histamin, Prostaglandine, Leukotriene und „typische“ Th2-Zytokine ausgeschüttet werden [86-89]. Unter Beteiligung des Th2-Zytokins IL-4 erfolgt eine Hochregulation des membranständigen Integrins VCAM-1, welche die Adhäsion von Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten begünstigt. Daneben fördern IL-4 die Expression von Eotaxin, ein auf (unter anderem durch IL-5 aktivierte) eosinophile Granulozyten chemotaktisch wirkendes Chemokin [90,91]. In der Summe initiieren die Entzündungsmediatoren eine erhöhte vaskuläre Permeabilität, wirken chemotaktisch auf weitere Immunzellen und „befeuern“ die Th2-Kaskade. Die Inflammation führt zu einem Ödem der Bronchialwand, eine pathologisch erhöhte Mukussekretion setzt ein (Hyper- und Dyskrinie, v. a. IL-13 vermittelt) und es kommt zur Konstriktion der glatten Bronchialmuskulatur. Letztendlich führen diese Mechanismen zur Erhöhung des Atemwegswiderstandes (AHR) und somit zu Dyspnoe mit typischem exspiratorischen Stridor [92,93]. Interessanterweise gibt es Hinweise, dass es an den Endothelien unter dem Einfluss von IL-1 zu einer supprimierten Ausbildung der Adhäsionsmoleküle ICAM und ELAM kommt und damit das „Andocken“ und die Diapedese von Lymphozyten behindert wird [94].

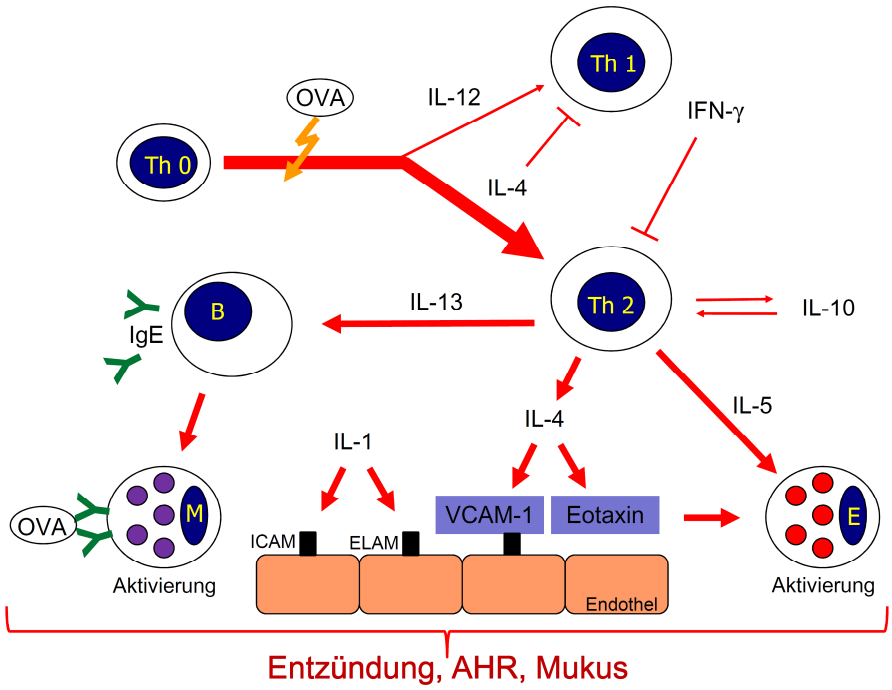

Abbildung 1.5: Pathogenese des allergischen Asthmas (nach Hamelmann, „Mechanismus der Allergen-induzierten Ausbildung von Atemwegs-Entzündung und –Hyperreaktivität“, 2002)

1.4.2 OVA-induziertes allergisches Asthma im Mausmodell

Als Th2-vermittelte Erkrankung ist das allergische Asthma hervorragend geeignet, um die immunologischen Vorgänge einer Th2-Zell-vermittelten Abwehrreaktion zu untersuchen. Gut untersuchte Modellallergene wie Ovalbumin ergänzen diesen Ansatz und werden häufig zur Induktion allergischer Reaktionen verwendet [95].

Um die Pathogenese und Pathophysiologie des allergischen Asthmas besser untersuchen zu können, wurden Tiermodelle entwickelt, mit deren Hilfe Fragestellungen angegangen werden können, die aus ethischen oder praktischen Gründen so nicht im Menschen untersucht werden können. Jedes Tiermodell leidet natürlich immer unter der eingeschränkten Übertragbarkeit der erhobenen Daten auf die klinische Situation im Patienten.

Größere Tierarten bieten sich besonders für Fragen zur Atemmechanik und respiratorischen Physiologie an [96,97]. Fragen zur Pathophysiologie und Intervention der Atemwegs-Entzündung können aber sehr viel kostensparender an kleineren (Nage-) Tieren untersucht werden [98,99]. Als Modellorganismus hat sich daher in den vergangenen Jahren die Maus etabliert, da sich in ihr die immunologischen Mechanismen dank einer breiten Palette an immunologischen Verfahren und Techniken gut und verhältnismäßig kosteneffektiv charakterisieren lassen [100-105].

Seit der Vorstellung der OVA-basierten Induktion von allergischen pulmonalen Entzündungen in der Maus Anfang der neunziger Jahre [106], hat sich dieses Tiermodell zu einem festen Bestandteil der immunologischen Untersuchung des allergischen Asthmas gemausert. Das ursprüngliche Protokoll wurde zu mehreren Varianten fortentwickelt und viele Erkenntnisse und Ergebnisse bezüglich der immunologischen Vorgänge beim allergischen Asthma wurden auf der Basis dieser Methoden gewonnen [107].

1.5 Ziele der Dissertation

Dass IL-1α eine bedeutende Rolle in der Regulation der T-Zell-Immunität spielt, konnte unter anderem unsere Arbeitsgruppe für das Modell der kutanen Leishmaniasis bereits zeigen [78,79]. Die genauen Mechanismen der Beeinflussung der T-Zellantwort durch IL-1α sind allerdings weiterhin unklar.

Ziel meiner Arbeit war es, die Erkenntnisse aus den Vorarbeiten in das Modell des murinen allergischen Asthmas als Th2-abhängige Erkrankung zu übertragen und insbesondere den Einfluss von IL-1α auf den Krankheitsverlauf zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu untersuchen. Folgende Arbeitsschritte hatte ich daher definiert:

1. Etablierung eines Tiermodells für eine Th2-abhängige Immunantwort unter Verwendung des OVA-induzierten allergischen Asthmas in BALB/c Mäusen.

2. Entwicklung und Etablierung einer Methode zur standardisierten Isolation myeloider, inflammatorischer Zellen aus einer vollständigen murinen Lunge.

3. Analyse der aus der vollständigen Lunge und mittels BAL gewonnenen Zellen, insbesondere Differenzierung der Zellen mittels FACS und Zytomorphologie, sowie Charakterisierung der kultivierten Zellen nach Restimulation mit OVA hinsichtlich der Produktion von Th1- und Th2-Zytokinen.

4. Untersuchung des Einflusses von IL-1α zu verschiedenen Zeitpunkten auf den Verlauf und die Intensität der Th2-vermittelten Immunantwort und auf ein eventuelles Shifting in Richtung einer Th1-mediierten Abwehrreaktion mittels o. g. Methoden.

2. Materialien

2.1 Tiere

- BALB/c Mäuse, männliche und weibliche Tiere (ein Geschlecht innerhalb eines Versuches), jeweils sechs bis acht Wochen alt, ZVTE Mainz

2.2 häufig verwendete Medien

- PBS:
  8,04 g (0,8%) NaCl 5 kg, 3957.2, Carl Roth GmbH + Co., D-76185 Karlsruhe
  1,38 g (0,14%) NaH_2PO_4 • $1H_2O$ 1 kg, 300.2, Carl Roth GmbH + Co., D-76185 Karlsruhe
  1 l Aqua dest., eigene Herstellung der Apotheke des Universitätsklinikums Mainz
- RPMI complete:
  RPMI 1640 Bio Whittaker Medium, 500 ml, BE12-167F, Cambrex Bio Sciences, B-4800 Verviers
  alternativ RPMI 1640 Biochrom Medium, 500 ml, FG 1215, Biochrom AG, D-12247 Berlin
  25 ml FCS Gold, 500 ml, A15-649, PAA Laboratories GmbH, D-35091 Cölbe
  5 ml Hepes 1M, 1kg, 9105.3, Carl Roth GmbH + Co., D-76185 Karlsruhe
  5 ml Non-essential-amino-acids (100´), 100 ml, K0293, Biochrom, D-12247 Berlin
  5 ml L-Glutamin 200 mM (100´), 100 ml, 25030-024, Gibco BRL Life Technologies GmbH, D-76131 Karlsruhe
  5 ml Penicillin/Streptomycin, 100 ml, Penicillin G 10000 Einheiten/ml, Streptomycinsulfat 10000 mg/ml, 15140-22, Gibco BRL Life Technologies GmbH, D-76131 Karlsruhe
  500 ml 2-Mercaptoethanol 50 mM, 100 ml, M-3148, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-82024 Taufkirchen

2.3 Induktion des experimentellen Asthmas und Behandlung mit Interleukin-1α

- Aluminium Potassium Sulfate, 100 g, A-7210, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim
- Spatelset, E286.1, Carl Roth GmbH + Co., D-76185 Karlsruhe
- Aqua ad injectiabilia Braun, 100 ml B. Braun Melsungen AG, D-34209 Melsungen
- Albumin, Chicken Egg 5x Crystalline, 5g, 32467, Calbiochem GmbH, D-65824 Schwalbach
- Isotone Kochsalz- Lösung 0,9%, 100 ml, B. Braun AG, D-34209 Melsungen
- NaOH 50 %, 1 l, 8655.1, Carl Roth GmbH + Co., D-76185 Karlsruhe
- HCl 0,1 N, K024.1, Carl Roth GmbH + Co., D-76185 Karlsruhe
- pH-Indikatorstäbchen Neutralit, 100 Stck., pH 5,0 – 10,0, 1095330001, Merk KGaA, D-64271 Darmstadt
- Aluminiumfolie, 150 m x 45 cm, 15 my, Paclan GmbH, D-91239 Henfenfeld
- Ethanol 70%, Alkopharm 70, 750 ml, Brüggemann Alkohol, D-74076 Heilbronn
- Ultrasonic Nebulizer, Model NE-U17, Omron Medizintechnik Handelsgesellschaft mbH, D-68163 Mannheim
- Becherglas, 3000 ml, Schott Duran, Duran Group GmbH, D-55122 Mainz
- PBS (siehe 2.2)
- murines Interleukin-1α, 500 µg, 9517593, Strathmann Biotec AG, D- 22459 Hamburg

2.4 Lungenentnahme

- Ketamin-ratiopharm 500/10 ml, Ketaminhydrochlorid, Injektionslösung, Ratiopharm GmbH, D-89070 Ulm
- Rompun 2%, Xylazinhydrochlorid, Injektionslösung 25 ml, Bayer Vital GmbH, D-51368 Leverkusen
- Schere steril, feine Schere spitz-spitz 105 mm, gebogen, 233F1282, Merck Eurolab GmbH, D-64271 Darmstadt

- Pinzette steril 145 mm, 61761114, Bochem Laborbedarf, Vertrieb: Fisher Scientific, D-58239 Schwerte
- Ethanol 70%, Alkopharm 70, 750 ml, Brüggemann Alkohol, D-74076 Heilbronn
- PBS (siehe 2.2)

2.5 Zellgewinnung

- Liberasemedium:
  RPMI 1640 Biochrom-Medium, FG 1215, Biochrom, D-12247 Berlin
  200 µl Liberase Cl, 0,25 g, 1814435, Roche AG, CH-4047 Basel
  1 ml Penicillin/Streptomycin, 100 ml, Penicillin G 10000 Einheiten/ml, Streptomycinsulfat 10000 mg/ml, 15140-22, Gibco BRL Life Technologies GmbH, D-76131 Karlsruhe
  0,01g Desoxyribonuclease I, DN25-1G, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim
- Zellsieb 70 µm, steril 50 Stck., 35-2350, Falcon, Vertrieb: Fisher Scientific, D-58239 Schwerte
- Zellkulturplatte 24-well flach, steril, 100 Stck., 662160, Greiner Bio-One GmbH, D-72636 Frickenhausen
- Pinzette steril 145 mm, 61761114, Bochem Laborbedarf, Vertrieb: Fisher Scientific, D-58239 Schwerte
- Skalpell steril, 20 Stck., Feather Safety Razor Co., Ltd. Medical Division, Vertrieb: pfm Produkte für die Medizin AG, D-50996 Köln
- Petrischale non-treated 100 mm, steril, 420 Stck., 663102, Greiner Bio-One GmbH, D-72636 Frickenhausen
- ACK (Ammoniumchloridlösung) Lysing Buffer, 100 ml, 10-548E, Cambrex Bio Sciences, B-4800 Verviers
- Zellkulturplatte 96-well rund, unsteril, 100 Stck., 650101, Greiner Bio-One GmbH, D-72636 Frickenhausen
- Trypanblaulösung 0,4% 100 ml (Verdünnung 1:5 mit PBS), steril, T-8154, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim

- Neubauer-Zählkammer, 631F1130, Merck, Vertrieb: Labotec Vertrieb GmbH, D-65199 Wiesbaden
- RPMI 1640 Biochrom-Medium, FG 1215, Biochrom, D-12247 Berlin
- RPMI complete (siehe 2.2)
- PBS (siehe 2.2)

2.6 Broncheoalveoläre Lavage (BAL)

- Ethanol 70%, Alkopharm 70, 750 ml, Brüggemann Alkohol, D-74076 Heilbronn
- Schere steril, feine Schere spitz-spitz 105 mm, gebogen, 233F1282, Merck Eurolab GmbH, D-64271 Darmstadt
- Pinzette steril 145 mm, Art. Nr. 61761114, Bochem Laborbedarf, Vertrieb: Fisher Scientific, D-58239 Schwerte
- Skalpell steril, 20 Stck., Feather Safety Razor Co., Ltd. Medical Division, Vertrieb: pfm Produkte für die Medizin AG, D-50996 Köln
- Spatelset, E286.1, Carl Roth GmbH + Co., D-76185 Karlsruhe
- Bindfaden
- Trachealkatheter, 18 Gauge, Buxco Research Systems, Winchester, Hampshire, SO21 3BT, UK
- PBS (siehe 2.2)

2.7 Kultivierung und Restimulation

- Zellkulturplatte 96-well flach, steril, 100 Stck., 655180, Greiner Bio-One GmbH, D-72636 Frickenhausen
- RPMI complete (siehe 2.2)
- Albumin, Chicken Egg 5x Crystalline, 5g, 32467, Calbiochem GmbH, D-65824 Schwalbach
- OVA-Peptid$_{323-339}$, Sequenz ISQAVHAAHAEINEAGR, freundlicherweise zu Verfügung gestellt durch *aufgrund datenschutzrechtlicher Gründe gelöscht*

- Staphylococcal Enterotoxin B Fragment (150-161), S-08012, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim
- PBS (siehe 2.2)

2.8 Cytospin

- Objektträger, 50 Stck., Artikel-Nr. 02 1102, Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, D-38021 Braunschweig
- Filter cards, 200 Stck., 190005, Thermo Shandon Inc., Pittsburgh, PA 15275
- Cytoclip Stainless Steel Slide Clip, 59910053, Thermo Shandon Inc., Pittsburgh, PA 15275
- Cytofunnel disposable sample chamber, 5991040, Thermo Shandon Inc., Pittsburgh, PA 15275
- Cytospin 2 Zentrifuge, Thermo Shandon Inc., Pittsburgh, PA 15275
- DiffQuick Färbeset, 3 x 500 ml, Cat.No. 130832, Dade Behring Marburg GmbH, D-35041 Marburg, bestehend aus
    - Fixierlösung (Fast green in Methanol 0,002 g/l),
    - Eosinlösung (1,22 g/l in Phosphatpuffer) und einer
    - Thiazin Farbstofflösung (1,1 g/l in Phosphatpuffer).
- Pinzette steril 145 mm, Art. Nr. 61761114, Bochem Laborbedarf, Vertrieb: Fisher Scientific, D-58239 Schwerte
- Präparatekiste schwarz für Objektträger, bezogen über die Apotheke der Universitätsmedizin Mainz
- Assistent 345 Counter AC- 8, Karl Hecht KG, D-97647 Sondheim
- Immersionsöl für die Mikroskopie, 100 ml, 1046990100, Merck KGaA, D-64271 Darmstadt

2.9 FACS-Analyse

2.9.1 Antikörper

- Hamster-IgG-PE , 0,2 mg/ml, 553954, Pharmingen, BD Biosciences, Life Science Research, D-69126 Heidelberg
- Rat R2a-FITC, 0,5 mg/ml, 553929, Pharmingen, BD Biosciences, Life Science Research, D-69126 Heidelberg
- CD3e-FITC, 0,5 mg/ml, Clone 145-2C11, 553062, Pharmingen, BD Biosciences, Life Science Research D-69126 Heidelberg
- CD4-FITC, 0,5 mg/ml, Clone L3T4 GK1.5, 553729, Pharmingen, BD Biosciences, Life Science Research, D-69126 Heidelberg
- CD8a-PE, 0,2 mg/ml, Clone LY-2 53-6.7, 553033, Pharmingen, BD Biosciences, Life Science Research, D-69126 Heidelberg
- CD11c-PE, 0,2 mg/ml, Clone Integrin alpha, 553802, Pharmingen, BD Biosciences, Life Science Research, D-69126 Heidelberg
- F4/80-PE, 0,1 mg/ml, RM2904-3, Invitrogen Caltag Laboratories, Burlingame, CA 94010
- MHC II-FITC, 0,5 mg/ml, Clone 2G9, 553623, Pharmingen, BD Biosciences, Life Science Research, D-69126 Heidelberg
- GR1-bio, 0,5 mg/ml , Clone Ly-6G Ly-C6, 553125, Pharmingen, BD Biosciences, Life Science Research, D-69126 Heidelberg
- Strept. Avidin-PE, 0,5 mg/ml, 554061, Pharmingen, BD Biosciences, Life Science Research, D-69126 Heidelberg
- Hybridomüberstand clon NIMP-R14, eigene Herstellung AG von Stebut
- anti-rat-FITC (freundlicherweise zu Verfügung gestellt durch AG PD Dr. H. Jonuleit, Hautklinik, Universitätsmedizin Mainz)
- anti-mCCR3-FITC, FAB729F, R&D Systems GmbH, D-65205 Wiesbaden-Nordenstadt

2.9.2 sonstige Materialien

- FACS-Puffer:
  PBS (siehe 2.2) mit
  10 ml (2 %) FCS Gold, 500 ml, A15-649, PAA Laboratories GmbH, D-35091 Cölbe
  50 µl NaN_3 99,5% (verwendet als 10% Lösung) 100 g, S2002, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim

- Zellkulturplatte 96-well rund, unsteril, 100 Stck., 650101, Greiner Bio- One GmbH, D-72636 Frickenhausen
- anti-mouse CD16/CD32 (Fc-Block) 0,5 mg/ ml, Clone 2.4G2, 553142, Pharmingen, BD Biosciences, Life Science Research, D-69126 Heidelberg
- Mausserum normal, X0910, Dako Diagnostik GmbH, D-22083 Hamburg
- Probenröhrchen 5 ml, 1000 Stck., 352008, Falcon, Vertrieb: Fisher Scientific, D-58239 Schwerte
- FACS Flow, 20 l, 342003, BD Biosciences, D-69126 Heidelberg
- FACS Rinse, 5 l, 340346, BD Biosciences, D-69126 Heidelberg
- FACS Clean, 5 l, 340345, BD Biosciences, D-69126 Heidelberg
- Durchflusszytometer FACS Calibur, BD Biosciences, D-69126 Heidelberg
- CellQuest Pro Version 3.0.1. 1996 für Apple System 7.5.3., BD Biosciences, D-69126 Heidelberg, auf MAC OS 9.2
- Apple Power MAC G4
- Hewlett Packard Laserjet 1300
- Vortexer Reax 1, Typ 54111, Heidolph Instruments GmbH, D-91126 Schwabach

2.10 ELISA

2.10.1 IL-4 ELISA

- Assay Diluent (steril filtriert)
  900 ml PBS (siehe 2.2)
  100 ml FCS Gold, 500 ml, A15-649, PAA Laboratories GmbH, D-35091 Cölbe
- murines IL-4 OptEIA ELISA Set, 20 Platten, 555232, Becton Dickinson GmbH, D-69126 Heidelberg, bestehend aus
  Avidin-HRP, IL-4 Standard, Capture- und Detection Antikörper
- Coating- Puffer: 0,1 M Carbonate, pH 9.5

2.10.2 IL-10 ELISA

- Assay Diluent (siehe 2.9.1)
- murines IL-10 OptEIA ELISA Set, 20 Platten, 555252, Becton Dickinson GmbH, D-69126 Heidelberg bestehend aus
  Avidin-HRP, IL-10 Standard, Capture- und Detection Antikörper
- Coating- Puffer: 0,2 M Sodium Phosphate , pH 6,5

2.10.3 IFN-γ ELISA

- Reagent Diluent (pH 7,2- 7,4):
  PBS (siehe 2.2)
  0,1% BSA
  0,05% Tween-20 500 ml, 194724, ICN Pharmaceuticals, D-65929 Frankfurt/Main
- mouse IFN-γ DuoSet ELISA, 45 Platten, DY458, R&D Systems GmbH, D-65205 Wiesbaden-Nordenstadt, bestehend aus
  Streptavidin-HRP, IFN-γ Standard, Capture- und Detection Antikörper
- PBS (siehe 2.2)
- Block-Puffer:
  PBS (siehe 2.2)
  1% BSA, Albumin Fraktion V Protease frei 50 g, T844.2, Carl Roth GmbH + Co., D-76185 Karlsruhe
  0,05% NaN_3 99,5% (verwendet als 10% Lösung) 100 g, S2002, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim

2.10.4 IL-5 ELISA

- Reagent Diluent (pH 7,2- 7,4):
  PBS (siehe 2.2)
  1% BSA, Albumin Fraktion V Protease frei 50 g, T844.2, Carl Roth GmbH + Co.,

D-76185 Karlsruhe

- mouse IL-5 DuoSet ELISA, 45 Platten, DY405, R&D Systems GmbH, D-65205 Wiesbaden-Nordenstadt, bestehend aus
  Streptavidin-HRP, IL-5 Standard, Capture- und Detection Antikörper
- PBS (siehe 2.2)

2.10.5 IL-13 ELISA

- Reagent Diluent (pH 7,2- 7,4):
  PBS (siehe 2.2)
  1% BSA, Albumin Fraktion V Protease frei 50 g, T844.2, Carl Roth GmbH + Co., D-76185 Karlsruhe
- mouse IL-13 DuoSet ELISA, 45 Platten, DY413, R&D Systems GmbH, D-65205 Wiesbaden-Nordenstadt, bestehend aus
  Streptavidin-HRP, IL-5 Standard, Capture- und Detection Antikörper
- PBS (siehe 2.2)

2.10.6 allgemeine Materialien für ELISA

- Stop-Solution:
  1 l Aqua dest., eigene Herstellung der Apotheke des Universitätsklinikums Mainz
  67,5ml H_3PO_4 (14,8 M), 500ml, P-6560, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim
- F96 Maxisorp Nunc-Immuno plate flach, 60 Stck., 442404, Nalge Nunc International, Vertrieb: Brand GmbH + Co KG, D-97861 Wertheim
- TMB Substrate Reagent Set (A+B), 2 x 300 ml, 555214, Pharmingen, BD Biosciences, Life Science Research, D-69126 Heidelberg.
- Probenröhrchen 5 ml, 1000 Stck., 352008, Falcon, Vertrieb: Fisher Scientific, D-58239 Schwerte
- Waschpuffer:
  PBS (siehe 2.2)

0,1% Tween-20 500 ml, 194724, ICN Pharmaceuticals, D-65929 Frankfurt/Main

- ELISA Microplate Reader ELx808, Bio-Tek Instruments Inc., USA
- Programm KC junior, Bio-Tek Instruments Inc., USA, 1998- 2003, auf Windows XP
- MSI PC mit Intel Celeron 3,06 GHz
- Hewlett Packard Laserjet 2100, Hewlett-Packard GmbH, D-71034 Böblingen

2.11 Verbrauchsmaterialien und sonstige Geräte

2.11.1 Verbrauchsmaterialien

- Untersuchungshandschuhe puderfrei, unsteril, 100 Stck., Semperit Technische Produkte GmbH & Co KG, A-1031 Wien
- Spitzen gelb Gilson 15000 Stck., 739290, Greiner Bio-One GmbH, D-72636 Frickenhausen
- Spitzen blau Gilson 5000 Stck., 740290, Greiner Bio-One GmbH, D-72636 Frickenhausen
- Spitzen 0,1-10 µl 1000 Stck., K138.1, Carl Roth GmbH + Co., D-76185 Karlsruhe
- Plastikpipetten 5 ml, steril, 606180, Greiner Bio-One GmbH, D-72636 Frickenhausen
- Plastikpipetten 10 ml, steril, 607180, Greiner Bio-One GmbH, D-2636 Frickenhausen
- Plastikpipetten 25 ml, steril, 760180, Greiner Bio-One GmbH, D-72636 Frickenhausen
- 15 ml Teströhrchen, 1000 Stck., 188271, Greiner Bio-One GmbH,D-72636 Frickenhausen
- 50 ml Teströhrchen, 500 Stck., 227261, Greiner Bio-One GmbH, D-72636 Frickenhausen
- Reagiergefäße 1,5 ml, 39x10 mm Ø, 1000 Stck., 211Q2512, Merck Eurolab GmbH, D-64271 Darmstadt
- Kanüle Sterican 20G 0,90 x 60 mm, 100 Stück, 53501175, B. Braun AG, D-34209 Melsungen
- Kanüle Sterican 23G 1 1/4 0,60 x 30 mm, 100 Stück, 53501173, B. Braun AG, D-34209 Melsungen
- Einmalspritze mit Luer-Ansatz, 2 ml, steril, 100 Stück, 53500414, B. Braun AG, D-34209 Melsungen
- Einmalspritze mit Luer-Ansatz, 5 ml, Becton Dickinson Discardit II, steril, 100 Stück, 53501183, Becton Dickinson GmbH, D-69126 Heidelberg

- Einmalspritze mit Luer-Ansatz, 10 ml, Becton Dickinson Discardit II, steril, 100 Stück, 130222, Becton Dickinson GmbH, D-69126 Heidelberg
- Einmalspritze mit Luer-Ansatz, 20 ml, Becton Dickinson Discardit II, steril, 80 Stück, 53501185, Becton Dickinson GmbH, D-69126 Heidelberg
- Einmalspritze mit Luer- Ansatz, 1 ml, Injekt-F, steril, 100 Stück, B. Braun AG D-34209 Melsungen
- Verschlussfolie Parafilm M, 01852-AB, American National Can, Chicago, bezogen über die Apotheke des Universitätsklinikums Mainz
- Bottle-Top Filter ZAPCAP-S 0,2 µm ,steril, non-cytotoxic, non-pyrogenic, 514H1811, Schleicher & Schuell Inc., Vertrieb: Merck Eurolab GmbH, D-64271 Darmstadt
- Wägepapier im Block, Katalog-Nr. 1-7217, Neolab, Vertrieb: Merck Eurolab GmbH, D-64271 Darmstadt
- Medicon 50 µm, steril, 10 Stück, 340591, Becton Dickinson GmbH, D-69126 Heidelberg

2.11.2 Behältnisse

- Glasflasche 100 ml, Biochrom AG, D-12247 Berlin
- Glasflasche 500 ml, Schott Duran, Duran Group GmbH, D-55122 Mainz
- Glasflasche 1000 ml, Schott Duran, Duran Group GmbH, D-55122 Mainz
- Messzylinder 1000 ml, Vitlab GmbH, D-63762 Großostheim
- Kunstoffbehälter 500 ml, Kartell spa Labware Division, 20082 Noviglio (MI), Italy
- Kunstoffbehälter 2000 ml, Kartell spa Labware Division, 20082 Noviglio (MI), Italy

2.11.3 Pipetten

- Gilson P10, 10 µl, Gilson, Vertrieb: Labotec Vertriebs GmbH, D-65199 Wiesbaden
- Gilson P100, 100 µl, Gilson, Vertrieb: Labotec Vertriebs GmbH, D-65199 Wiesbaden
- Gilson P200, 200 µl, Gilson, Vertrieb: Labotec Vertriebs GmbH, D-65199 Wiesbaden
- Gilson P1000, 1000 µl, Gilson, Vertrieb: Labotec Vertriebs GmbH, D-65199 Wiesbaden
- Finnpipette 50- 300 µl, Thermo Life Sciences Germany, D-60437 Frankfurt/Main

- Handdispenser Handy Step, 612C5530, Brand GmbH + Co KG, Vertrieb: Labotec Vertriebs GmbH, D-65199 Wiesbaden
- Pipetus aku, 612B1874, Hirschmann Laborgeräte, Vertrieb: Labotec Vertriebs GmbH, D-65199 Wiesbaden

2.11.4 Zentrifugen

- Heraeus Multifuge 3 L- R, Heraeus Instruments, Vertrieb: Kendro Laboratory Products, D-63405 Hanau
- Heraeus Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments, Vertrieb: Kendro Laboratory Products, D-63405 Hanau

2.11.5 Mikroskope und Kamera

- Auflicht Mikroskop Leitz Diavert, Serien Nr. 871715, Leica Microsystems Group
  Objektive: PHACO L 20x /0,32; 170/-
  PHACO 10x /0,25; 170/-
  4x /0,12; 170/-
- Durchlicht Mikroskop Leitz Diaplan, Serien Nr. 074388, Leica Microsystems Group
  Objektive: Öl 100x /1,30; 170/0,17
  Pl 40x /0,65; 170/0,17
  10x /0,25; 170/-
- Durchlicht Mikroskop Leica DM 2500, Serien Nr. 285839, Leica Microsystems Group
  Objektive: Öl 100x /1,25; 170/0,17
  40x /0,65; 170/0,17
  20x /0,4; 170/-
  10x /0,25; 170/-
- Digitalkamera Leica DFC 290, Serien Nr. 243562807, Leica Microsystems Ltd., CH-9435 Haarbrugg
- Bildbearbeitungssoftware Leica Application Suite, Version 2.5.0 R1 (Build:975), ©2003-2006, Leica Microsystems Group auf Windows XP

2.11.6 Kühl- und Gefrierschränke

- 4°C Kühlschrank und -20°C Eisschrank Liebherr Premium, Kühl-Gefrier Kombination Tropen KGT 3946 Typ 5611284, Liebherr-Hausgeräte GmbH, D-63263 Neu-Isenburg
- -80°C Kühlschrank Ultima ll, Revoco Scientific Incorporation, Asheville, N.C., USA

2.11.7 sonstige Geräte

- Flow Hera Safe, Heraeus Instruments, Vertrieb: Kendro Laboratory Products, D-63405 Hanau
- Flow Laminair, HB 2448, Heraeus Instruments, Vertrieb: Kendro Laboratory Products, D-63405 Hanau
- Inkubator 37°C, 5 % CO2, Heraeus electronic B 5060 EK-CO2, 26136000, Heraeus Instruments, Vertrieb: Kendro Laboratory Products, D-63405 Hanau
- Wasserbad Typ GFL-1003 14 l, GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, D-30938 Burgwedel
- Waage MC1 Analytic AC 210S, Sartorius AG, D-37070 Göttingen
- Vortex Gene 1 Touch Mixer, SI-0156, Scientific Industries Inc., N. Y. 11716, USA
- Eismaschine ZBE 30-10, Ziegra Eismaschinen, D-30916 Isernhagen
- Stoppuhr digital, TR118, Oregon Scientific GmbH, 63263 Neu-Isenburg
- Medimachine, 340588, Becton Dickinson GmbH, D-69126 Heidelberg

3. Methoden

3.1 Induktion des experimentellen Asthmas und Behandlung mit Interleukin-1α

Wie in der Einleitung bereits erläutert, handelt es sich beim allergischen Asthma um eine Th2-Zell vermittelte allergische Reaktion vom Soforttyp. Um ein murines Modell des allergischen Asthmas zu verwenden, nutzte ich BALB/c Mäuse, bei welchen im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen eine verstärkte Th2-Immunantwort zu induzieren ist [78]. Als potentes Antigen kam OVA (Albumin chicken egg) zum Einsatz, ein in der Immunologie häufig verwendetes Th2-Antigen [95]. In Kombination mit Aluminium Potassium Sulfat (Alum) bildet OVA Komplexe aus, welche sich durch ein noch ausgeprägteres allergisches Potential auszeichnen [108]. Um eine Allergie gegen OVA/Alum zu induzieren, bedurfte es einer systemischen Sensibilisierung mittels einer intraperitonealen Injektion des Antigens. Das allergene Agens wird durch das Peritoneum resorbiert und induziert eine Differenzierung von Th0-Zellen zu Th2-Zellen (siehe 1.1.3). Die Sensibilisierung wurde nach zwei Wochen erneut ausgeführt. Um ein allergisches Asthma auszulösen, wurden die nun sensibilisierten Mäuse erneut OVA exponiert (so genannte Challenge). Hier gilt die Inhalation eines OVA-Aerosols als effektive Methode, da es zu einer homogenen Verteilung des Allergens in den oberen und unteren Atemwegen kommt und die Lunge komplett erfasst wird [109].

Zur Durchführung eines Versuches wurden fünf Gruppen zu je fünf Versuchstieren gebildet, wobei die Gruppen eins bis vier mit OVA sensibilisiert wurden und die fünfte Gruppe als Kontrolle diente. Zur Sensibilisierung wurde den Versuchstieren am Tag 0 und 14 des Versuches jeweils 200 µl einer 0,05 % OVA-Alum Lösung, entsprechend 100 µg OVA, intraperitoneal appliziert. Die Tiere der Kontrollgruppe bekamen 200 µl PBS i.p. injiziert. Um das allergische Asthma auszulösen, wurden die Mäuse an den Tagen 27, 28 und 29 mit einem 0,1 % OVA/PBS- Aerosol für 20 Minuten behandelt (Challenge).

Um den Einfluss von IL-1α auf die immunologische Antwort zu untersuchen, wurden den Gruppen zwei bis vier an definierten Tagen rekombinantes murines IL-1α in einer Konzentration von 500 ng in 200 µl PBS pro Maus intraperitoneal injiziert. Bei Gruppe zwei

wurde IL-1α an den Tagen null, eins und zwei appliziert, Gruppe drei wurde an den Tagen null, eins und 14 mit IL-1α behandelt und Gruppe vier an den Tagen 21, 22 und 23.

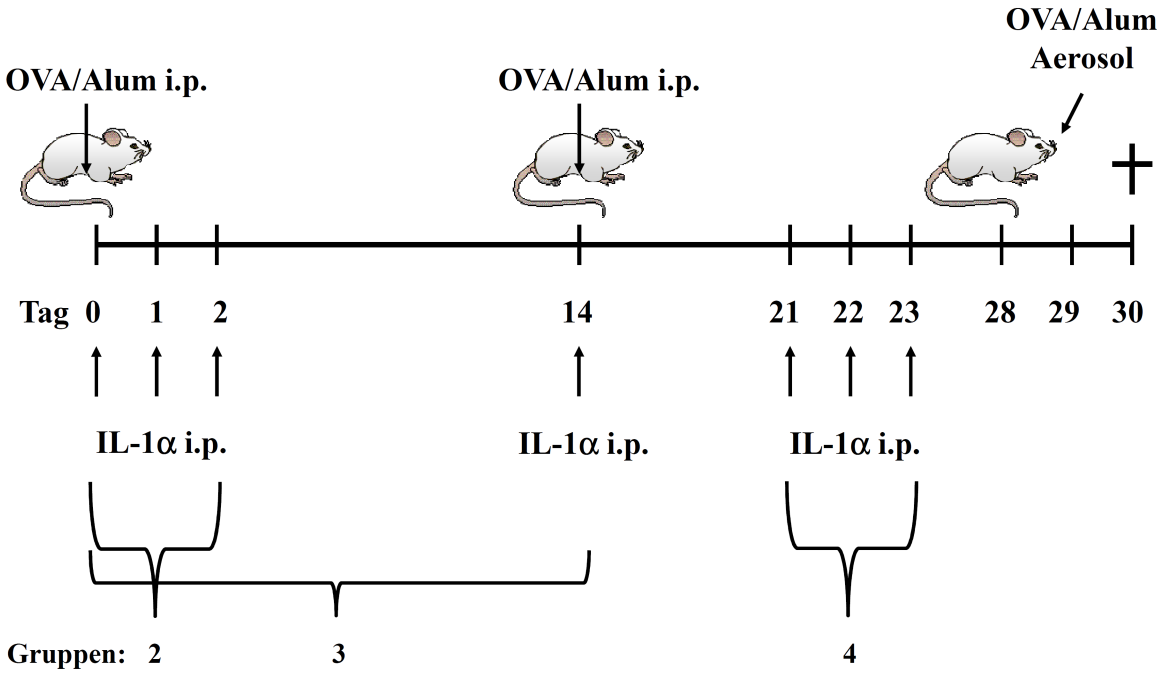

Abb. 3.1: Induktion des experimentellen Asthmas und Behandlung mit Interleukin-1α

3.2 Lungenentnahme

Am Versuchsende (Tag 30) wurden die Versuchstiere durch die Injektion von 10 mg Ketamin und 4 mg Xylazin getötet. Die ventrale Seite wurde gründlich mit Ethanol desinfiziert und nach einer kleinen medianen Inzision das Fell stumpf abgelöst. Danach wurde eine transversale Laparatomie kurz unter dem Rippenbogen durchgeführt ,das Zwerchfell von den ventralen inneren Thoraxwand abgelöst und die Pleura parietalis eröffnet. Die Rippen wurden im Bereich der vorderen Axillarlinie beidseits durchtrennt und die nun abgelöste ventrale Thoraxwand nach kranial weggeklappt. Die rechte Lunge wurde am Hilus abgesetzt und in toto entnommen, in ein 15 ml Falcon mit PBS überführt und auf Eis gestellt.

3.3 Zellgewinnung

3.3.1 Mechanische Separation mittels Medimachine

Die Lunge wurde unter sterilen Bedingungen auf einer Petrischale mit einem Skalpell in ca. 5 mm kleine Stücke geschnitten. Anschließend wurde ein Medicon mit den Lungenstücken beschickt und mit 1 ml RPMI- Lösung befüllt. Das Medicon wurde in die Medimachine eingespannt und diese wurde für 3 min aktiviert. Anschließend wurde das Medicon mit 10 ml RPMI unter gleichzeitigem Aspirieren mit einer Spritze gespült und das Aspirat wurde in ein 50 ml Falcon über ein 70 µm Zellsieb überführt. Abschließend wurde die Mediconspindel noch einmal gedreht und erneut mit 10 ml RPMI gespült. Der Inhalt wurde ebenfalls aspiriert und in das Falcon überführt, welches auf Eis gelagert wurde. Es folgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 200 g und 4°C mit anschließendem Verwerfen des Überstandes.

3.3.2 Mechanische Separation mittels Pinzette

Unter sterilen Bedingungen wurde eine Petrischale mit 5 ml RPMI gefüllt und ein 70 µm Zellsieb hineingestellt. Dann wurde die murine Lunge in das Zellsieb überführt und mit einer spitzen Pinzette zerpflückt und zerrieben. Das Zellsieb wurde über der Petrischale mit 10 ml RPMI gespült, der Inhalt der Petrischale aspiriert und über ein frisches Zellsieb in ein 50 ml Falcon (auf Eis) überführt. Abschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (10 Minuten bei 200 g und 4°C) und der Überstand verworfen.

3.3.3 Enzymatischer Verdau

Die Lunge wurde unter sterilen Bedingungen in einer Petrischale mit Skalpell und Pinzette in ein bis zwei Millimeter kleine Stücke geschnitten. Je eine zerschnittene Lunge wurde in ein Well einer 24-well Platte überführt und es wurden 750 µl einer Liberase-Lösung hinzupipettiert. Die Platte wurde für 20, 60 und 90 Minuten im Brutschrank bei 37°C

inkubiert, danach wurde der enzymatische Verdauungsprozess durch die Zugabe von 750 µl RPMI-complete gestoppt.

3.3.4 Mechanische Separation mittels Pinzette, Spritze und Zellsieb

Nach dem Verdau wurden die Lungenstücke mitsamt Medium in ein in einer Petrischale stehendes 70 µm Zellsieb überführt. Dort wurden die Lungenstücke mit einer Pinzette noch einmal zerkleinert und dann mit dem Kolben einer 2 ml Einmalspritze zermörsert. Das Zellsieb wurde über der Petrischale zweimal mit RPMI gespült, das Eluat aspiriert, in ein 50 ml Falcon verbracht und auf Eis deponiert. Anschließend wurden die Falcons für 10 Minuten bei 200 g und 4°C zentrifugiert und danach der Überstand verworfen.

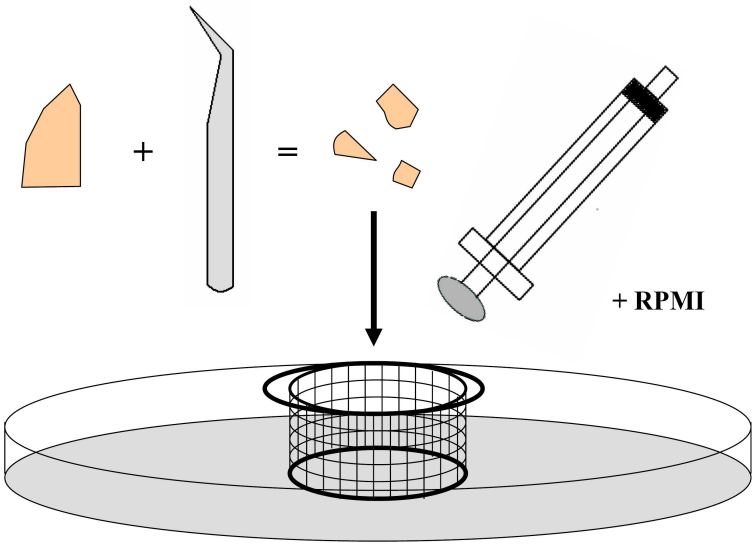

Abb. 3.2: Mechanische Separation mittels Pinzette, Spritze und Zellsieb

3.3.5 Erythrozytenlyse

Die Falcons mit den Zellpellets wurden mit 1,5 ml ACK-Lysispuffer für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach mit 5 ml RPMI aufgefüllt. Es folgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 200 g und 4°C, wonach der Überstand verworfen und die

verbliebenen Zellpellets mit 1 ml PBS resuspendiert wurden. Die Suspension wurde erneut mittels eines 70 µm Zellsiebes filtriert und auf Eis gelagert.

3.3.6 Zellzählung

Zur Zellzählung diente eine Neubauer-Zählkammer: 10 µl der Zellsuspension wurden in einer 96-well Platte mit 90 µl Trypanblau gemischt und in die Zählkammer überführt. Die nicht viablen Zellen färbten sich tiefblau an und wurden bei der Zählung ebenso wie die verbliebenen Erythrozyten nicht berücksichtigt. Es folgte das Auszählen der Zellen bei 100facher Vergrößerung in 16 Feldern. Zur Ermittlung der totalen Zellzahl pro 1 ml wurden die gezählten Zellen mit dem Verdünnungsfaktor (10) und dem Kammerfaktor ($1x10^4$) multipliziert.

3.4 Gewinnung der BAL

Zur Gewinnung der BAL wurden die Versuchstiere wie bereits in 3.2 beschrieben mit Ketamin und Rompun getötet. Dann desinfizierte ich die ventrale Seite, inzidierte das Fell über dem Foramen jugulare und präparierte das Fell stumpf ab. Es folgte die stumpfe Präparation der Trachea, welche mit einem Spatel luxiert und unterfasst wurde. Mit einem Skalpell schnitt ich die Trachea unterhalb des ersten Ringknorpels circa zur Hälfte quer ein und führte einen Trachealkatheter ein, welchen ich mittels eines hinter der Trachea durchgeführten Bindfadens fixierte. Über den Katheter wurde die Lunge mit sechsmal 0,5 ml PBS gespült, wobei nach jeder Applikation die Lavage aus der Lunge aspiriert und in einem 15 ml Falcon auf Eis gelagert wurde.
Anschließend wurden die Lavage für 10 Minuten bei 200 g und 4°C zentrifugiert und danach der Überstand in ein frisches Falcon dekantiert, um darin die Zytokinkonzentrationen zu bestimmen. Das Zellpellet wurde mit 1 ml PBS resuspendiert und die Zellen wie in 3.3.6 beschrieben gezählt.

3.5 Kultivierung und Restimulation

Je Lunge wurde drei Wells einer sterilen 96-well Platte mit flachem Boden mit $1x10^6$ Zellen beschickt und das Well auf 200 µl mit RPMI complete aufgefüllt. Das erste Well diente als Negativkontrolle, zu dem zweiten wurden 50 µg/ml OVA-Protein zur Restimulation hinzugegeben, dem dritten Well setzte ich 1 pg/ml SEB als Positivkontrolle zu.

Es erfolgte die Inkubation der Platten für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Überstände der Zellkulturen abpipettiert und bei -20°C eingefroren.

3.5.1 Restimulation mit OVA-Peptid

In weiteren Versuchen wurde untersucht, ob es einen Unterschied in der Zytokinproduktion nach Restimulation der Zellen mit OVA-Peptid, bzw. OVA-Protein gibt. Zu diesem Zweck wurden in ein zusätzliches Well $1x10^6$ Zellen pipettiert und das Well auf 200 µl mit RPMI complete aufgefüllt. Danach wurde 5 µg/ml OVA-Peptid hinzugegeben und die Platten wie bereits unter 3.5 beschrieben inkubiert.

3.6 Cytospin

Um die Zusammensetzung der aus der murinen Lunge isolierten Zellen histologisch zu analysieren, wurden Cytospins angefertigt. Dabei werden mittels einer Zentrifuge Fliehkräfte erzeugt, die die Zellen auf einen Objektträger schleudern. Die Zellen werden dann lichtmikroskopisch nach zytomorphologischen Kriterien differenziert.

3.6.1 Präparation der Cytospins

Je anzufertigendem Cytospin wurden $8x10^5$ Zellen mit 150 µl PBS resuspendiert. Mit einer speziellen Metallklemme wurden ein zuvor beschrifteter Objektträger mit einem Filterpapier und einem trichterförmigen Kunstoffapplikator verbunden. In den Applikator pipettierte ich die oben beschriebene Zellsuspension und zentrifugierte den Ansatz mit 500 Umdrehungen/min für 5 Minuten in der Cytospin 2-Zentrifuge.

3.6.2 Färbung und Auswertung

Nach der Zentrifugation wurden die Objektträger zunächst an der Luft getrocknet und danach für 2 Minuten in Fixierlösung gestellt. Zum Färben wurden sie ebenfalls für jeweils 2 Minuten in Eosin- und Thiazinlösung getaucht. Danach wurde die überschüssige Farbe in einem Behälter mit Wasser vorsichtig abgeschwenkt, anschließend ließ ich die Präparate lufttrocknen.

Zur lichtmikroskopischen Auswertung wurden die Cytospins mit einem Tropfen Immersionsöl versehen ,bei 1000facher Vergrößerung (10er Okular plus 100 Öl- Objektiv) bis zu einer Gesamtzahl von 300 Zellen ausgezählt und optisch in basophile-, eosinophile- und neutrophile Granulozyten, sowie Lymphozyten und Makrophagen/Monozyten differenziert.

Bezüglich der Unterscheidungsmerkmale bediente ich mich unter anderem folgender zytomorphologischen Kriterien (bezogen auf Eosin-/ Thiazin Färbung und 1000fache Vergrößerung, Beispiel siehe Abbildung 3.3 [110]):

- (B- und T-) Lymphozyten sind relativ klein und rund und haben ein im Verhältnis zum Zytoplasma großen intensiv gefärbten Kern.
- Eosinophile Granulozyten zeichnen sich durch einen anulären Kern mit innenliegenden und perinukleär lokalisierten feinen roten Granula aus.
- Basophile Granulozyten erkennt man durch ihr feines tiefblau granuliertes Zytoplasma.
- Neutrophile Granulozyten haben je nach Alter einen z. T. mehrfach segmentierten Kern und zeigen lichtmikroskopisch allenfalls eine schwache Granulierung.
- Makrophagen und Monozyten sind die größten zu findenden Zellen, mit großen, teilweise weniger intensiv gefärbten Kernen, die rund oder hufeisenförmig sind. Ihr Zytoplasma weist keine Granulierung auf.

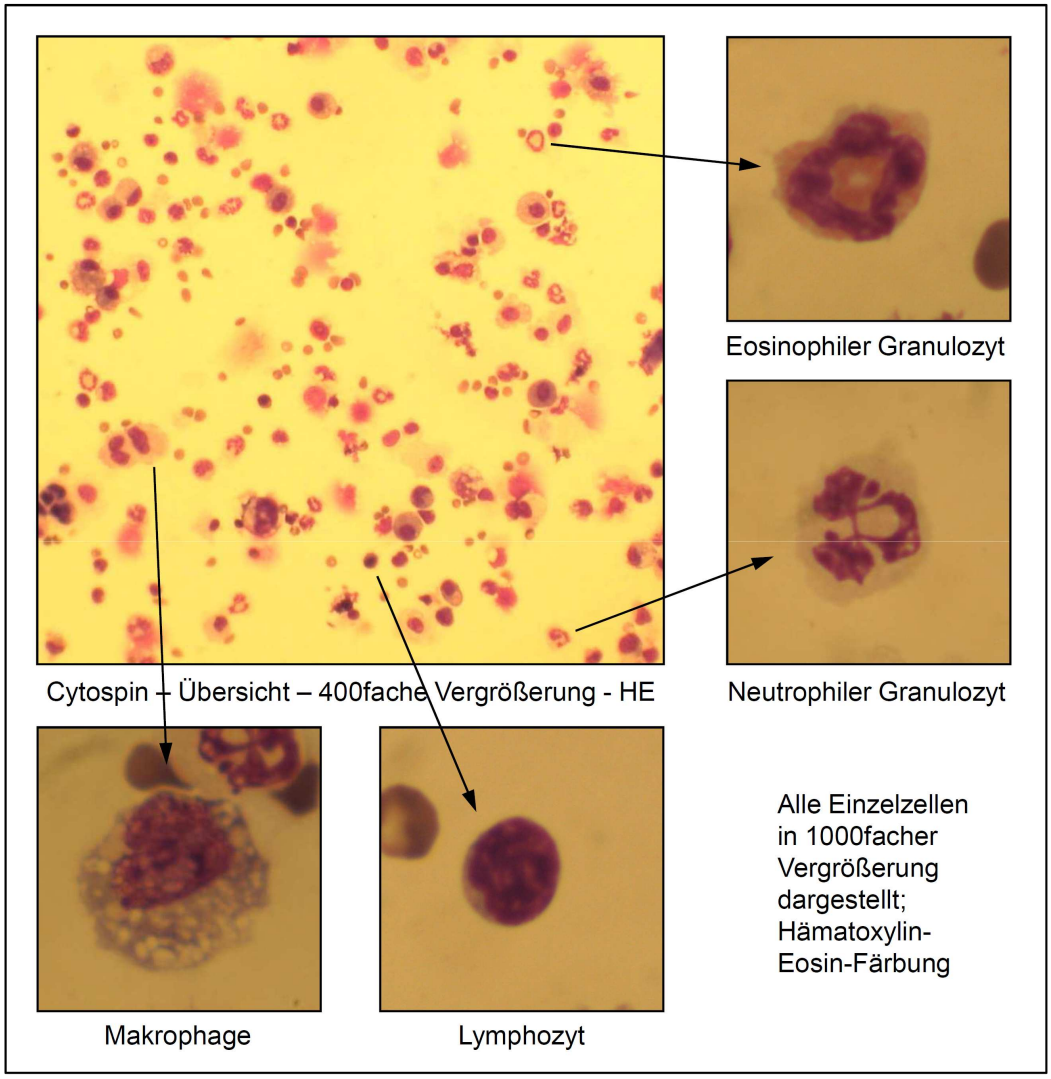

Abbildung 3.3: **Lichtmikroskopische Darstellung eines Cytospins und einzelner Zellen.** Dargestellt ist ein repräsentativer Cytospin aus der OVA-Gruppe des Versuches Nummer 11. Alle Zellen sind HE-gefärbt. Die Übersicht wurde bei 400facher, die einzelnen Zellen bei 1000facher Vergrößerung aufgenommen (Abbildungen teilweise nachbearbeitet).

3.7 FACS-Analyse

Mit der Durchflusszytometrie (FACS) kann man Zellen mittels der an ihrer Oberfläche exprimierten Antigene phänotypisieren. Man verwendet dazu mit Fluorochromen markierte monoklonale Antikörper, welche mit ihrem spezifischen Fab-Fragment an das zu detektierende Oberflächenantigen binden.

CD3, CD4 und CD8 sind Bestandteil des T-Zell-Rezeptorkomplexes (TCR) und dienen der Interaktion mit MHC-II bzw. MHC-I. Sie sind als T-Zell-spezifisch zu betrachten und daher zu ihrer Charakterisierung gut geeignet und auch etabliert [111-113].

Zur Identifikation von murinen DCs, welche bei der T-Zell-Aktivierung eine große Rolle spielen [114-116], benutzte ich einen Antikörper gegen CD11c. CD11c ist ein beta 2-Integrin und spielt eine Rolle bei der Migration und Diapedese [117-119] und ist darüber hinaus an der Erfassung und Präsentation von Antigenen durch DCs beteiligt [120-122].

Murine Makrophagen lassen sich durchflusszytometrisch über ihr F4/80-Oberflächenmolekül charakterisieren. F4/80 ist ein Mitglied der EGF-TM7-Rezeptorfamilie, zu deren Aufgaben unter anderem die Signalübertragung und Adhäsion gehören [123-125]. Konkret ist der F4/80-Rezeptor für die Differenzierung antigenspezfischer regulatorischer T-Zellen verantwortlich und somit ein wichtiger Baustein der immunologischen Toleranz [126,127].

Bei der durchflusszytometrischen Abgrenzung der murinen eosinophilen Granulozyten bietet sich als Marker CCR3 an [128,129]. Hierbei handelt es sich um einen CC-Chemokinrezeptor, welcher vor allem auf der Oberfläche von eosinophilen Granulozyten exprimiert wird, aber auch auf Basophilen und Th2-Zellen zu finden ist [130-133]. CCR3 bindet unter anderen chemotaktisch wirkende Chemokine (Eotaxin, RANTES u. a.) und bewirkt eine Steigerung der Rekrutierung und Proliferation [131,134,135].

Zur selektiven Darstellung neutrophiler Granulozyten (PMN) verwendete ich NIMP-R14, von welchem in Studien gezeigt werden konnte, dass er als inhibierender monoklonaler Antikörper PMN effizient depletieren kann [136,137].

Als weitere Methode zur Abgrenzung von Eosinophilen und Neutrophilen innerhalb der Granulozytenpopulation mittels FACS ist die Differenzierung mittels Granularität beschrieben [139-141]. Über das Ausmaß der Seitwärtsstreuung (SSC) lässt sich der Grad der Granulierung der gemessenen Zellen abschätzen, die Intensität der Vorwärtsstreuung (FSC) korreliert mit der Größe der gemessenen Zellen. Eosinophile weisen eine höhere und feinere Granulierung des Zytoplasmas auf als Neutrophile und haben daher im FACS eine höhere Seitwärtsstreuung (SSC^{high}). In der Streulichtdarstellung lassen sich daher beide Populationen über die Intensität der Seitwärtsstreuung (SSC) recht gut von einander trennen.

Oberflächenantigen	**Repräsentiert auf Zelltyp**
CD3	T-Zellen
CD4	T-Helferzellen
CD8	zytotoxische T-Zellen
CD11c	dendritische Zellen
F4/80	Makrophagen
CCR3, SSC^{high}	eosinophile Granulozyten
NIMP-R14, SSC^{low}	neutrophile Granulozyten

Tabelle 3.1: Im Rahmen der Durchflusszytometrie verwendete phänotypische Marker zur Charakterisierung einzelner Zelltypen.

Um die unspezifische Bindung des Fc- Teils der verwendeten Antikörper am Fc- Rezeptor der zu untersuchenden Zellen zu verhindern, muss man diesen mit einem CD16/32-Antikörper, dem sogenannten Fc-Block, besetzen. Ein weiterer Störfaktor ist die unspezifische Proteinbindung zwischen Antikörper und Zelloberfläche. Durch den Einsatz von murinen Fluorochrom markierten Isotyp-Antikörpern lässt sich diese Störgröße ermitteln und aus den Messsignalen heraus rechnen.

Als Fluorochrome verwendete ich Fluorescein Isothiocyanat (FITC) und R-Phycoerythricin (PE), welche nach Anregung durch den in unserem Durchflusszytometer verwendeten Argonlaser Licht bei einer Wellenlänge von 525-530 nm (FITC), bzw. 570-580 nm (PE) emittieren. Die Intensität des emittierten Lichtes korreliert mit dem Anteil des spezifisch gebundenen Oberflächenantikörpers und der dadurch charakterisierten Zellen.

Ich führte alle FACS-Analysen und Auswertungen mit dem FACS-Calibur Gerät unter Verwendung der CellQuest-Software durch, welche auf einem Apple Power MAC G4 installiert war.

3.7.1 FACS- Färbung

Je Versuchstier wurden $3{,}2x10^6$ Zellen in je sieben Wells einer 96-well Platte pipettiert. Um die Zellen zu waschen, wurden die beladenen Wells mit 200 µl FACS-Puffer befüllt und die Platte wurde für 5 Minuten bei 200 g und 4°C zentrifugiert. Dann wurde der Überstand verworfen und das verbliebene Zellpellet im restlichen FACS-Puffer resuspendiert. Der Waschschritt wurde noch ein zweites Mal wiederholt, anschließend wurden 10 µl Fc-Block (10 µg/ml) zu den Zellen pipettiert und die Platten 5 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Es folgte das Aufbringen von 10 µl des 1. Antikörpers (siehe Tabelle 3.2) mit anschließender 30minütiger Inkubationszeit im Kühlschrank. Danach wurden die Platten wie oben beschrieben mit 150 µl FACS-Puffer gewaschen und der 2. Antikörper wurde in die Wells pipettiert, welcher wieder eine halbe Stunde im Kühlschrank binden sollte. Es folgte eine erneuter Waschschritt mit 150 µl FACS-Puffer. Abschließend wurden die gefärbten Zellen mit 100 µl FACS-Puffer resuspendiert, in ein Falcon-Röhrchen überführt und auf ein Gesamtvolumen von 500 µl mit FACS-Puffer aufgefüllt. Es folgte die Messung mit dem Durchflusszytometer.

	1. Antikörper	**2. Antikörper**
1	R2a-FITC	H-IgG-PE
2	CD3-FITC	CD11c-PE
3	CD4-FITC	CD8-PE
4	MHC II-FITC	F4/80-PE
5	-	GR1-bio (+ SA-PE)
6	NIMP (+ anti-rat-FITC)	-
7	CCR3-FITC	-

Tabelle 3.2: Im Rahmen der Durchflusszytometrie eingesetztes Antikörperpanel. Dargestellt sind die verwendeten Kofärbungen.

3.7.2 FACS-Messung und -Auswertung

Zu Beginn der Messung generierte ich einen Dotplot, in welchem die Vorwärtsstreuung gegen die Seitwärtsstreuung dargestellt war, um alle gemessenen Ereignisse abzubilden. Dann definierte ich mittels eines Auswahlfensters (Mastergate) den Bereich, in welchem sich die inflammatorischen Zellen befinden und grenzte den Zellschrott aus. Für jede Antikörperkombination (siehe Tabelle 3.2) erstellte ich einen weiteren Dotplot, in welchem das eine Fluorochrom (z. B. FITC) gegen das andere (z. B. PE) dargestellt wurde, um die entsprechenden positiven Zellen aus dem Mastergate zur Darstellung zu bringen.
Über die Justierung der „Detectors“ stellte ich die Isotypen möglichst genau ein (wichtig, um den Fehler durch die unspezifische Proteinbindung möglichst gering zu halten), mittels der „Compensation“ versuchte ich die gefärbten Zellen möglichst optimal abzubilden. Nachdem ich die Parameter für den jeweiligen Versuchstag ideal eingestellt hatte, maß ich alle Proben durch und speicherte die Messwerte.
Wie erwähnt korreliert die Intensität des emittierten Lichtes mit dem Anteil des spezifisch gebundenen Oberflächenantikörpers, daher lässt sich der Anteil der Oberflächenantigen-positiven von den -negativen Zellen im Mastergate trennen und lässt Rückschlüsse z. B. auf den Gehalt von CD3-positiven Lymphozyten in der untersuchten Probe zu. Bei der GR1-PE Messung bildete ich den entsprechenden Fluorochrom Kanal zusätzlich gegen die Granularität ab (SSC, Seitwärtsstreuung). So gelang es, die tendenziell eher stark granulierten eosinophilen Granulozyten (SSC^{high}) von den gering granulierten neutrophilen Granulozyten (SSC^{low}) abzugrenzen. Die durchflusszytometrisch ermittelten relativen Anteile der zu isolierenden Zellpopulation werden in Prozent der gesamten Zellen im Mastergate wiedergegeben. Anhand der manuell ausgezählten Gesamtzellzahlen lassen sich die absoluten Zahlen der jeweiligen Zellen errechnen.
In Abbildung 3.4 ist eine typische Messung im Durchflusszytometer exemplarisch aufgeführt. Zu beachten ist das Mastergate (R1), welches im Dotplot oben links den zu untersuchenden Bereich definiert und den Zellschrott abgrenzt. Die weiteren Dotplots repräsentieren ausschließlich die jeweiligen Fluorochrom-positiven Zellen aus dem Mastergate. Unten links ist der Dotplot mit den GR1/SSC^{high}-positiven (großer Kreis) und GR1/SSClow-positiven Zellen (kleiner Kreis) dargestellt.

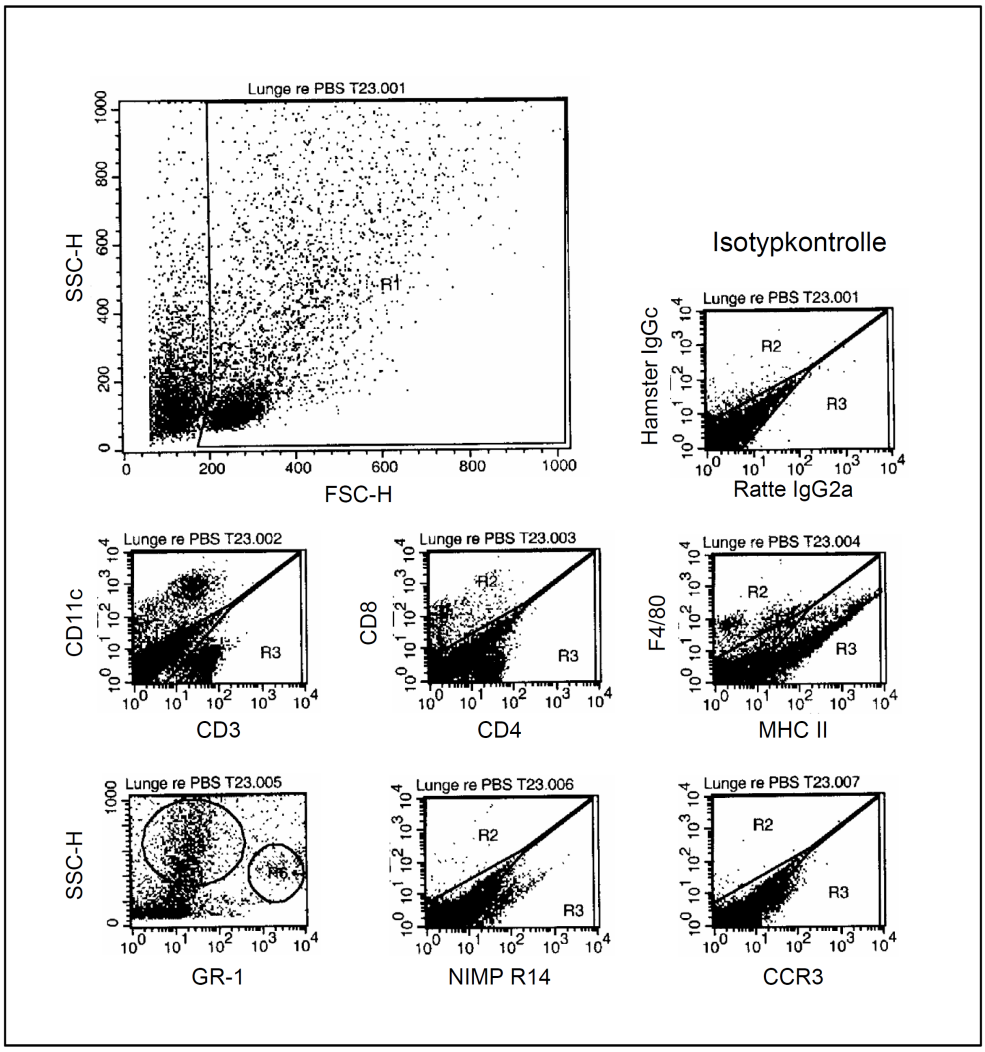

Abbildung 3.4: **Repräsentative FACS-Analyse muriner Lungenzellen.** Dargestellt sind die Daten eines Tieres der PBS-Kontrollgruppe aus Versuch 9. In dem großen Dotplot ist die Gesamtzahl der gemessenen Zellen in der Vorwärts-und Seitwärtsstreuung abgebildet. Die kleineren Dotplots zeigen spezifisch gefärbte Zellen aus dem Gate R1. Über die Isotypenkontrolle wurden die über eine unspezifische Oberflächen-molekülbindung gefärbten Zellen ausgeschlossen.

3.8 ELISA

Bei dem ELISA (enzyme-linked immuno-sorbent assay) handelt es sich um ein indirektes Verfahren, um Proteinkonzentrationen zu ermitteln. Zunächst wird eine Platte mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper (Capture Antikörper) belegt, an welchen ein bestimmtes Epitop des zu detektierenden Zytokins in einer Zellkulturlösung bindet. Dann gibt man im Verlauf einen ebenfalls monoklonalen Antikörper (Detection Antikörper) hinzu, welcher an einem anderen Epitop des Zytokins bindet. Der Antikörper verfügt über eine Enzymaktivität, welche ein Substrat umsetzt, wobei sich dessen optische Eigenschaften ändern. Die optische Dichte korreliert mit der Menge an gebundenem Zytokin und kann in Relation zu einer mittels definierter Standards erstellter Eichkurve quantifiziert werden.

Um die Charakteristik der induzierten Immunreaktion und eventuelle Effekte durch IL-1α zu erfassen, analysierte ich als Vertreter der Th2-Zytokine die Interleukine 4, 5, 10 und 13, deren Rolle in der Th2-Immunreaktion durch viele Studien als gesichert anzusehen ist [142-147].

IL-4 wird in erster Linie von Th2- und Mastzellen produziert [148]. In seiner Eigenschaft als Faktor für die Differenzierung von Th0-Vorläuferzellen zu Th2-Zellen trägt es wesentlich zur Entwicklung einer humoralen Immunantwort bei, welche durch die weitere Sekretion von IL-4 aus Th2-Zellen zusätzlich verstärkt und stabilisiert wird [149]. Dabei induziert IL-4 die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen [150] und den Isotyp-Klassenwechsel zu IgE und IgG1. Außerdem bewirkt es eine Aktivierung und Rekrutierung von Mastzellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten [149]. Auch antiinflammatorische Effekte, wie die Hemmung der Differenzierung und Proliferation von Th1-Zellen über die Antagonisierung von IFN-γ und die Inhibition der Makrophagenaktivierung sind beschrieben [151].

Produktionsstätte des Zytokins IL-5 sind T- und B-Lymphozyten, NK-Zellen, Mastzellen und eosinophile Granulozyten [152-154]. IL-5 wirkt spezifisch auf eosinophile und basophile Granulozyten und führt zu einer verstärkten bronchialen Infiltration durch Eosinophile [155-159]. Zusätzlich ist eine mit IL-4 gemeinsame Stimulation von B-Zellen beschrieben [160,161].

Die Hauptbildungsstätten von IL-10 sind Monozyten, Th2-Zellen und B-Zellen [162,163]. Ihm kommt eine bedeutende Funktion als immunsuppressives (Th2-) Zytokin zu und es wirkt in vielen Bereichen als Gegenspieler der Th1-Zytokine IL-12 und IFN-γ. IL-10 inhibiert in APCs die Produktion von inflammatorischen Zytokinen (IL-12, TNF-α u. a.), sowie die Expression von MHC-II und kostimulatorischen Molekülen und fördert dadurch indirekt die Differenzierung von Th2-Zellen [164,165]. Gleichzeitig wirkt IL-10 als Koaktivator der Proliferation von B-Zellen, fördert die polyklonale Immunglobulinsynthese und aktiviert Mastzellen. In Makrophagen hemmt IL-10 die Produktion von NO und Sauerstoffradikalen [152], bei DCs wurde seine Bedeutung zur Entstehung von Toleranz nachgewiesen [166].

Die Produktion von IL-13 beschränkt sich vornehmlich auf Th2-Zellen, Mastzellen und Basophile. Es vermag eosinophile Granulozyten zu aktivieren und deren Überlebenszeit zu verlängern [167]. Bezüglich der Th2-Zell-Differenzierung spielt IL-13 eine z. T. mit IL-4 überlappende Rolle, obwohl IL-4 als Hauptmediator der Th2-Zellentwicklung gilt [168,169]. Beim allergischen Asthma geht eine erhöhte IL-13-Expression durch Th2-Zellen und aktivierte Mastzellen mit einer bronchiale Obstruktion und einer Mukus-Hypersekretion einher [170,171], eine gezielte Blockade führt zur Linderung der klinischen Symptome [172].

Zum Nachweis von Th1-Effekten griff ich auf IFN-γ zurück, ein Gewebehormon, welchem funktionell eine zentrale Rolle bei der Initialisierung einer Th1-Immunantwort zukommt [173,174].

IFN-γ wird vornehmlich von Th1-Zellen, CTLs und NK-Zellen produziert [175-177] und ist ein Klasse II-Interferon [178]. Stimuliert durch die IL-12- und IL-18-Sekretion von APCs sezernieren Th1-Zellen IFN-γ und proliferieren durch eine autokrinen Verstärkung [179,180]. Weiterhin führt es zur Aktivierung von NK-Zellen und Makrophagen [181] und der Hochregulation von MHC-I [182] und dient somit beispielsweise einer zellulär-vermittelten Abwehr gegen Bakterien oder Viren [183]. Zusätzlich induziert IFN-γ die IL-12-Produktion in Phagozyten [184] und hemmt die Synthese von IL-4 in Th2-Zellen [185]. Darüber hinaus stimuliert es die Diapedese und Migration von Lymphozyten [186,187].

Alle Messungen wurden mit dem ELISA Microplate Reader ELx808 in Verbindung mit der KC junior Software durchgeführt.

Bei den folgenden Ausführungen soll exemplarisch ein Herstellerprotokoll der Firma BD und eines der Firma R&D dargestellt werden. Die anderen ELISA wurden analog der Protokolle durchgeführt und unterscheiden sich lediglich durch die verwendeten Kits und Reagenzien (siehe 2.9.1-2.9.5)

3.8.1 IL-4 ELISA

Am Vortag hatte ich die Platten mit jeweils 100 µl Capture Antibody (500 µg/ml) pro Well belegt und über Nacht bei 4°C inkubieren lassen (pro Platte werden 48 µl Capture AB auf 11,95 ml Coating Puffer benötigt). Am nächsten Tag habe ich die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen und danach für eine Stunde mit 200 µl Assay diluent geblockt. Inzwischen verdünnte ich meine Proben 1:2 mit Assay Diluent und setzte eine aus acht Proben bestehende Standardreihe an, die ausgehend von 500 pg/ml um den Faktor zwei linear herunter verdünnt wurde. Der achte Standard diente als Leerwert und enthielt ausschließlich Assay Diluent. Nach dem Blocken habe ich die Platten erneut dreimal gewaschen und je 100 µl Standard (Doppelbestimmung) bzw. Probe auf die Platte gegeben und für 2 Stunden inkubieren lassen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Platten fünfmal gewaschen, danach wurden je 100 µl des zuvor angesetzten Detektionsantikörpers (500 µg/ml) zugegeben (pro Platte mischte ich 48 µl Detection-Antikörper und 48 µl Avidin HRP mit 12 ml Assay diluent). Die Platten wurden dann für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten sieben Waschritte, anschließend gab ich jeweils 100 µl Substrat (TMB und Hydrogen Peroxide, 1:1 gemischt) in jedes Well und ließ alles für etwa 20-30 Minuten bei Raumtemperatur unter Beachtung der Färbungsgeschwindigkeit dunkel inkubieren. Nach ausreichender Reaktionszeit (erkennbar am linearen Farbabfall der mit Standard belegten Wells) stoppte ich die Reaktion mit je 50 µl Phosphorsäure. Dann wurde die optische Dichte der einzelnen Standards und Proben bei 450 nm im Plattenreader gemessen.

3.8.2 IL-10 ELISA

Durchführung analog 3.7.1, allerdings mit einer Standardreihe ausgehend von 2000 pg/ml.

3.8.3 IFN-γ ELISA

Auch hier wurden die Platten am Vortag mit je 100 µl Capture-Antikörper (720 µg/ml) beschickt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert (pro Platte 11 ml PBS mit 61 µl Capture-Antikörper). Am Versuchstag wurden die Platten zweimal gewaschen und mit 300 µl Block- Puffer je Well belegt. Während des Blockens wurden die Standartreihe ausgehend von 2000 pg/ml angelegt, und die Proben 1:2 mit Reagent Diluent verdünnt. Nach dem Blocken wusch ich die Platten zweimal, beschickte sie mit Standard und Proben (100 µl je Well) und ließ alles für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren. Nach zweimaligem Waschen gab ich jeweils 100 µl Detection- Antikörper(144 µg/ml) in jedes Well (pro Platte 11 ml Reagent Diluent mit 65 µl Antikörper), es folgte eine weitere Inkubationszeit über 2 Stunden. Danach wurden (nach zweimaligem Waschen) Streptavidin hinzugegeben (100 µl je Well, pro Platte 55 µl Streptavidin auf 11 ml PBS) und die Platten für 20 Minuten dunkel inkubiert. Es erfolgte ein zweimaliger Waschschritt und die Zugabe von je 100 µl Substrat mit einer anschließenden Reaktionszeit von etwa 20 Minuten, dann wurde die Reaktion wieder mit je 50 µl Phosphorsäure gestoppt und die optische Dichte bei 450 nm gemessen.

3.8.4 IL-5 ELISA

Analog 3.8.3, allerdings mit einer Verdünnung der Proben von 1:3 und einem höchsten Standard von 2000 pg/ml.

3.8.5 IL-13 ELISA

Analog 3.8.3, allerdings mit einer Verdünnung der Proben von 1:3 und einem höchsten Standard von 4000 pg/ml.

3.9 Statistische Auswertung

Meine statistischen Auswertungen führte ich mit StatView für Windows, Version 5.0 (SAS Institute Inc., 1992-1998), unter Annahme eines Signifikanzniveaus von $p \leq 0{,}05$ und unter Verwendung des Students t-Tests für unverbundene Stichproben durch. Als Hypothese wurde angenommen, dass es keinen nachweisbaren Unterschied zwischen den zu vergleichenden Daten gibt (=0). Es wurden immer mindestens drei Versuche mit mindestens drei Versuchstieren je Gruppe ausgewertet.

Alle Daten wurden als Mittelwert ± SEM aus n = 3-12 unabhängigen Versuchen mit ≥ 3-5 Mäusen/Gruppe dargestellt.

Sämtliche Abbildungen und Tabellen wurden mit den Programmen Word, Excel und Powerpoint des Office 2003 Pakets der Firma Microsoft, sowie dem PDFCreator in der Version 0.9.7 erstellt.

4. Ergebnisse

4.1 Methodenetablierung zur Zellgewinnung, Zellausbeute und Restimulation

4.1.1 Mechanische und enzymatische Prozessierung

Um bezüglich der Zellisolierung aus der kompletten murinen Lunge ein praktikables Verfahren zur optimalen Zellausbeute zu ermitteln, führte ich zunächst vier Vorversuchsreihen durch. Wie bereits in Abschnitt 3.3 beschrieben, separierte ich die Lunge mittels Pinzette oder Medimachine, bzw. drückte die zuvor zerteilte Lunge mittels eines Spitzenstempels durch ein Zellsieb. Im weiteren Verlauf setzte ich zusätzlich eine enzymatische Aufspaltung unterschiedlicher Dauer des Lungengewebes ein. Durch die Kombination der mechanischen Zerteilung der Lunge mittels Pinzette, enzymatischem Verdau über 60 Minuten und dem anschließenden Passieren der Lungenstücke durch ein Zellsieb, ließ sich die Anzahl der gewonnene Zellen letztendlich im Mittel auf $18{,}2 \pm 4{,}7 \times 10^6$ je Lunge maximieren (siehe Abb. 4.1 A). In den Folgeversuchen wurde auschließlich diese Methode zur Gewinnung von Zellen aus der gesamten murinen Lunge verwendet.

4.1.2 Gesamtzahl der aus der Lunge bzw. BAL gewonnenen Zellen

Bezogen auf die Gesamtheit der durchgeführten Versuche betrug die Gesamtzahl der aus einer rechten murinen Lunge isolierten Zellen im Mittel $23{,}6 \pm 1{,}4 \times 10^6$. Signifikant mehr Zellen ließen sich aus den Lungen der Tiere, welche zusätzlich mit IL-1α an Tag 0, 1 und 2 ($26{,}7 \pm 1{,}4 \times 10^6$ Zellen, Mittelwert ± SEM, $p \leq 0{,}002$) bzw. an den Tag 21-23 behandelt worden waren ($26{,}6 \pm 1{,}9 \times 10^6$, $p \leq 0{,}05$), isolieren.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Analysen der mittels BAL gewonnenen Zellen ist zu beachten, dass weniger Zellen aus der BAL gewonnen werden konnten als aus einer komplett prozessierten Lunge (durchschnittlich je Tier $1{,}9 \pm 0{,}4 \times 10^6$ versus $23{,}6 \pm 1{,}4 \times 10^6$). Darüber hinaus war die Anzahl der durchgeführten Experimente zur Analyse der BAL geringer, als die zur Analyse der kompletten Lunge (4 versus 8 mit identischem Protokoll). Demzufolge war

ebenso die Zahl der lavagierten Tiere niedriger als die der pneumektomierten (insgesamt durchschnittlich 17 lavagierte Mäuse je Gruppe versus im Mittel 39 einseitig pneumektomierte Tiere je Gruppe).
Innerhalb der einzelnen Gruppen war die Differenz zwischen den isolierten Zellzahlen aus der BAL und aus der kompletten Lunge unterschiedlich ausgeprägt. Besonders deutlich stellte sich dies in der Gruppe, welche zusätzlich an den Tagen 0 bis 2 mit IL-1α behandelt worden war, dar. So konnten in dieser Gruppe um mehr als den Faktor zehn niedrigere Zellzahlen aus der BAL isoliert werden als aus der kompletten Lunge ($p \leq 0{,}002$, siehe Abb. 4.1 B).

4.1.3 Restimulation der isolierten Zellen mit OVA-Protein bzw. OVA-Peptid

In einer Reihe von weiteren Vorversuchen untersuchte ich, ob sich die gewonnenen und kultivierten Zellen durch OVA-Peptid bzw. OVA-Protein besser restimulieren und zur Produktion von Zytokinen anregen lassen. Durch Herrn Prof. Dr. Edgar Schmitt (Institut für Immunologie, Mainz) wurde mir freundlicherweise OVA-Peptid$_{323\text{-}339}$ (Sequenz ISQAVHAAHAEINEAGR) zu Verfügung gestellt. Nachdem ich die myeloiden, inflammatorischen Zellen mittels der in Abschnitt 3.3 beschriebenen Methode isoliert hatte, wurden jeweils $1x10^6$ Zellen mit PBS, 5 µg/ml OVA-Peptid, 50 µg/ml OVA-Protein bzw. 1 pg/ml SEB versetzt und für 24, 48 und 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Es zeigte sich, dass sich nach Restimulation mit OVA-Protein eine maximale Zytokinproduktion erzielen lässt (im Mittel nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden, siehe Abb. 4.1 C).

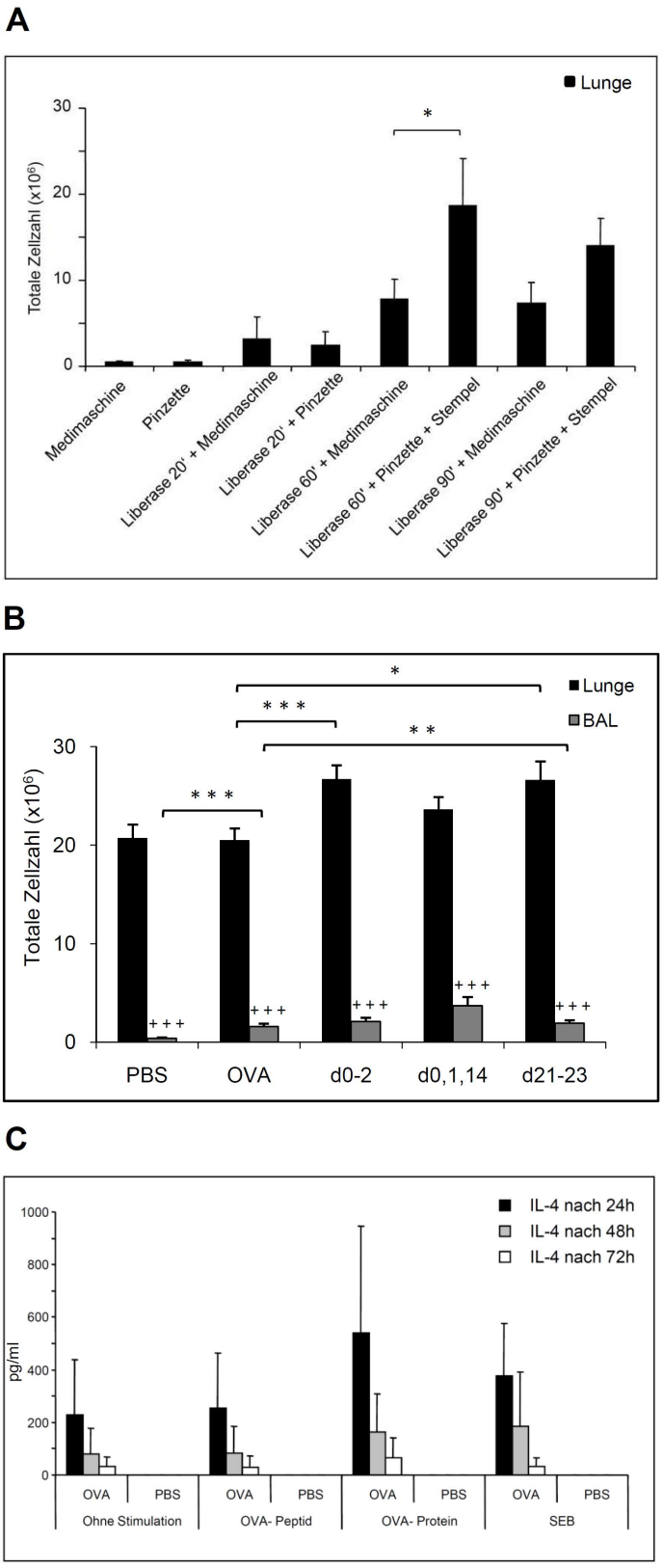

Abbildung 4.1: **Methoden-etablierung zur Zellgewinnung, Zellausbeute und Restimulation.** Bei jeweils 5 Mäusen wurde entsprechend dem in Abschnitt 3.1 beschriebenen Protokoll ein allergisches Asthma induziert. An Tag 30 wurde die rechte Lunge entnommen und mittels unterschiedlicher Methoden behandelt, um inflammatorische Zellen zu isolieren. Dargestellt sind die absolut gewonnen Zellzahlen (Mittelwerte ± SEM, Abb. **A**). Abb. **B** stellt die Zahl der an Tag 30 aus der rechten Lunge und aus der BAL gewonnen Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung (PBS, OVA, IL-1α, siehe Abschnitt 3.1) dar (Mittelwerte ± SEM). Abb. **C** stellt die mittels ELISA gemessene Konzentration von IL-4 nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubation dar (Mittelwerte ± SEM). Jeweils $1x10^6$ Zellen wurden nach Isolation aus der Lunge kultivert und mit PBS, 5 µg/ml OVA-Peptid, 50 µg/ml OVA-Protein bzw. 1 pg/ml SEB restimuliert.
($n \geq 3$; Diff. zu OVA: * = $p \leq 0,05$; * * = $p \leq 0,005$; * * * = $p \leq 0,002$; Lunge vs. BAL: + = $p \leq 0,05$; + + = $p \leq 0,005$; + + + = $p \leq 0,002$)

4.2 Histologische Differenzierung mittels Cytospin

In der Auswertung der Cytospins der aus der kompletten rechten Lunge isolierten Zellen zeigte sich in der OVA-Gruppe ein signifikant höherer Anteil an murinen eosinophilen Granulozyten verglichen mit der Kontrollgruppe (21 ± 1% versus 7 ± 1%, $p \leq 0{,}002$). Im Gegensatz dazu ließen sich niedrigere Anteile an Lymphozyten (31 ± 1% versus 33 ± 1%, $p \leq 0{,}002$) und Monozyten/Makrophagen nachweisen (45 ± 1% versus 58 ± 1%, $p \leq 0{,}002$). Die mit IL-1α behandelten Tiere zeigten im Vergleich zu OVA (21 ± 1% und 31 ± 1%) signifikant prozentual niedrigere Werte für eosinophile Granulozyten und Lymphozyten in den Gruppen, welche an Tag 0, 1, 14 (21 ± 1%, $p \leq 0{,}05$ und 23 ± 1%, $p \leq 0{,}002$) und an Tag 21-23 (16 ± 1%, $p \leq 0{,}005$ und 24 ± 1%, $p \leq 0{,}002$) gechallenged worden waren. Andererseits waren die Anteile von neutrophilen Granulozyten (IL-1α an Tag 0-2 und 0, 1, 14) und Monozyten/Makrophagen (IL-1α an Tag 0, 1, 14 und 21-23) in den Cytospins relativ gesehen zur reinen OVA-Gruppe erhöht (6 ± 1%, $p \leq 0{,}002$ und 5 ± 0,4%, $p \leq 0{,}05$ versus 3 ± 1%, sowie 51 ± 1% und 56 ± 2% versus 45 ± 1%, beide $p \leq 0{,}002$).

In absoluten Zahlen betrachtet bestätigte sich der Trend in der OVA-Gruppe zu erhöhten Zellzahlen für eosinophile Granulozyten ($4{,}3 \pm 0{,}3 \times 10^6$ versus $1{,}4 \pm 0{,}2 \times 10^6$) und erniedrigten Werten für Monozyten/Makrophagen ($9{,}3 \pm 0{,}6 \times 10^6$ versus $12{,}3 \pm 1{,}3 \times 10^6$) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Signifikante Unterschiede in der Anzahl der isolierten murinen Lymphozyten zwischen den einzelnen Populationen waren nicht nachweisbar. In der Gruppe der mit IL-1α behandelten Tiere zeigten sich verglichen mit den reinen OVA-Tieren im Durchschnitt höhere Zellzahlen für neutrophile Granulozyten (IL-1α an Tag 0-2: $1{,}5 \pm 0{,}2 \times 10^6$; Tag 0, 1, 14: $1{,}2 \pm 0{,}1 \times 10^6$; ; Tag 21-23: $1{,}1 \pm 0{,}2 \times 10^6$ versus $0{,}7 \pm 0{,}1 \times 10^6$) und Monozyten/Makrophagen (Tag 0-2: $12{,}5 \pm 0{,}9 \times 10^6$; Tag 0, 1, 14: $12{,}3 \pm 1{,}0 \times 10^6$; Tag 21-23: $14{,}9 \pm 1{,}2 \times 10^6$ versus $9{,}3 \pm 0{,}6 \times 10^6$). Divergierend von der Verteilung der relativen Anteile bei den murinen eosinophilen Granulozyten ergab die Umrechnung in absolute Zellzahlen statistisch signifikant größere Werte für die Mäuse der Gruppe mit der IL-1α Behandlung an Tag 0-2 ($6{,}4 \pm 0{,}4 \times 10^6$ versus $4{,}3 \pm 0{,}3 \times 10^6$). Für die beiden anderen mit IL-1α behandelten Gruppen wurde dieser Trend nicht bestätigt.

Bei der Auswertung der zytologischen Präparate der BAL zeigten sich bezüglich der relativen Anteile der einzelnen Zellarten zwischen den einzelnen Gruppen weniger signifikante Unterschiede, als bei der zytomorphologischen Betrachtung der aus der gesamten Lunge gewonnen Zellen. Hochsignifikant erhöht war der prozentuale Anteil der eosinophilen Granulozyten in der OVA-Gruppe, verglichen mit der Kontrollgruppe (39 ± 3% versus 1 ± 0,3%, $p \leq 0{,}002$), wie bei einer Th2-vermittelten Immunantwort zu erwarten war. Zwischen der reinen OVA-Gruppen und den zusätzlich mit Interleukin-1α behandelten Tieren zeigten sich keine signifikanten Abweichungen. Die neutrophilen Granulozyten fanden sich tendenziell eher in den Lavages der Tiere, welche zusätzlich zu OVA an den Tagen 0-2 bzw. 0, 1 und 14 mit Interleukin-1α behandelt worden waren (7 ± 2% und 5 ± 1% versus 1 ± 0,3%, $p \leq 0{,}002$). Bei der Verteilung der Lymphozyten zeigte die OVA-Gruppe signifikant niedrigere Werte als die Kontrollgruppe (9 ± 1% versus 14 ± 2%, $p \leq 0{,}05$). Ebenso im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt war der prozentuale Anteil der Monozyten bei den Tieren, welche ausschließlich OVA-exponiert waren (51 ± 3% versus 83 ± 2%, $p \leq 0{,}002$).

Wenn man die relativen Anteile der Zellen mit den jeweils aus der BAL gewonnenen Gesamtzellzahlen korrelierte, spiegelten sich die oben beschriebenen Trends nur bedingt in den absoluten Zahlen wieder. Hier kamen vor allem die erheblichen Unterschiede in der Zellausbeute zwischen den einzelnen Gruppen zum Tragen (siehe Abbildung 4.1 B). In allen Zellreihen wiesen die BAL der PBS-Tiere die niedrigsten Zahlen auf (eosinophile Granulozyten $2 \pm 5x10^3$ Zellen versus $6 \pm 0{,}1x10^5$, $p \leq 0{,}002$; neutrophile Granulozyten $1 \pm 0{,}1x10^4$ Zellen versus $2 \pm 1x10^4$, $p \leq 0{,}05$; Lymphozyten $6 \pm 1x10^4$ Zellen versus $1{,}6 \pm 0{,}3x10^5$, $p \leq 0{,}05$; Monozyten $3{,}1 \pm 0{,}5x10^5$ Zellen versus $8{,}3 \pm 1{,}3x10^5$, $p \leq 0{,}002$;). Wie schon bei der relativen Auswertung konnte man innerhalb der mit OVA behandelten Mäuse Unterschiede in der Zahl der neutrophilen Granulozyten messen: Bei den Tieren, welche an den Tagen 0-2 und 0, 1 und 14 mit IL-1α behandelt worden waren, zeigten sich signifikant höhere Werte, verglichen mit der reinen OVA Gruppe ($1{,}6 \pm 0{,}5x10^5$ und $2{,}2 \pm 0{,}7x10^5$ versus $2 \pm 1x10^4$, beide $p \leq 0{,}002$).

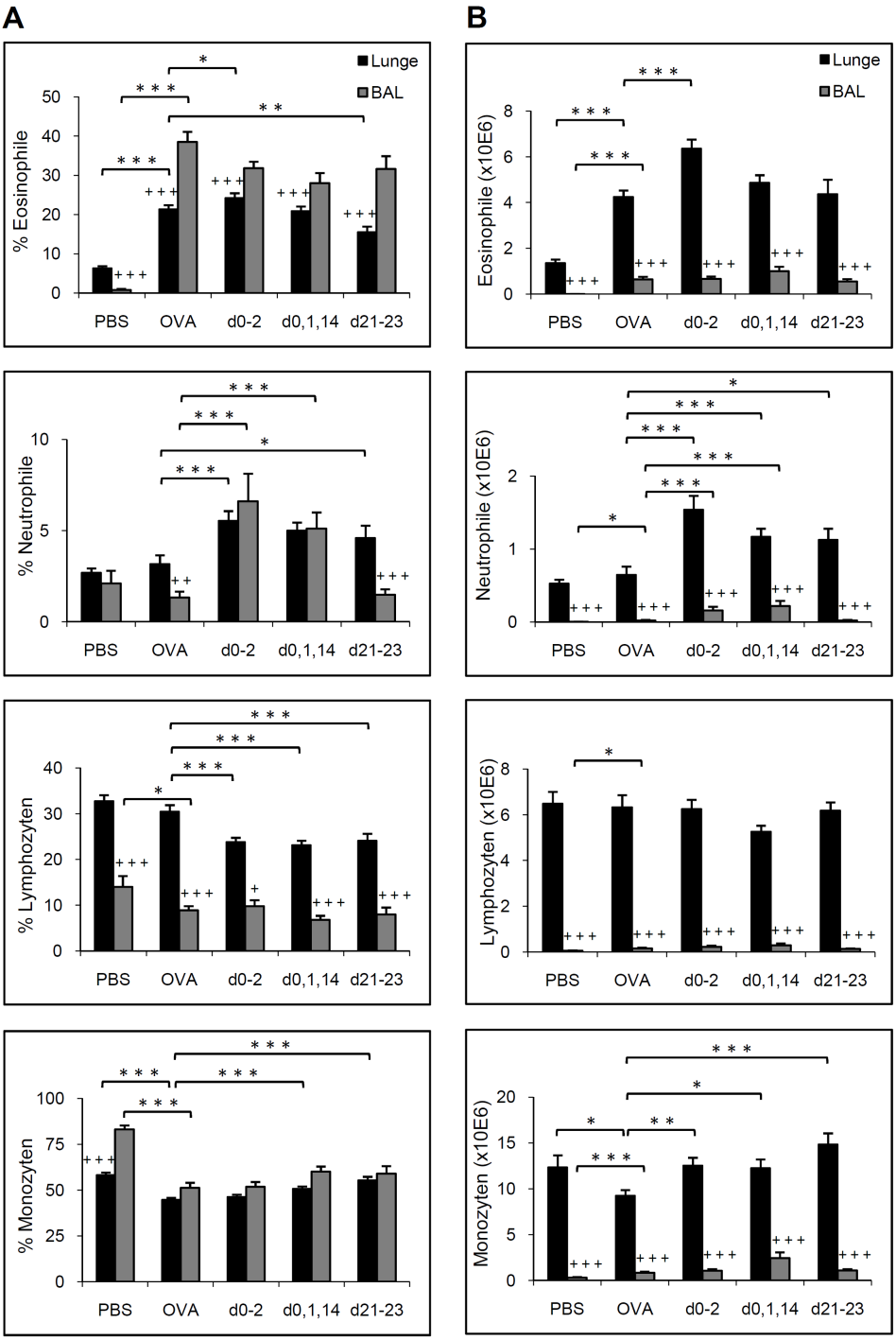

Abbildung 4.2: **Histologische Differenzierung der aus der kompletten Lunge und aus der BAL isolierten inflammatorischen Zellen mittels Cytospin.** Bei jeweils 5 Mäusen wurde ein allergisches Asthma induziert (Abschnitt 3.1). An Tag 30 wurden aus der gesamten Lunge und aus der BAL inflammatorische Zellen isoliert und mittels Cytospin differenziert. Dargestellt sind die relativen Anteile (Mittelwerte ± SEM, Abb. **A**), bzw, die absolut gewonnen Zellzahlen der jeweiligen Zelltypen (Mittelwerte ± SEM, Abb. **B**). ($n \geq 3$; Diff. zu OVA * = $p \leq 0{,}05$; * * = $p \leq 0{,}005$; * * * = $p \leq 0{,}002$; Lunge vs. BAL + = $p \leq 0{,}05$; + + = $p \leq 0{,}005$; + + + = $p \leq 0{,}002$)

4.3 FACS-Charakterisierung der gewonnenen Zellen

In der Auswertung der Messungen zeigte sich, dass sich bei einer durchschnittlichen Tierzahl von n=32 Tiere je Gruppe aus den kompletten Lungen der Tiere der OVA-Gruppe relativ gesehen weniger CD8-positive, zytotoxische T-Zellen isolieren ließen, als aus den Lungen der Kontrolltiere (6 ± 0,2% versus 7 ± 0,3%, Mittelwert ± SEM, $p \leq 0,002$). Erhöhte Anteile an isolierten Zellen in der OVA-Gruppe konnte ich für DC (CD11c-positiv: 14 ± 1% versus 12 ± 1%, $p \leq 0,05$), Makrophagen (F4/80-positiv: 12 ± 1% versus 7 ± 0,3%, $p \leq 0,002$), CCR3-positive eosinophile Granulozyten (6 ± 1% versus 5 ± 0,3%, $p \leq 0,002$) und über die Granularität abgegrenzte neutrophile Granulozyten (SSC^{low}: 11 ± 1% versus 5 ± 0,4%, $p \leq 0,002$) messen. Bei den mit IL-1α behandelten Tieren konnte man sehen, dass der Anteil der CD3-, CD4-, F4/80- und NIMP-R14-positiven Zellen bei den Tieren, welche an Tag 21-23 zusätzlich IL-1α bekommen hatten, im Vergleich zu den ausschließlich mit OVA-Protein behandelten Tieren signifikant verringert war (16 ± 1% versus 19 ± 1%; 11 ± 1% versus 14 ± 1%; 9 ± 1% versus 12 ± 1% und 3 ± 0,4% versus 6 ± 1%; alle $p \leq 0,05$). Eine isolierte Erniedrigung der NIMP-R14-positiven Zellen (neutrophile Granulozyten) ließ sich bei den an Tag 0, 1, und 14 behandelten Tieren beobachten (3 ± 1%, $p \leq 0,002$). Relativ gesehen erhöht waren dagegen die Messwerte für DC (CD11c-positiv) bei der an Tag 21-23 und an Tag 0-2 behandelten Gruppe (20 ± 1% und 22 ± 1% versus 14 ± 1%, beide $p \leq 0,002$). Isoliert erhöht war der Anteil der über die Granularität differenzierten neutrophilen Granulozyten in der Versuchspopulation, welchen ich an Tag 0-2 IL-1α injiziert hatte (14 ± 1% versus 11 ± 1%, $p \leq 0,05$, Abbildung 4.3).

In absoluten Werten bestätigten sich die erhöhte Zellzahlen bei Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, welche aus den kompletten Lungen der OVA-behandelten Mäuse gewonnen worden waren (2,5 ± 0,2x10^6 und 2,2 ± 0,1x10^6 Zellen versus 1,3 ± 0,1x10^6 und 0,9 ± 0,1x10^6, beide $p \leq 0,002$). Bei den CCR3-positiven Zellen war kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der OVA-Gruppe feststellbar. Auch in der Betrachtung der absoluten Zahlen der CD8-positiven T-Zellen war der niedrigere Anteil in der OVA-Population nicht nachzuweisen. Bei den DC (CD11c-positiv) dominierten erneut die Gruppen der mit IL-1α an Tag 21-23 und an Tag 0-2 behandelten Tiere (5,5 ± 0,4x10^6 und 6,1 ± 0,7x10^6 versus 3,0 ± 0,2x10^6, beide $p \leq 0,002$). Die Zellzahlen der neutrophilen

Granulozyten spiegelten die Gewichtungen der relativen Ermittlung in etwa wieder, allerdings mit stärkerer positiver Betonung der an Tag 0-2 mit IL-1α behandelten Gruppe (SSC^{low}: 3,6 ± $0,3x10^6$ versus 2,2 ± $0,1x10^6$, $p \leq 0,002$). Bei den eosinophilen Granulozyten zeigte sich im Gegensatz zu der relativen Betrachtung eine Vermehrung der SSC^{high}-differenzierten Zellen zugunsten der IL-1α-Tiere. Besonders erhöht waren die Zellzahlen aus den Lungen der Tiere mit Challenge an Tag 0-2 ($5,7 \pm 0,6x10^6$ $p \leq 0,002$) und Tag 21-23 ($5,7 \pm 0,5x10^6$, $p \leq 0,05$), verglichen mit den isolierten Zellen aus den Lungen der reinen OVA-Tiere ($3,9 \pm 0,2x10^6$, Abbildung 4.4).

Die durchflusszytometrische Analyse der mittels BAL gewonnen Zellen zeigte heterogene Ergebnisse, verglichen mit den aus der gesamten Lunge generierten Daten. Bei der Auswertung der relativen Verteilung der Zellen zeigten sich zum Teil ähnliche Tendenzen wie bei der Betrachtung der gesamten Lungen (so waren z. B. erhöhte Anteile durch CCR3 charakterisierte Zellen/eosinophile Granulozyten in der OVA-Gruppe nachweisbar), statistisch signifikante Unterschiede wurden allerdings nicht ermittelt (Abbildung 4.3).

Die Umrechnung der relativen in absolute Zahlenwerte ergab eine signifikante Erhöhung der CD3-, CD4- (beides T-Zell-Marker) und F4/80-positiven Zellen (Makrophagen), sowie den mittels der Granularität differenzierten eosinophilen Granulozyten in der BAL der OVA-Gruppe, verglichen mit den ausschließlich mit PBS behandelten Tiere ($6 \pm 2x10^5$versus $9 \pm 4x10^4$, $2 \pm 0,5x10^5$ versus $0,5 \pm 3x10^5$, $6 \pm 1,1x10^5$ versus $1 \pm 0,2x10^5$ und $5 \pm 1x10^5$ versus $1 \pm 0,2x10^5$, alle $p \leq 0,05$). Die ebenfalls über die Granularität ermittelten Werte für neutrophile Granulozyten zeigten eine statistisch relevante höhere Zellzahl bei den Tieren, welche zusätzlich zu OVA an den Tagen 0, 1 und 14 mit IL-1α behandelt worden waren ($3 \pm 1x10^5$ versus $1 \pm 0,4x10^5$, $p \leq 0,05$). Der Trend zur Erhöhung der CCR3-positiven Zellen in den OVA-Gruppen deutete sich ebenso wie in der relativen Betrachtung auch in absoluten Zahlen an, war allerdings ebenfalls nicht statistisch signifikant ausgeprägt (Abbildung 4.4).

Bei der Betrachtung der phänotypischen Unterscheidung der isolierten Zellen mittels Durchflusszytometrie muss man beachten, dass den Ergebnissen der aus der vollständigen Lunge isolierten Zellen eine wesentlich höhere Fallzahl zugrunde lag als den Ergebnissen der Zellen aus der BAL (n = 32 versus n = 3). Daher ergeben sich bei der Beurteilbarkeit gewisse Einschränkungen.

Die relativen Anteile der T-Lymphozyten in den jeweiligen Untersuchungsmaterialien zeigten abgesehen von einer isolierten Differenz von CD3-positiven Zellen in der OVA-Gruppe keine wesentlichen Unterschiede. Dagegen unterscheiden sich die prozentualen Anteile der CD11c- und F4/80-positiven Zellen aus der kompletten Lunge im Vergleich zur BAL erheblich. So ließen sich vor allem aus den Lungen der Tiere der Kontrollgruppe ein erheblich niedrigerer Anteil an CD11c-positiven Zellen isolieren, als aus der BAL (12 ± 1% (Lunge) versus 51 ± 15% (BAL), $p \leq 0{,}002$). Alle anderen Gruppen, mit Ausnahme der an den Tagen 21 bis 23 mit IL-1α behandelten Tiere, zeigten eine vergleichbare, wenn auch nicht derartig ausgeprägte Tendenz. Bei den F4/80-positiven Zellen zeigen sich bei der Betrachtung der mittels BAL gewonnen Zellen deutliche Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen, ein Effekt, der sich in den Ergebnissen der aus der vollständigen Lunge isolierten Zellen nicht widerspiegelt. So sind hier statistisch signifikante Differenzen der Prozentwerte in der Kontrollgruppe, der reinen OVA-Gruppe und der zusätzlich an Tagen 21 bis 23 mit IL-1α behandelten Gruppe nachweisbar. Bezüglich der CCR3-positiven Zellen fiel auf, dass sich aus der gesamten Lunge deutlich geringere Anteile CCR3-positiver Zellen isolieren ließen, als aus der BAL (hier mit deutlicher Tendenz zu den OVA-sensibilisierten Gruppe). Diese Zahlen korrelierten allerdings nicht mit den Ergebnissen der SSC^{high} differenzierten eosinophilen Granulozyten, hier zeigte sich in der BAL eine erheblichen Streuung der gemessenen Werte.

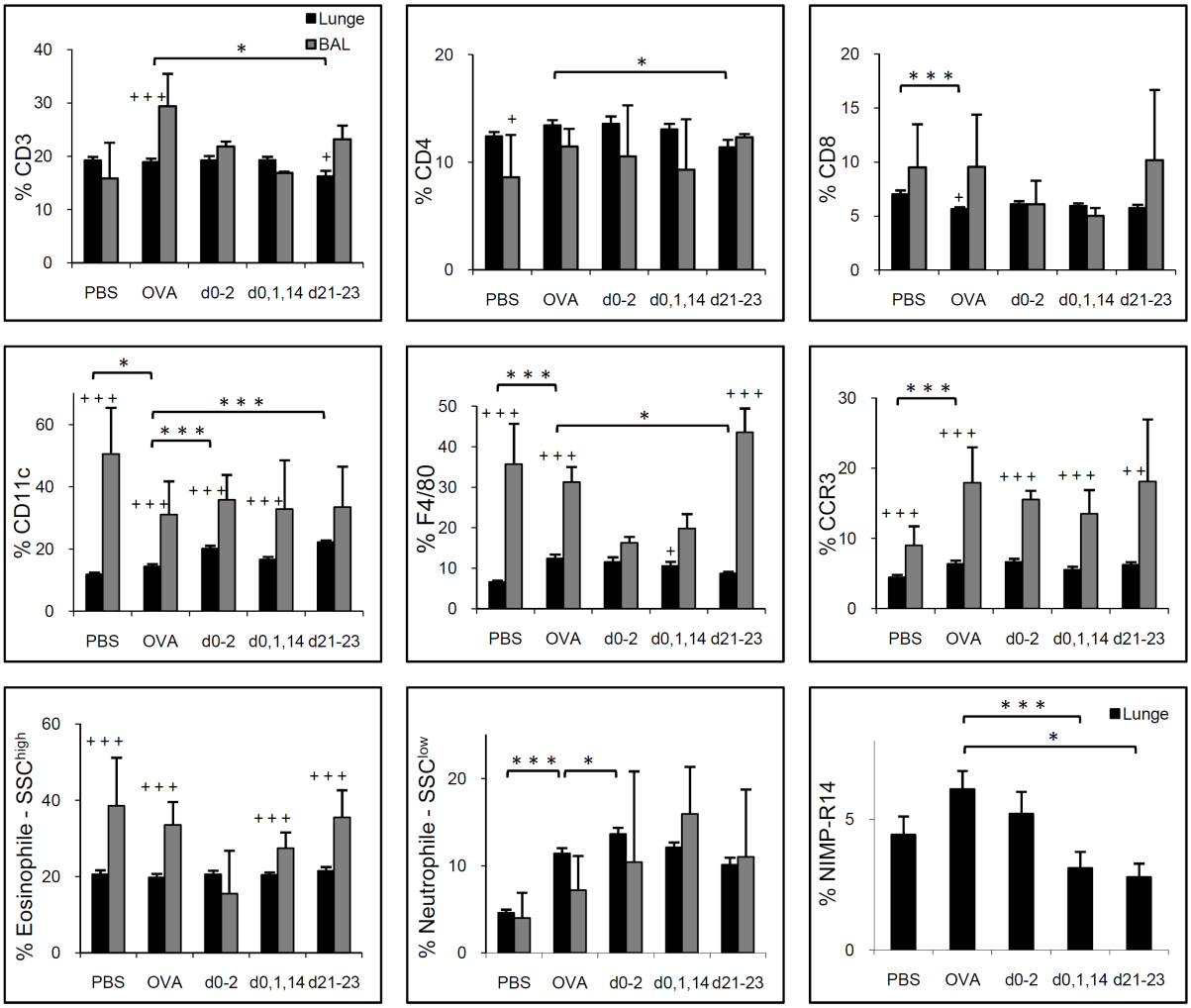

Abbildung 4.3: **Durchflusszytometrisch bestimmte Anteile an inflammatorischen Zellen aus der gesamten Lunge und aus der BAL.** Bei vier Gruppen mit jeweils 5 Mäusen wurde mittels OVA ein allergisches Asthma induziert, zusätzlich erfolgte bei drei Gruppen eine Behandlung mit IL-1α an definierten Tagen, Eine PBS behandelte Gruppe diente als Kontrolle (genaues Protokoll siehe Abschnitt 3.1). An Tag 30 wurden aus der gesamten Lunge und aus der BAL inflammatorische Zellen isoliert, gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (siehe Abschnitt 3.2 - 3.4 und 3.7). Dargestellt sind die relativen Anteile der einzelnen Zelltypen (Mittelwerte ± SEM; n ≥ 3; Differenz zu OVA * = p ≤ 0,05; * * = p ≤ 0,005; * * * = p ≤ 0,002; Lunge vs. BAL + = p ≤ 0,05; + + = p ≤ 0,005; + + + = p ≤ 0,002)

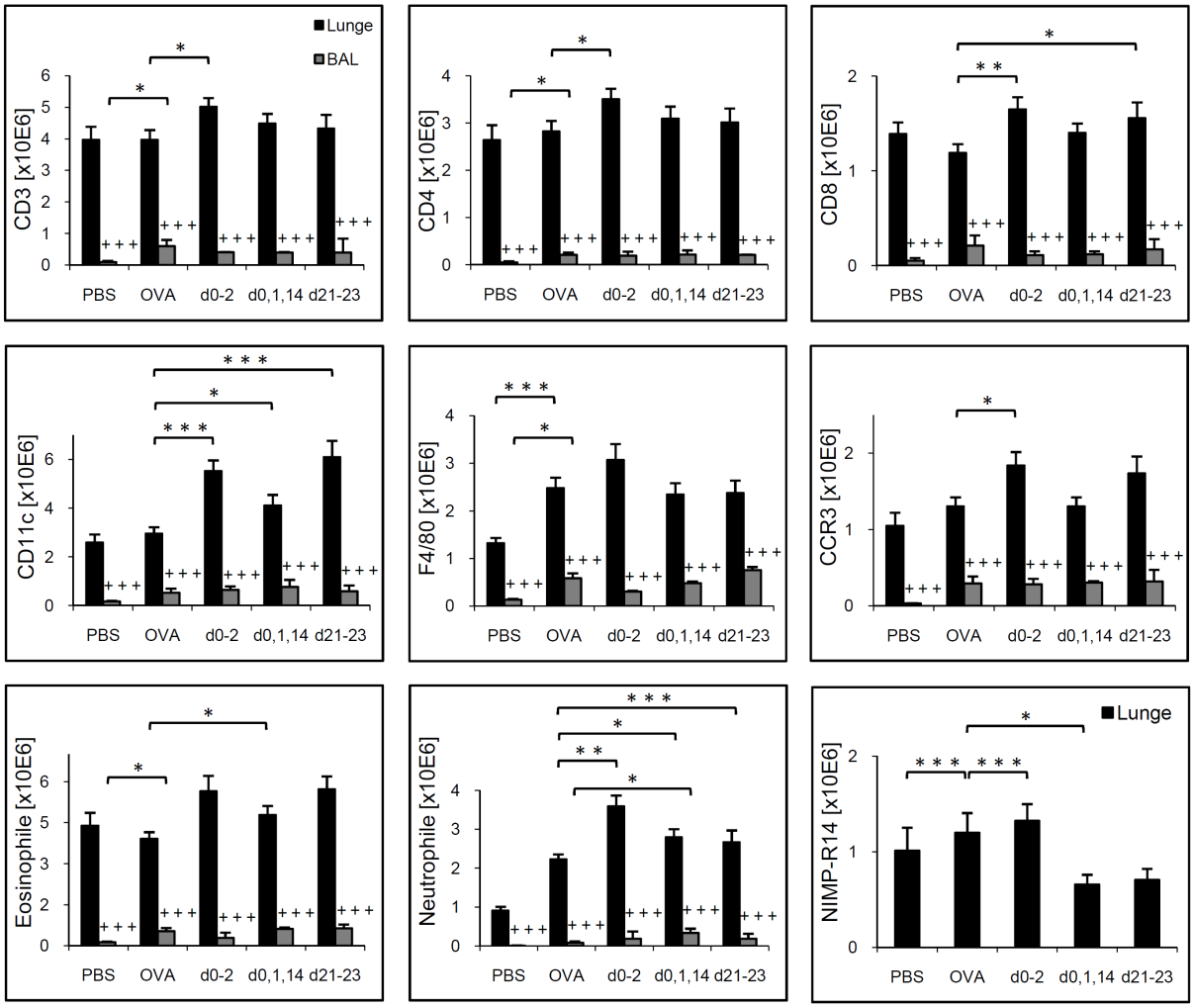

Abbildung 4.4: **Durchflusszytometrisch bestimmte Anteile an inflammatorischen Zellen aus der gesamten Lunge und aus der BAL.** Der Versuchsablauf gestaltete sich analog der Beschreibung in der Legende zu Abbildung 4.3. Durch die Multiplikation der gemessenen Anteile mit der ausgezählten Gesamtzellzahl ergeben sich die absoluten Zahlen der einzelnen Zelltypen (Mittelwerte ± SEM; n ≥ 3; Diff. zu OVA * = p ≤ 0,05; * * = p ≤ 0,005; * * * = p ≤ 0,002; Lunge vs. BAL + = p ≤ 0,05; + + = p ≤ 0,005; + + + = p ≤ 0,002)

4.4 Bestimmung der durch die gewonnen Zellen gebildeten Zytokine

Nachdem ich die aus der kompletten Lunge isolierten Zellen ausplatiert (jeweils $1x10^6$ Zellen je Well einer 96-well-Platte) und je Tier jeweils einmal PBS als Negativkontrolle, sowie OVA-Protein und SEB als Positivkontrolle zur Stimulation hinzugefügt hatte, ließ ich den Ansatz für 24 Stunden im Brutschrank inkubieren. Danach bestimmte ich mittels ELISA-Verfahren die Th2-Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, sowie das für eine Th1-dominierte Immunantwort typische IFN-γ in den Überständen der Zellkulturen.

Da die Anzahl der aus der BAL isolierten inflammatorischen Zellen zu gering war, um eine Zellkultur anzusetzen, bestimmte ich hier die Zytokine in den Zellüberständen nach Zentrifugation. Grundsätzlich konnte ich bei der Auswertung der aus den Überständen mittels ELISA gemessenen Zytokinkonzentrationen feststellen, dass die Werte im Mittel deutlich niedriger waren, als die gemessenen Konzentrationen aus den Überständen der kultivierten Lungenzellen (durchschnittlich etwa um mehr als den Faktor 5 geringer). Einzige Ausnahme bildete IL-10. Auch waren die interindividuellen Unterschiede zwischen den Gruppen geringer ausgeprägt, bzw. zeigten eine andere Verteilung.

4.4.1 IL-4

Bei der Auswertung der mittels IL-4 ELISA gemessenen Zytokinkonzentrationen zeigte sich wie erwartet, dass die Zellen aus den Tieren, welche mit OVA sensibilisiert und gechallenged worden waren, signifikant höhere Raten des Th2-Zytokins IL-4 produzierten als die Zellen der Kontrollgruppe, besonders nach der Restimulation mit OVA (7 ± 7 (PBS) versus 618 ± 54 pg/ml (OVA)). Die Zellen der Tiere, welche zusätzlich an Tag 0-2 mit IL-1α behandelt worden waren, zeigten in der Stimulationskontrolle höhere Werte im Vergleich zur reinen OVA-Gruppe (476 ± 68 versus 289 ± 32 pg/ml). Auffällig war, dass in den Zellüberständen der an Tag 21-23 behandelten Tiere signifikant niedrigere Konzentrationen von IL-4 im Vergleich zur OVA-Gruppe gemessen wurden, ein möglicher Hinweis auf die Abschwächung der Th2-Antwort durch IL-1α (63 ± 11 versus 208 ± 33 pg/ml (PBS-Kontrolle); 373 ± 65

versus 618 ± 54 pg/ml (OVA) und 111 ± 36 versus 289 ± 32 pg/ml in der Stimulationkontrolle).

Die Analyse der Konzentrationen an IL-4 in den Überständen der BAL ergab ähnliche Werte in den Überständen der PBS- und OVA-Gruppe. Analog zu 4.2.3.1 zeigten sich bei den Tieren der Gruppe, welche IL-1α an Tag 21-23 erhalten hatten, erniedrigte Konzentrationen von IL-4, die ermittelten Unterschiede waren allerdings nicht statistisch signifikant.

4.4.2 IL-5

Die Auswertung der IL-5-Konzentrationen aus den Zellüberständen der über 24 Stunden kultivierten Lungenzellen bestätigte in Teilen die Ergebnisse der IL-4-Messungen. Erneut zeigten die Zellen der mit OVA behandelten Tiere gegenüber der Kontrollgruppe signifikant höhere Zytokinantworten (826 ± 182 versus 3183 ± 412 pg/ml (Kontrolle); 934 ± 195 versus 5656 ± 384 pg/ml (OVA) und 1736 ± 292 versus 4856 ± 434 pg/ml (SEB)). Zwischen der reinen OVA-Gruppe und den zusätzlich mit IL-1α behandelten Tieren konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Es zeigte sich allerdings auch hier, analog zu den Effekten bei IL-4, dass die Zellen der Tiere, welche mit OVA sensibilisiert und gechallenged worden waren, eine deutliche Reaktion auf die erneute Exposition mit OVA zeigten (sichtbar an einem stärkeren Anstieg der IL-5-Zytokinproduktion), sowohl verglichen mit der Zytokinantwort nach PBS, als auch in der Stimulationskontrolle. Auffallend war die im Vergleich zu den übrigen untersuchten Zytokinen hohe Konzentration des IL-5 (z. T. um den Faktor zehn höher als die Messergebnisse für IL-4).

Auch bei Betrachtung der IL-5 Ergebnisse zeigten sich hohe Konzentrationen in den Überständen der BAL der Kontrollgruppe. Auffällig war außerdem eine Erniedrigung der Werte bei den mit IL-1α behandelten Tieren, verglichen mit OVA. Besonders ausgeprägt zeigte sich dieser Effekt in der Gruppe, welche an Tag 0, 1, 14 mit IL-1α behandelt worden war (59 ± 24 versus 303 ± 67 pg/ml, $p \leq 0{,}05$). Ansonsten war auffällig, dass die Konzentrationen z. T. um mehr als das zehnfache niedriger waren als die in den Überständen der Lungenzellen gemessenen Werte.

4.4.3 IL-10

Analog zu den Ergebnissen der IL-5 Messung verhielten sich die Verhältnisse bei Betrachtung der Daten, welche ich mittels der IL-10 ELISA aus den Überständen der kultivierten Lungenzellen generierte. Wie mittlerweile zu erwarten, waren die Mengen des von den mit OVA behandelten Zellen gebildeten Th2-Zytokins IL-10 hochsignifikant erhöht gegenüber den Messwerte aus den Überständen der unbehandelten Zellen (22 ± 5 versus 90 ± 17 pg/ml (Kontrolle), $p \leq 0{,}002$). Besonders deutlich wurde dieser Effekt, wie schon bei der Betrachtung von IL-4 und IL-5, nach Restimulation mit dem allergenen Agens (52 ± 9 versus 668 ± 73 pg/ml (OVA), $p \leq 0{,}002$). Der interindividuelle Vergleich der OVA-Gruppen zeigte niedrigere Werte der zusätzlich mit IL-1α behandelten Tiere, allerdings ohne eindeutige Tendenz.

Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Zytokinen waren die in den Überständen der BAL gemessenen IL-10 Konzentrationen etwa um den Faktor zwei höher angesiedelt, als die durch die Lungenzellen produzierten Werte. Tendenziell zeigten sich bei den Tieren der „Tag 0-2“- und „0, 1, 14“-Gruppe höhere Anteile von IL-10 als in den BAL der OVA-Tiere, außerdem waren die Werte in der Kontrollgruppe erniedrigt. Sämtliche Unterschiede erwiesen sich als nicht statistisch signifikant.

4.4.4 IL-13

Als Ergänzung zu den bereits genannten Th2-Zytokinen nahm ich abschließend IL-13 in mein Untersuchungspanel mit auf. Ähnlich wie bei IL-5 zeigten sich auch hier vergleichsweise hohe Absolutwerte in den Überständen der kultivierten Lungenzellen, wenn auch nicht ganz so hoch wie die gemessenen IL-5 Konzentrationen (etwa Faktor vier, verglichen mit IL-4). Auch hier übertrafen die Werte der OVA-Tiere die der Kontrollgruppe deutlich (131 ± 31 versus 559 ± 137 pg/ml, $p \leq 0{,}005$ (Kontrolle); 161 ± 40 versus 2143 ± 324 pg/ml (OVA) und 331 ± 70 versus 1480 ± 299 pg/ml (SEB), beide $p \leq 0{,}002$). Wie auch bei den Messungen der IL-5 und IL-10 Konzentrationen zeigte sich durch die Behandlung mit IL-1α keine signifikante Beeinflussung der IL-13-Zytokinkonzentration in den Zellüberständen.

Die gemessenen IL-13-Zytokinkonzentrationen waren in den Überständen der BAL niedriger als in den Überständen der Lungenzellkulturen. PBS und OVA behandelte Mäuse zeigten ähnliche Mengen an Zytokin, deutlich höhere Konzentrationen ließen sich in den Überständen der an Tag 21-23 zusätzlich mit IL-1α behandelten Tiere messen, wobei auch hier aufgrund der relativ hohen Standardabweichung der Mittelwerte keine Signifikanz vorlag.

4.4.5 IFN-γ

Als Marker für eine Th1-Zell vermittelte Immunantwort bestimmte ich die durch die kultivierten Lungenzellen produzierte Menge des Zytokins IFN-γ. Grundsätzlich waren mittels ELISA messbare Zytokinkonzentrationen fast ausschließlich in der Stimulationskontrolle (SEB) nachweisbar, ein Effekt, welcher sich in allen Gruppen bestätigte. Wie erwartet zeigten die Zellen der Kontrollgruppe im Gegensatz zu den vorherigen Ergebnissen eine signifikant höhere Konzentration an produziertem IFN-γ als die Zellen der OVA-Gruppen (737 ± 190 versus 204 ± 47 pg/ml, $p \leq 0{,}005$). Interessanter Weise reagierten die Zellen der zusätzlich mit IL-1α behandelten Tiere im Gegensatz zur reinen OVA-Population ähnlich stark auf die Stimulationskontrolle wie die Zellen der Kontrollgruppe (692 ± 140 pg/ml (IL-1 α Tag 0-2, $p \leq 0{,}005$), 553 ± 127 pg/ml (IL-1 α Tag 0, 1, 14, $p \leq 0{,}05$) und 830 ± 245 pg/ml (IL-1 α Tag 21-23, $p \leq 0{,}005$) versus 204 ± 47 pg/ml (OVA)). Am stärksten war dieses Phänomen bei den Zellen der Tiere nachzuweisen, welche an Tag 21-23 IL-1α intraperitoneal appliziert bekommen hatten.

Die Auswertung der IFN-γ ELISA Messungen aus den Überständen der BAL zeigte im Verhältnis sehr geringe Mengen an IFN-γ, mit einer heterogenen Verteilung zwischen den Gruppen ohne statistische Signifikanz. Die Ergebnisse der von mir durchgeführten Zytokinbestimmungen sind in Abbildung 4.5 zusammengefasst.

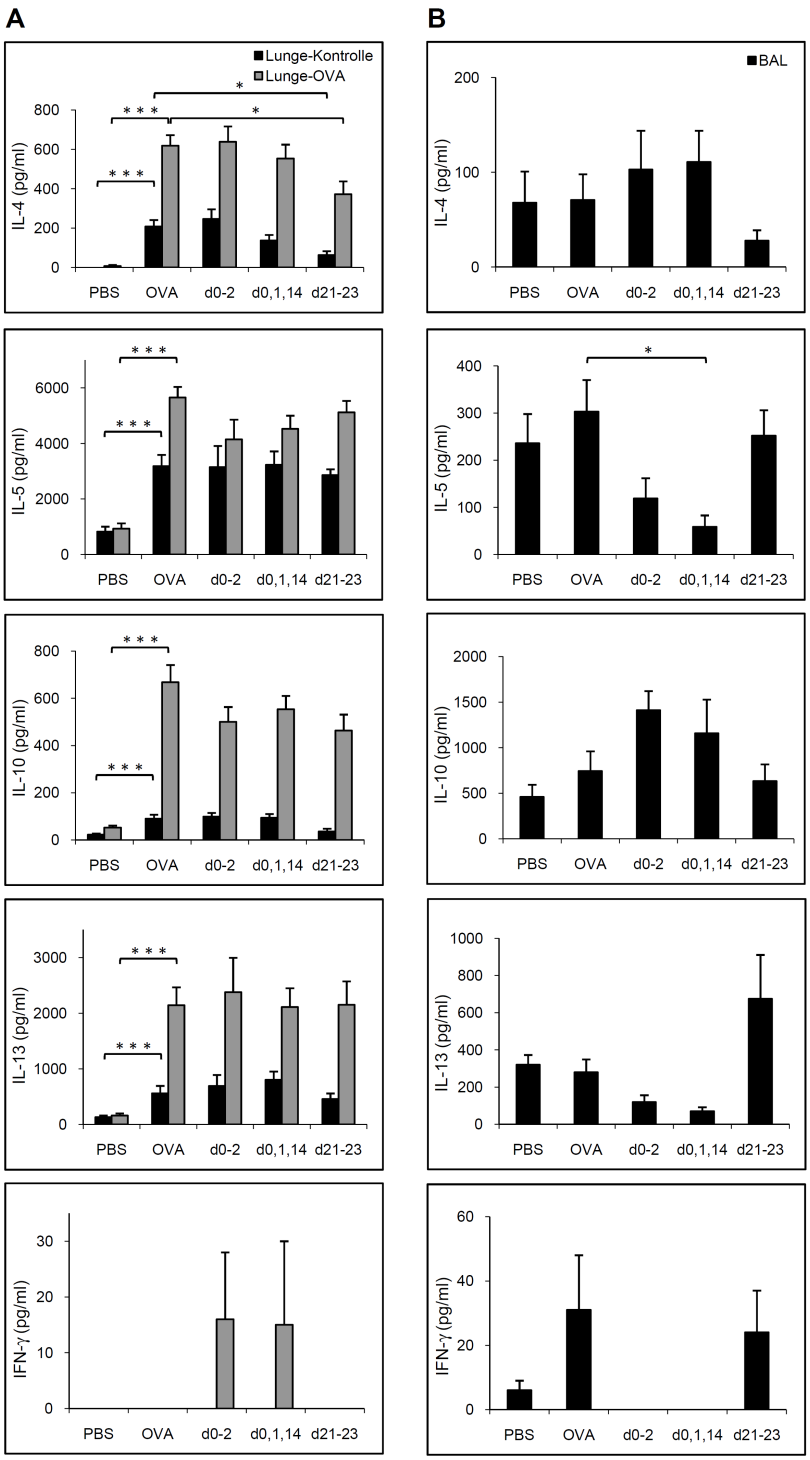

Abbildung 4.5:
Analyse der aus den Überständen der kultivierten Lungenzellen und der BAL bestimmten Zytokine. Bei jeweils 5 Mäusen wurde ein allergisches Asthma induziert und eine Behandlung mit IL-1α durchgeführt. An Tag 30 wurden aus der gesamten Lunge und aus der BAL inflammatorische Zellen isoliert. Die Lungenzellen wurden mit PBS (Kontrolle) bzw. OVA-Protein restimuliert und für 24 Stunden inkubiert, dann wurde in den Überständen die Zytokine mittels ELISA gemessen (Abb. **A**). Die aus der BAL isolierten Zellen wurden zentrifugiert und die Überständen wurden ebenfalls mittels ELISA analysiert (Abb. **B**). Dargestellt sind die Konzentrationen der jeweiligen Zytokine (Mittelwerte ± SEM; n ≥ 3; Diff. zu OVA * = p ≤ 0,05; * * = p ≤ 0,005; * * * = p ≤ 0,002). Man beachte die zum Teil unterschiedliche Skalierung der Y-Achse.

4.5 Zusammenfassende, abschließende Betrachtung der Ergebnisse

4.5.1 Ergebnisse der Cytospins und der Zellzählung

Sowohl bei Betrachtung der aus den kompletten Lungen isolierten Zellen, als auch bei der BAL konnte man feststellen, dass die Mäuse, welche mit OVA behandelt worden waren, signifikant höher mit eosinophilen Granulozyten infiltriert waren als in der Kontrollgruppe, eine Bestätigung der erfolgten Induktion des OVA-vermittelten allergischen Asthmas.

Die Applikation vom IL-1α führte in der Lunge zu einem vom Zeitpunkt der Behandlung unabhängigen Anstieg der Gesamtzahl der myeloiden, inflammatorischen Zellen. In der BAL war dieser Trend nur nach einer frühen Gabe nachweisbar. In der Lunge ließ sich nach Behandlung mit IL-1α an den Tagen 0 bis 2 eine Erhöhung der Anzahl eosinophiler Granulozyten beobachten, die späte Gabe führte zu einer Reduktion, wohingegen es in der BAL unabhängig vom Zeitpunkt der Behandlung zu einem nicht signifikanten Rückgang der Eosinophilen kam. In beiden Untersuchungsmaterialien war die Anzahl der ermittelten neutrophilen Granulozyten nach der frühen Gabe von IL-1α signifikant erhöht, in der gesamten Lunge zeigte sich diese Tendenz ebenfalls nach der späten Applikation. Unabhängig vom Zeitpunkt der Behandlung mit IL-1α enthielt das Zellisolat aus der Lunge niedrigere Anteile an Lymphozyten und erhöhte Zahlen an Monozyten/Makrophagen. In der BAL hatte IL-1α diesbezüglich keinen Einfluss (Tabelle 4.1 A)

4.5.2 Ergebnisse der Durchflusszytometrie

In der BAL zeigten sich in den Proben der gegen OVA sensibilisierten Mäuse erhöhte Werte für CCR3- und SSC^{high} positive Zellen verglichen mit der PBS-Kontrollgruppe. In der Analyse der gesamten Lunge war diese Reaktion auf die Induktion des allergischen Asthmas nur im Bezug auf CCR3 nachweisbar.

Auch hinsichtlich des Einflusses von IL-1α auf die Zusammensetzung der Zellisolate zeigte sich ein heterogenes Bild zwischen den beiden Untersuchungsmaterialien.

Die frühe und späte Gabe von IL-1α resultierte in der gesamten Lunge in einer Erhöhung des Anteiles der CD11c-positiven Zellen, ausschließlich nach der späten Applikation konnte man erniedrigte Werte für CD3, CD4 und F4/80 beobachten.
In der BAL zeigten sich einige, nicht statistisch signifikante Effekte. In den Lavages der Tiere, welche zu einem frühen Zeitpunkt mit IL-1α behandelt worden waren, konnte niedigere Werte für CD3-, CD8-, F4/80-, CCR3- und SSC^{high}-positive Zellen durchflusszytometrisch gemessen werden. Die BAL der spät behandelten Tiere enthielten tendenziell höhere Anteile an F4/80-positiven Zellen.
In beiden untersuchten Medien zeigten sich nach der Gabe von IL-1α an den Tagen 0-2, bzw 0, 1, 14 höhere Werte für NIMP-R14- und $SSCl^{ow}$-positive Zellen (Tabelle 4.1 B).

4.5.3 Ergebnisse der ELISAs

Erwartungsgemäß und unseren bisher beschriebenen Ergebnissen folgend präsentierte sich in den Untersuchungsmaterialien der gegen OVA sensibilisierten BALB/c Mäuse eine signifikant höhere Produktion von Th2-Zytokinen. Sowohl die Konzentrationen von IL-4, als auch von IL-5, IL-10 und IL-13 waren ausnahmslos höher als die in der Kontrollgruppe gemessenen Werte. IFN-γ als Surrogatparameter für Th1 zeigte sich in der reinen OVA-Gruppe im Verhältnis zu den PBS-Tieren supprimiert. Diese Effekte waren sowohl in den Lungenzellkulturen, als auch in der BAL nachweisbar.

Bezüglich des Einflusses von IL-1α auf die Sekretion von IL-4 und IL-5 zeigten beide Untersuchungsmedien ein einheitliches Bild. Die frühe Applikation von IL-1α führte zu einem Rückgang von IL-5, sowohl in den Lungenzellkulturen, als auch in den Überständen der BAL. Bei den Tieren der Gruppe, welche IL-1α zusätzlich zu OVA an den Tagen 21 bis 23 erhalten hatten, waren in beiden Medien geringere Konzentrationen an IL-4 messbar.
IL-10 dagegen präsentierte sich ausschließlich in der BAL nach einer frühen Behandlung mit IL-1α erhöht, für IL-13 zeigten sich nach der späten Applikation erhöhte Werte. Bezüglich IFN-γ konnten keine wesentlichen Effekte durch den Einsatz von IL-1α gemessen werden (siehe Tabelle 4.1 C)

A

Cytospin + Zellzahl	Lunge		BAL	
	+ IL-1α früh	+ IL-1α spät	+ IL-1α früh	+ IL-1α spät
Gesamtzellzahl	↑	↑	(↑)	-
Eosinophile	↑	↓	(↓)	(↓)
Neutrophile	↑	↑	↑	-
Lymphozyten	↓	↓	-	-
Monozyten	↑	↑	-	-

B

FACS	Lunge		BAL	
	+ IL-1α früh	+ IL-1α spät	+ IL-1α früh	+ IL-1α spät
$CD3^+$	-	↓	(↓)	-
$CD4^+$	-	↓	-	-
$CD8^+$	-	-	(↓)	-
$CD11c^+$	↑	↑	-	-
$F4/80^+$	-	↓	(↓)	(↑)
$CCR3^+$+ SSC^{high}	-	-	(↓)	-
$NIMP^+$+ SSC^{low}	↑	-	(↑)	-

C

ELISA	Lunge		BAL	
	+ IL-1α früh	+ IL-1α spät	+ IL-1α früh	+ IL-1α spät
IL-4	-	↓	-	(↓)
IL-5	(↓)	-	↓	-
IL-10	-	-	↑	-
IL-13	-	-	-	(↑)
IFN-γ	-	-	-	-

Tabelle 4.1: **Zusammenfassung der Effekte von IL-1α auf die zelluläre Zusammensetzung und die produzierten Zytokine der Zellisolate aus der kompletten Lunge und der BAL.** Dargestellt sind die Effekte, die eine frühe Behandlung der Mäuse mit IL-1α (Tag 0-2 bzw. Tag 0, 1, 14), bzw. eine späte Behandlung (Tag 21-23) im Rahmen der Induktion des OVA-vermittelten allergischen Asthmas auf die Gesamtzellzahl und die Ergebnisse der Cytospins (Abb. **A**), die Ergebnisse der Durchflusszytometrie (Abb. **B**) und die mittels ELISA gemessenen Zytokine haben (Abb. **C**). Die grünen, nach oben gerichteten Pfeile symbolisieren jeweils einen statistisch signifikanten Anstieg des dargestellten Parameters, die roten, nach unten gerichteten Pfeile stehen für einen signifikanten Abfall. Pfeile in Klammern veranschaulichen deutliche, aber nicht statistisch signifikante Effekte.

5. Diskussion

5.1 Einführung

Dass es sich bei dem allergischen Asthma bronchiale um eine Th2-vermittelte Erkrankung aus dem atopischen Formenkreis handelt, wurde bereits in zahlreichen Publikationen dargestellt [86-89]. Als Tiermodell für das allergische Asthma existiert mit der BALB/c Maus ein System, welches sich dank eines breiten Spektrums an etablierten Analyseverfahren gut überwachen lässt [100-104]. Häufig werden in Studien die invasive Messung des Atemwegswiderstandes (AHR), die histologische Aufarbeitung der Lunge und die BAL eingesetzt [188-193]. Als Surrogatparameter für Th2-Abhängigkeit dienen in den meisten Fällen der Nachweis typischer Th2-Zytokine sowie die vermehrte Präsenz von Th2-assoziierten eosinophilen Granulozyten [102]. Ein Teilaspekt dieser Dissertation beschäftigte sich mit der Frage, ob die Betrachtung und Prozessierung einer vollständigen murinen Lunge, verglichen mit einem Standardverfahren wie der Gewinnung von BAL, analoge bzw. überlegene Erkenntnisse liefert,

Die Erkenntnisse unserer Arbeitsgruppe über die immunologischen Vorgänge beim murinen allergischen Asthma resultierten bisher aus der Untersuchung einer BAL, Lungenhistologien und AHR-Messungen. Mein Ziel war es, das Spektrum an Quellen für Untersuchungsmaterial um die vollständige murine Lunge zu erweitern. Das zur Gewinnung der murinen Zellen benötigte Verfahren sollte technisch relativ einfach und mit einem vertretbaren Zeitaufwand durchzuführen sein und eine stabil hohe Ausbeute an mononukleären Zellen erbringen. In der Vergangenheit war es uns nicht gelungen, aus der BAL in ausreichendem Maße Zellen zu gewinnen, um diese kultivieren und restimulieren zu können. Daher war ein zusätzlicher Anspruch an die neue Methode, eine hohe Ausbeute an T-Zellen zu gewährleisten.

Für die Entscheidung einer Resistenz bzw. Empfindlichkeit von verschiedenen Mausstämmen gegenüber einer weiteren Th-Zell-vermittelten Modellerkrankung, der murinen kutanen Leishmaniasis, konnte eine wichtige Bedeutung von IL-1 bereits gezeigt werden [78,79]. Von Relevanz für den Einfluss durch IL-1 auf die verschiedenen Th-Zell-Subpopulationen scheint das Ausmaß der Expression des hochaffinen IL-1RI zu sein [76-78,194,195]. In der frühen

Phase einer Infektion mit *L. major* erfolgt eine Verstärkung einer effektiven (Th1) Abwehr durch IL-1α über eine Interaktion mit dem auf naiven T-Zellen hochregulierten IL-1RI. Zu einem späteren Zeitpunkt schwächt IL-1α eine suffiziente immunologische Antwort, indem es die Expansion von (inneffektiven) Th2-Zellen ebenfalls über eine Wechselwirkung über den dann auf Th2-Zellen hochexprimierten IL-1RI fördert [196,197].

Aus mehreren Studien ergeben sich deutliche Hinweise auf eine Rolle von IL-1 in der Pathophysiologie des allergischen Asthmas. So wurden bereits erhöhte IL-1β–Spiegel im Serum und in der BAL von Asthmatikern gemessen und IL-1 mittels Immunfluoreszenzfärbung in der bronchialen Submukosa nachgewiesen [198-201]. In Untersuchungen an IL-1RI-defizienten Mäusen konnte dargestellt werden, dass diese nach der Ausbildung eines OVA-induzierten allergischen Asthmas eine signifikante Reduktion der eosinophilen Granulozyten in der BAL, bzw. in der histologisch aufgearbeiteten Lunge zeigten [202]. Ebenso präsentierte dieses Knockout-Tiermodell in einem milden OVA-induzierten Asthma (ohne Alum) niedrigere Werte an OVA-spezifischen Antikörpern im Blut und der BAL [203]. Weitere Arbeiten mit IL-1α- und IL-1β-defizienten Mäusen konnten in der Vergangenheit ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der Ausbildung einer AHR und IL-1 bei dem allergischen Asthma zeigen, außerdem führte die Abwesenheit von IL-1α/β zu einer verminderten Produktion von Th2-Zytokinen durch OVA-spezifische T-Zellen [204]. Unsere Hypothese war, dass der Einsatz von IL-1α in Analogie zu den Beobachtungen bei einer Infektion mit *L. major* in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Applikation zu einer Abschwächung bzw. Verstärkung dieser epidemiologisch hochrelevanten chronischen Erkrankung führt.

5.2 Interpretation der Ergebnisse bezüglich der Zellisolation, Restimulation und dem Vergleich gesamte Lunge versus BAL

5.2.1 Gewinnung inflammatorischer Zellen aus der gesamten Lunge

Zunächst evaluierte ich verschiedene mechanische Separationsverfahren und favorisierte initial den Einsatz der Medimachine, ein System, welches sich in der Verarbeitung von Tumorgewebe in Vorbereitung auf durchflusszytometrische Untersuchungen und DNA-

Analysen bereits bewährt hat [205,206]. Des Weiteren bietet es den Vorteil, dass es sich aufgrund des automatisierten Verarbeitungsvorganges sehr gut standardisieren lässt und die Zellausbeute relativ unabhängig von der durchführenden Person ist.
In unserem Fall standen die Vorteile in keinem vertretbaren Verhältnis zum zeitlichen Aufwand: Mittels Medimachine war es nicht möglich, in ausreichendem Maße Zellen in einem überschaubaren Zeitrahmen aus der Lunge zu gewinnen. Ähnlich verhielt es sich bei der Separierung mittels Pinzette und Zellsieb. In der Zwischenauswertung zeigte sich schließlich, dass ein alleiniges mechanisches Prozessieren der murinen Lunge keine befriedigende Zellausbeute erbringen konnte.

Eine erneute Literaturrecherche ergab, dass durch einen enzymatischen Verdau des pulmonalen Bindegewebes die Zahl der gewonnen Zellen gesteigert werden kann [207-209]. Ich generierte einen Enzymkomplex aus Liberase, Penillicinase, Streptokinase und DNAse und inkubierte darin die zuvor grob zerstückelte Lunge über unterschiedlich lange Zeiträume. Es zeigte sich, dass ein Verdau über 60 Minuten die höchste Zellausbeute erbrachte. Eine längere Inkubationszeit zeigte zunehmende toxische Effekte und reduzierte die Zellzahl.

In einem weiteren Schritt kombinierte ich die enzymatische Aufspaltung über 60 Minuten mit den unterschiedlichen mechanischen Separationsverfahren. Letztlich erwies sich die Kombination aus enzymatischem Verdau, mechanischer Separation mittels Pinzette und Passieren des Lungengewebes durch ein Zellsieb hinsichtlich Ausbeute und zeitlichem Aufwand als überlegenes Verfahren (siehe Abb. 4.1)

Mehrere Arbeiten haben sich bereits mit der Isolation und Anreicherung von T-Zellen aus der BAL beschäftigt. Neben Methoden der Zentrifugation der Lavages [101] sind des Weiteren beispielsweise Möglichkeiten der Aufreinigung mittels magnetischem Labeling und einer anschließenden Positiv-Selektion beschrieben [210] oder die Trennung über einen Dichtegradienten. Häufig lassen sich diese Methoden auch auf die Isolation von T-Zellen aus Lungengeweben anwenden mit dem grundsätzlichen Vorteil, dass hier eine höhere Zellausbeute zu erwarten ist [211].

5.2.2 Unterschiede in der Restimulation mit OVA-Protein bzw. OVA-Peptid

Komplexe Antigene wie Proteine müssen durch die APC zunächst zu Peptiden prozessiert werden, bevor sie mittels MHC-II den differenzierten T-Zellen präsentiert werden können, welche dann reaktiv ihre charakteristischen Zytokine sezernieren [212-215]. Unter der Vorstellung, dass im Rahmen der mechanischen und enzymatischen Verarbeitung der Lunge das Potential der antigenpräsentierenden Zellen zur Prozessierung und Präsentation des allergenen Proteins (OVA) leidet, prüfte ich in weiteren Vorversuchen, ob die Restimulation mit OVA-Peptid zu messbar höherer Zytokinproduktion durch die kultivierten Zellen führt als die Restimulation mit OVA-Protein.

In der Literatur ist beschrieben, dass nach Sensibilisierung mit OVA-Protein etwa 50 Prozent des OVA-spezifischen IgG1 und IgE gegen das immunodominante Epitop $OVA_{323-339}$ gerichtet sind. Erfolgt im Rahmen einer Immunotherapie eine Exposition mit OVA, so resultiert dies in hohen Serumspiegeln der Th2-Zytokine IL-4 und IL-5, wohingegen eine Restimulation mit $OVA_{323-339}$ häufig eine isolierte Erhöhung von IL-5 zur Folge hat. Dies könnte ein Hinweis auf eine alleinige Erkennung des immunodominanten Epitops durch eine Subpopulation OVA-spezifischer T-Zellen sein [216]. Dementsprechend könnte man die Verwendung von OVA-Protein als physiologischer bezeichnen, da im Rahmen der Prozessierung neben $OVA_{323-339}$ noch andere Peptide entstehen. Bei gegen OVA sensibilisierten Mäusen reagierten die aus den Lymphknoten der Lunge isolierten Zellen nach Restilmulation mit $OVA_{323-339}$ mit einer etwa 30% niedrigeren Proliferation als die mit OVA-Protein restimulierten [216]. Dieser Effekt erwies sich als nicht wesentlich konzentrationsabhängig. Andere Arbeiten konnten zeigen, dass eine Sensibilisierung gegen $OVA_{323-339}$ zu einer vergleichbaren Erhöhung der AHR führt wie die klassischer Sensibilisierung mit OVA-Protein [217].

Bereits der erste Vorversuch zeigte, dass sich maximale Zytokinkonzentrationen nach der Restimulation mit OVA-Protein messen ließen, und dass die Verwendung von OVA-Peptid zu kaum höheren Zytokinantworten in Relation zur Kontrollgruppe führte. Dieser Effekt ließ sich in den weiteren Versuchen reproduzieren, so dass wir uns schlussendlich für den alleinigen Einsatz von OVA-Protein zur Restimulation entschieden.

5.2.3 Vergleich des Untersuchungsmaterials gesamte Lunge versus BAL

Die BAL ist ein etabliertes Verfahren, welches seit den frühen achtziger Jahren bei einer Vielzahl von Erkrankungen als diagnostische Methode eingesetzt wird [218]. Auch in der Grundlagenforschung wird es standardisiert eingesetzt, um mittels Analyse der enthaltenen Zellen und Zytokine neue Erkenntnisse über die Pathogenese und Pathophysiologie verschiedenster atemwegsassoziierter Erkrankungen zu gewinnen [219]. Ansätze, die BAL durch technisch einfachere Verfahren abzulösen, wie z. B. die Gewinnung von induziertem Sputum, haben sich weder in der Klinik noch in der Forschung durchsetzen können, auch weil die breite Abbildung der pathologischen Vorgänge in den Atemwegen z. T. durch alternative Methoden nicht erreicht werden kann [220].

Auch die gesamte Lunge mit ihren unterschiedlichen Kompartimenten und ihrem Gefäßsystem ist Untersuchungsobjekt mehrere Studien gewesen [221,222]. Häufiger kommt allerdings, besonders bei Untersuchungen an Patienten, die transbronchiale Biopsie oder pulmonale Probeexzisionen zum Einsatz, welche dann meistens um die Ergebnisse der BAL ergänzt werden [223-226]. Besonders Studien, welche die Wirkung von Medikamenten bzw. sonstigen wirksamen Substanzen beleuchten, bedienen sich der beschriebenen Kombination aus Biopsie und BAL [224,225], ohne allerdings die Unterschiede der jeweiligen Verfahren detailiert herauszustellen. So wird in vielen Veröffentlichungen eine grundsätzliche Korrelation beider Verfahren postuliert.

Im Detail sind allerdings einige Unterschiede beschrieben, welche auch bei der Interpretation meiner Ergebnisse zu beachten sind. So konnte in vergleichenden Untersuchungen gezeigt werden, dass sich in der BAL eher die luminalen Entzündungsvorgänge abbilden, wohingegen die Biopsie stärker die mukosale Entzündung beschreibt [226]. Der direkte Vergleich von BAL und gesamter (rechter) Lunge in einer Arbeit über die Migration von Lymphozyten zeigte deutlich höhere Anteile an PMN und Makrophagen in der BAL verglichen mit der gesamten Lunge, dafür waren in der Lunge wesentlich mehr T-, B- und NK-Zellen enthalten [222]. Interessanterweise blieb das Verhältnis von CD4 zu CD8 positiven Zellen in beiden Medien in etwa gleich. Diese Erkenntnisse werden durch Studien an Asthmapatienten, welche die Ergebnisse aus der BAL mit denen aus Biopsien verglichen haben, bestätigt. Hier zeigte

sich tendenziell ein Vorherrschen von eosinophilen Granulozyten in der BAL, wohingegen in den Biopsien neben Eosinophilen vor allem T-Lymphozyten und Mastzellen nachzuweisen waren [227,228]. Bezogen auf die klinische Aussagekraft konnte eine höhere Spezifität für die transbronchiale Biopsie gezeigt werden als für die BAL (100 versus 60%), da bei letzterer häufig eine Kontamination durch Entzündungszellen der oberen Atemwege nachgewiesen werden konnte [229].

Grundsätzlich muss man die Kompartimente Blut, Lungengewebe und Atemwege als dynamisches System begreifen. Der Weg von Lymphozyten aus dem Blut in das Lungenparenchym und über die bronchiale Mukosa in die BAL im Rahmen eines allergischen Asthmas ist in mehreren Studien mittels markierter Lymphozyten nachvollzogen worden [222,230]. Bereits innerhalb der ersten 18-24 Stunden war eine Infiltration der Lunge und auch der BAL mit Entzündungszellen nachzuweisen [222,231]. Danach kommt es aber scheinbar nicht zu einer Stabilisierung des Systems, sondern mehrere Einflüsse sorgen für eine Fluktuation der Zellzusammensetzung. So ist für T-Lymphozyten in der BAL eine erhöhte Expression von CD95L beschrieben, ein Marker, welcher im Rahmen der Apoptose eine Rolle spielt [232]. Auch eine Migration von Lymphozyten aus dem broncheoalveolären Raum in regionalen Lymphknoten konnte innerhalb der ersten 48 Stunden gezeigt werden [233], wohingegen die Zahl der eosinophilen Granulozyten und die AHR im Wesentlichen konstant bleiben.

Hier scheint auch ein entscheidender pathogenetischer Zusammenhang zu bestehen. Dass das Ausmaß des Influxes an Eosinophilen in der BAL mit der Ausprägung von AHR korreliert, ist in mehreren Arbeiten bereits gezeigt worden [234-236]. Als ursächlich ist der ebenfalls beschriebene Zusammenhang zwischen dem Gehalt an eosinophilen Granulozyten in der BAL und der Dicke der bronchialen Basalmembran zu sehen [237]. Über die daraus resultierende Einengung des Lumens der Atemwege kommt es zum klinischen Bild der AHR. Die Analyse der BAL kann demzufolge als Diagnostikum zur Bestimmung des Schweregrades eines vorliegenden Asthmas herangezogen werden [238]. Neuere Studien konzentrieren sich darüber hinaus auf die Rolle von eosinophilen Progenitorzellen im Lungengewebe als Quelle für eosinophile Granulozyten im Rahmen eines allergischen Asthmas [239]. Es wird vermutet, dass diese Zellen aus dem Knochenmark in die Brennpunkte der pulmonalen

Entzündung einwandern und dadurch trotz Gegenmaßnahmen (z. B. mittels IL-5-Antikörpern) die klinische Symptomatik aufrechterhalten.

Betrachtet man meine im Ergebnisteil dargestellten Daten, so lässt sich sowohl mittels der Gewinnung von Untersuchungsmaterial aus der BAL, als auch aus einer kompletten Lunge der Th2-Charakter des allergischen Asthmas grundsätzlich nachweisen. Unterschiede zeigen sich unter anderem im Verhältnis der in den jeweiligen Medien enthaltenen Zellen. So ließ sich in der BAL mittels Cytospin und Durchflusszytometrie beispielsweise ein deutlich höherer Anteil an eosinophilen Granulozyten nachweisen als in der gesamten Lunge, so wie es in der Literatur bereits beschrieben ist [33,228]. In der Lunge dagegen konnte ich höhere Zahlen an T-Lymphozyten, DCs und Makrophagen nachweisen, auch hier decken sich meine Ergebnisse mit den publizierten Daten [222]. Ob der Effekt der niedrigeren Zahl von T-Lymphozyten in der BAL auf apoptotische Vorgänge im broncheoalveolären Raum [232], bzw. auf die verstärkte Migration in regionale Lymphknoten zurückzuführen ist [233], kann nicht beantwortet werden, da hierzu keine Untersuchungen durchgeführt wurden.

Bei der Analyse der durch die isolierten Zellen produzierten Zytokine zeigte sich, dass sich aus der Kultur der murinen Lungenzellen höhere Konzentrationen an IL-4, IL-5 und IL-13 nachweisen lassen als in den Überständen der BAL. Dies ist aus meiner Sicht dem höheren Gehalt an Zytokin-produzierenden Antigen-spezifischen Th2-Zellen geschuldet. Einzige Ausnahme bildet IL-10, welches in der BAL in vermehrter Menge enthalten war. Hier vermute ich allerdings eine Störvariable durch bronchial lokalisierte Tregs, Makrophagen und DCs, welche ebenfalls IL-10 produzieren [240,241].

Schlussendlich ist die Auswahl des geeigneten Untersuchungsverfahrens von dem zu untersuchenden Aspekt abhängig. Möchte man eher die luminalen Entzündungsvorgänge charakterisieren, so bittet sich die BAL an, da sie die Zusammensetzung des broncheoalveolären Entzündungsinfiltrates gut abbildet und nachweislich mit der Ausprägung der AHR korreliert [234-236].
Zur Beschreibung der mukosalen Entzündung sollte man auf die Biopsie bzw. die Verwendung der gesamten Lunge zurückgreifen. Auch bietet sich dieses Verfahren für die Generierung von Zellkulturen an, da nur hier eine ausreichende Anzahl an

(antigenspezifischen T-)Lymphozyten gewonnen werden kann, um die Zellen zu kultivieren und beispielsweise zu restimulieren [222].
Um ein möglichst umfassendes Bild von den immunologischen Vorgängen zu erhalten, sollte man beide Untersuchungsmethoden kombinieren und evtl. um die AHR-Messung ergänzen, hier bedarf es allerdings einer differenzierten Betrachtung der gewonnen Ergebnisse.

5.3 Inwieweit wird die immunologische Reaktion durch den Einsatz von IL-1α beeinflusst?

5.3.1 Allgemeines

Bereits in mehreren Arbeiten wurde ein Zusammenhang zwischen dem IL-1 Genkomplex und dem Auftreten und der Regulation von Erkrankungen des atopischen Formenkreises nachgewiesen [242-246]. So wurde gezeigt, dass ein bestimmter IL-1 Haplotyp mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten einer Atopie statistisch signifikant korreliert [244]. Auch im Tiermodell konnte ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines OVA-induzierten allergischen Asthmas und dem IL-1RA-Genotyp hergestellt werden [245]. Genetische Untersuchungen an Asthmapatienten und einem Kontrollkollektiv erhärten den vermuteten funktionellen Zusammenhang zwischen IL-1 und dem allergischen Asthma [242,243,246]. Wie unter Abschnitt 5.1 bereits angedeutet, liefern einige Studien deutliche Hinweise auf eine zusätzliche Beteiligung von IL-1 im Rahmen der pathophysiologischen Vorgänge [199,247,248] und auch das unterschiedliche Ausmaß der Expression von IL-RI ist in diesem Kontext zu interpretieren. Mittels des Einsatzes neutralisierender Antikörper gegen IL-1α und IL-1β, bzw. mittels Deletion von IL-1RI konnte die klinische Ausbildung eines TDI-induzierten allergischen Asthmas in Mäusen effektiv verhindert werden [248].

Im Gegensatz zur Sensibilisierungsphase wurde der Einfluss von IL-1α während der Challenge bereits untersucht. Dabei wurde mittels einer genau zeitlich terminierten IL-1α-Expression in transgenen Mäusen einer Verstärkung der Eosinophilie und eine ausgeprägte Infiltration der Lunge mit neutrophilen Granulozyten und Makrophagen beobachtet, sowie die sekundäre Ausbildung eines Lungenemphysems beschrieben [249]. In einer anderen Arbeit wurden mittels des Einsatzes IL-1RA-exprimierender Adenoviren nach Sensibilisierung und

vor Challenge ein Rückgang der Infiltration mit Eosinophilen und Neutrophilen, eine Linderung der AHR und niedrigere IL-5-Spiegel induziert [250]. Von IL-1RA weiß man außerdem, dass er die IL-5-und IgE-vermittelten Effekte an der glatten bronchialen Muskulatur supprimieren kann [251]. An isolierten humanen und tierischen bronchialen Muskelsträngen konnte eine signifikante Verringerung der Acetylcholin-induzierten Kontraktion unter dem Einfluss von IL-1β gemessen werden.

In der Literatur gibt es auch indirekte Anzeichen für einen Zusammenhang zwischen IL-1 und einer Abschwächung der Th2-Immunreaktion. So führte eine intranasale Applikation von *Mycobacterium bovis*-Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vor der (OVA-)Challenge in einem Asthmamodell zu einer Unterdrückung von AHR und eosinophilem Influx, außerdem resultierten daraus niedrigere IL-5 Werte und erhöhte INF-γ Spiegel [252]. Aus anderen Arbeiten ist bekannt, dass eine mykobakterielle Infektion mit einer starken Freisetzung von IL-1 aus dendritischen Zellen und Makrophagen einhergeht [253], daher liegt eine Verantwortung von IL-1 für die Th2-supressiven Effekte nahe.

Wenn man sich einen weiteren Vertreter aus der IL-1 Familie näher betrachtet, IL-1β, dann fällt auf, dass für ihn gemeinsam mit TNF-α eine Induktion von CCL28 beschrieben ist. Dieses Molekül wirkt einerseits chemotaktisch auf CCR10 positive Zellen, wie z. B. T-Zellen (siehe Abschnitt 5.6.2), andererseits vermittelt es auch die zielgerichtete Migration von CCR3-positiven Zellen (eosinophilen Granulozyten) [254]. Es handelt sich also um einen direkten Effekt des Zytokins außerhalb des Th1/Th2-Paradigmas. Für IL-1β und IL-1α konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit spezifischen, gegen die beiden Zytokine gerichteten Antikörpern die Entwicklung eines Asthmas inhibieren kann [248]. Gestützt wird diese Beobachtung durch die Entdeckung, dass Mäuse, bei denen die Gene für IL-1β und IL-1α „ausgeknockt“ worden sind, ebenfalls ein im Vergleich zur Kontrolle schwächeres Asthma entwickeln, wohingegen bei IL-1RA-knockout Mäusen die Erkrankung exazerbiert [255].

Die Datenlage suggeriert, dass IL-1 bzw. IL-1α sowohl eine Rolle in der Modulation von Th1- bzw. Th2-vermittelten Erkrankungen spielt, indem es direkt auf die Balance zwischen Th1 und Th2 Einfluss nimmt. Zusätzlich sind allerdings auch weitere, Th1/Th2-unabhängige Effekte beschrieben, wie die Induktion von CCL28 (und damit auch Wechselwirkung mit

regulatorischen T-Zellen) und die verstärkte Freisetzung von IFN-γ aus NK-Zellen. Dieses gilt es bei der Interpretation meiner Ergebnisse zu berücksichtigen.

5.3.2 Effekte auf die zelluläre Zusammensetzung

5.3.2.1 Interpretation der mittels Cytospin generierten Daten

Neben den eigentlichen Effektorzellen einer Th-Zell-vermittelten Immunantwort, den T-Lymphozyten, spielen noch weitere mononukleäre Zellen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung einer effektiven Abwehrreaktion (siehe Abschnitt 1.2). Die zytomorphologische Differenzierung von beteiligten Zellen kann demnach wertvolle Hinweise auf die Ausrichtung einer immunologischen Reaktion geben und gilt als etabliertes Verfahren [256-259].

Eosinophile Granulozyten sind ein wichtiges Charakteristikum Th2-vermittelter Erkrankungen [260,261]. Ihnen kommt beispielsweise eine tragende Aufgabe bei der Th2-vermittelten Transplantatabstoßung [262,263] und ganz besonders beim allergischen Asthma bronchiale zu [264-266]. Das von Th2-Zellen produzierte IL-5 spielt eine entscheidende Rolle bei der Maturation und Proliferation von eosinophilen Granulozyten [267], welche ihrerseits ebenfalls Th2-Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, aber auch das Th1-Zytokin IFN-γ exprimieren und damit die Immunantwort modulieren können [268,269]. Im Vergleich zu der durch T-Zellen sekretierten Menge an Th2-Zytokinen spielen die Eosinophilen allerdings eine untergeordnete Rolle.

Für neutrophile Granulozyten ist bereits gezeigt worden, dass sie bei der Abwehr von Erkrankungen, welche tendenziell mit einer Th1-Immunantwort assoziiert sind, wie z. B. eine Infektion mit *Legionella pneumophila*, wichtige Funktionen haben. Ihre Präsenz ist mit erhöhten Spiegeln der Th1-Zytokine IFN-γ und IL-12 vergesellschaftet [270-272].

Makrophagen, als Vertreter der APCs, sind potentiell in der Lage, je nach immunologischer Bedrohung sowohl eine Th1- als auch eine Th2-Immunatwort mittels entsprechender Zytokinsekretion zu initiieren [273-275]. Beim allergischen Asthma wurde für Alveolarmakrophagen beschrieben, dass sie über die Beeinflussung der T-Zell-Proliferation

via NO und PEG_2 immunsupprimierend wirken [276]. Außerdem haben sie die Fähigkeit, AHR und allergische Reaktion im murinen allergischen Asthma abzuschwächen, indem sie mittels IL-12 die Th1-Antwort in der bronchialen Mukosa verstärken und dadurch die Th2-Reaktion auf das inhalierte Allergen inhibieren [277,278]

Neben der erwarteten Eosinophilie, welche sich sowohl in der gesamten Lunge als auch der BAL zeigte, konnte ich in der bei der zytomorphologischen Auswertung der gesamten Lunge eine weitere Besonderheit bezüglich der eosinophilen Granulozyten feststellen. Entgegen unserer Hypothese einer Hemmung der Th2-Immunantwort durch eine frühe Applikation vom IL-1α an den Tagen 0 bis 2 resultierte nicht eine Reduktion der Anzahl der eingewanderten Eosinophilen, sondern vielmehr war eine signifikante Steigerung zu beobachten. In der Literatur ist dieser Effekt schon früh in Zusammenhang mit der Applikation von IL-1RA und daraus resultierender Hemmung von IL-1 beschrieben [279]. In einem Tiermodell für eine chronische Lungenerkrankung fanden sich nach der Gabe von IL-1RA weniger Eosinophile, was im Umkehrschluss einen verstärkenden Effekt für IL-1 suggeriert. Auch in aktuellen Arbeiten finden sich Hinweise auf einen Einfluss von IL-1 auf eine Persistenz der AHR in einer Ozon-induzierten Atemwegreizung über die eosinophile Granulozyten bzw. deren Wirkung auf die Muskarin-Rezeptoren des Parasympathikus [280]. Eine weitere Erklärung liefern Studien, welche nach IL-1 Gabe eine Hochregulation von ICAM-1 auf bronchoepithelialen Zellen beobachten und damit die Fähigkeit zur Adhäsion und Diapedese von Eosinophilen verstärken [281].

Ebenfalls über diesen Mechanismus lässt sich der initial beobachtete verstärkte Influx von neutrophilen Granulozyten erklären. Beschrieben ist außerdem, dass eine Aktivierung von Epithelzellen durch IL-1β die Transmigration von Neutrophilen erleichtert [282]. In vitro konnte man die IL-1-induzierte transendotheliale Passage via gap junctions beobachten [283,284], dies deckt sich mit früheren Beschreibungen, wo nach Injektion von IL-1 ein lokaler Anstieg der PMN zu verzeichnen war [279]. Interessanterweise scheint es aber auch einen Einfluss auf den Phänotyp der Zellen zu geben: Die Proliferation der Neutrophilen nach IL-1 Exposition ist mit einer Hochregulation der Expression des C3b-Komplement-Rezeptors und des IL-1RII vergesellschaftet und steigert dadurch ihr Abwehrpotential [285], ein Effekt, welcher sich durch die Gabe von Steroiden wiederum beeinflussen lässt [286].

Denkbar ist auch, dass ein IL-1-abhängiges Shiften der Immunantwort von Th2 zu Th1 die PMN beeinflusst. Neutrophile zeigen unter dem Einfluss von IFN-γ eine Hochregulation bestimmter Chemokinrezeptoren (z. B. CCR1 und CCR3) und eine Steigerung der Sekretion chemotaktischer Chemokine im Sinne einer autokrinen Verstärkung [287,288].

In der gesamten Lunge konnte ich im Rahmen der zytomorphologischen Auswertung einen antiproliferativen Effekt der vorherrschenden Th2-Antwort auf Makrophagen in der reinen OVA-Gruppe beobachten, wie er in der Literatur beschrieben ist [274,289]. Durch die Gabe von IL-1α lässt sich diese Tendenz aufheben. Hierzu gibt es Daten, dass auf der einen Seite durch IL-1 direkt die Makrophagen über eine funktionelle Induktion der NOS beeinflusst werden [181,279], außerdem wird eine Hochregulation der Expression von Fc-und IFN-γ-Rezeptoren auf den Zellen beobachtet [279]. Von IFN-γ ist bekannt, dass es stimulierend auf Makrophagen wirkt, daher wäre bei einer stärkeren Betonung von Th1 durch IL-1α ebenfalls eine Proliferation der Makrophagen zu erwarten [289]. Auch hier ist von dem Vorliegen eines Mischbildes an indirekten und direkten IL-1-Effekten auszugehen.

5.3.2.2 Interpretation der Ergebnisse der Durchflusszytometrie

Der Zusammenhang zwischen der Th2-Dominanz des allergischen Asthmas und dem vermehrten Auftreten von eosinophilen Granulozyten ist als gesichert anzusehen [290,291], von daher war der erhöhte Nachweis von CCR3- und SSC^{high} positiven Zellen nach OVA-Sensibilisierung sowohl in der gesamten Lunge als auch in der BAL zu erwarten. In der BAL fiel bezüglich CCR3 die Differenz deutlicher aus. Neben den unterschiedlichen Eigenschaften der beiden untersuchten Kompartimente, auf welche ich in Abschnitt 5.8 näher eingehen werde, ist auch ein methodisch bedingter Einfluss denkbar. In anderen Arbeiten ist ein Verlust der Expression von Chemokin-Rezeptoren nach enzymatischem Verdau beschrieben [211], demnach wäre eine artifizielle Erniedrigung der CCR3-Oberflächenantigene auf den Zellen aus der gesamten Lunge auszugehen. Zu Beachten ist ebenfalls, dass CCR3 kein hochspezifischer Eosinophilen-Marker ist, sondern auch auf Neutrophilen nach Stimulation durch IFN-γ hochreguliert wird [287]. Dieser Mechanismus wäre durch ein IL-1α-vermitteltes Shifting von Th2 zu Th1 zu erklären mit einer zusätzlich daraus resultierenden indirekten Suppression der Eosinophilen durch IL-1. Allerdings spielen auch hier bereits publizierte

direkte Effekte von IL-1 auf die Persistenz und Migration von eosinophilen Granulozyten eine Rolle [280,281]. Über die gesteigerte Präsentation von Adhäsionsmolekülen auf den Endothelien wird ihnen, wie unter Abschnitt 5.4.2 ebenfalls erläutert, die Diapedese erleichtert.

In der gesamten Lunge und in etwas abgeschwächter Form auch in der BAL konnte ich nach Behandlung mit IL-1α erhöhte Werte für neutrophile Granulozyten durchflusszytometrisch nachweisen. Ähnliche Effekte hatte ich bereits bei den Auswertungen der Cytospins beobachtet. Bereits Anfang der neunziger Jahre haben mehrere Studien zeigen könne, dass Neutrophile, nachdem sie inflammatorischen Signalen ausgesetzt wurden, mehrere Zytokine aktiv synthetisieren und sekretieren, darunter IL-12 und TGF-β1 [292-294]. Von diesen beiden Zytokinen ist bekannt, dass sie die Differenzierung der Th-Immunantwort beeinflussen können. IL-12 bewirkt die präferentielle Ausbildung einer Th1-Antwort, ein Umstand, der sowohl in vitro, als auch in vivo mehrfach demonstriert wurde [295,296]. Bei TGF-β1 ist die Ausrichtung des Einflusses etwas komplexer; abhängig von der Konzentration scheint es sowohl eine Th1-, als auch eine Th2-Immunantwort verstärken zu können [297,298].
PMN gehören zu den ersten Zellen, welche in ein entzündetes Gewebe einwandern. Dass hier der genetische Hintergrund einer Spezies eine Rolle spielt, konnte ebenfalls anfang der neunziger Jahre in einer Arbeit aus Münster gezeigt werden [299]. In dem Modell der kutanen Leishmaniasis konnten bezüglich der Neutrophilen quantitative und qualitative Unterschiede zwischen empfindlichen BALB/c und resistenten C57BL/6 Mäusen gezeigt werden. In BALB/c Mäusen wurde neben anderen Zeichen einer akuten Entzündung eine fortwährende Erhöhung an PMN beobachtet, wohingegen dies bei den C57BL/6 Mäusen nicht der Fall war.
Schlussendlich gibt es viele Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen neutrophilen Granulozyten und einer Th1- und Th17-Immunantwort [137,272,300]. Wenn in unserem Modell die Applikation von IL-1α einen Shift von Th2 zu Th1 induziert, so würde sich dies mit dem beobachteten Anstieg von PMN in Deckung bringen lassen.

Nach der Gabe von IL-1α an den Tagen 21 bis 23 konnte man in der gesamten Lunge verminderte Anteile an F4/80-positiven Zellen beobachten. Von Makrophagen ist eine Th1-stimulierende Aktivität mit konsekutiver Hemmung von Th2 im allergischen Asthma bereits beschrieben worden [276]. Die Aktivierung von Th1-Zellen mittels Makrophagen wird auf deren IL-12-Sekretion zurückgeführt, ebenso verhält es sich für die Th2-Zell Inhibition

[296,301]. In vitro konnte gezeigt werden, dass Makrophagen die Menge des durch T-Zellen produzierten IL-5 beeinflussen [311]. In Zellkulturen mit Allergen-stimulierten CD4-positiven T-Zellen von asthmatischen Patienten kam es nach dem Zusatz von Alveolarmakrophagen zu einer signifikanten Steigerung der IL-5 produzierenden Zellen und der IL-5 Konzentration. Bei T-Zellen von Patienten, welche nicht an atopischem Asthma litten, konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Dass Makrophagen einen regulierenden und darüber hinaus sogar supprimierenden Einfluss auf T-Zellen haben, ist auch in vivo mehrfach beschrieben [312,313]. Strickland und Koautoren konnten in ihren Studien demonstrieren, dass die Elimination von Alveolarmakrophagen aus den Atemwegen von Ratten zu einer Wiederherstellung der Immunkompetenz pulmonaler T-Zellen führt, und sie leiteten daraus eine wichtige Rolle der Makrophagen in der Aufrechterhaltung eines immunsuppressiven Milieus im peripheren Lungengewebe ab [312]. Als Mechanismen der Modulation von T-Zellen durch Makrophagen postulieren sie eine Inhibition der Proliferation trotz einer Hochregulation der Expression des IL-2 Rezeptors und einer verstärkten Sekretion von IL-2 durch die T-Zellen [313]. Schlussendlich interpretiere ich analog der Ausführungen in Abschnitt 5.4.2 die Effekte von IL-1α bezüglich der Makrophagen ebenfalls als eine Kombination des vermuteten shiftens von Th2 zu Th1 und einer direkten Stimulation der Makrophagen durch IL-1α mit folgenden Makrophagen-assoziierten Auswirkungen auf die Immunkompetenz der Antigen-spezifischen T-Zellen.

Wie beschrieben ließen sich aus den aus der gesamten Lunge isolierten Zellen bei den IL-1α behandelten Mäusen höhere Zahlen an CD11c-positiven Zellen isolieren als aus der reinen OVA-Gruppe. Von IL-1β ist bekannt, dass es gemeinsam mit TNF-α eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Migration von DC spielt [305] und auch für IL-1α ist bereits gezeigt worden, dass eine lokale Injektion die Motilität beeinflusst [306]. Somit wäre denkbar, dass der vermehrte Nachweis dem erhöhten Aktivierungsgrad der DC Rechnung trägt. Im Respirationstrakt sind DCs scheinbar primär darauf spezialisiert, eine Th2-Immunität in den Schleimhäuten zu mobilisieren [307]. Studien an murinen Modellen des allergischen Asthmas konnten zeigen, dass DCs essentiell sind, um das inhalierte Antigen vorher aktivierten Th2-Zellen zu präsentieren und eine darauffolgende chronische allergische Atemwegsentzündung zu entwickeln [308]. Daneben ist bei DC eine Sekretion von IL-12 beschrieben [165], dessen Bedeutung für die Ausbildung einer Th1-Antwort ich bereits erläutert habe.

5.3.2 Interpretation der gemessenen Zytokinmuster

Nachdem die Mäuse dem in Abschnitt 3.1 beschriebenen Protokoll unterzogen worden waren, konnten nach OVA-Exposition in den Überständen der BAL und der kultivierten Lungenzellen ausnahmslos erhöhte Spiegel für IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 gemessen werden (siehe Abschnitt 4.4), wie es in der Literatur für Th2-vermittelte Immunreaktionen beschrieben ist [148,149,160,165,169]. Ebenso zeigte sich eine deutliche Suppression des Th1-Zytokins IFN-γ, ein weitere Hinweis für das Vorliegen einer Th1-inhibierenden Th2-Zellantwort [151,164].

Daneben ließen sich Effekte von IL-1α auf die Zytokinsekretion beobachten. Ein direkter, allerdings Th2-fördernder Effekt von IL-1α auf IL-4 ist in mehreren Arbeiten beschrieben worden [186,309]. Auch hier kam das IL-1RA-knockout Tiermodell zum Einsatz, um die stimulierenden Effekte auf die IL-4 Produktion zu zeigen. Unsere Daten zeigen allerdings niedrigere Werte bei den Tieren, welche IL-1α an den Tagen 21-23 erhalten haben, eine Tendenz, welche sich weder mit unserer Hypothese, noch mit dem zuvor beschriebenen Mechanismus erklären lässt. Eine mögliche Erklärung könnte in einer beschriebenen IL-4 unabhängigen Th2-Stimulation durch IL-1 liegen [310]. Vorstellbar wäre, dass in diesem Fall die Th2-Zellen IL-4 herunter regulieren, um einer Überstimulation vorzubeugen. Als weiterer Punkt ist andererseits der Zusammenhang zwischen der Regulation von IL-1RII und IL-4 denkbar. Hierzu haben Studien Anfang der neunziger Jahre gezeigt, dass IL-4 die Wirkung von IL-1 antagonisieren kann, indem es die Expression von IL-1RII fördert [311]. IL-1RII ist ein Rezeptor, der keine wesentlichen Signale zu vermitteln scheint und durch seine hohe Affinität für IL-1 mit IL-1RI konkurriert und dadurch die Wirkung von IL-1 abschwächt [312]. Im Umkehrschluss erscheint es denkbar, dass ein Überangebot von IL-1α über die Stimulation von IL-1RII gegenregulatorisch auf IL-4 wirken kann.
Eine weitere Verbindung zwischen den beiden Zytokinen ergibt sich aus funktioneller Sicht. Für IL-1β konnte eine Stimulation der Expression von ICAM-1 und VCAM-1 gezeigt werden, IL-4 fördert lediglich VCAM-1 (IFN-γ dagegen ICAM-1) [313]. Auch hier kann man über den Mechanismus der negativen Rückkopplung argumentieren, dass eine starke Stimulation von VCAM-1 (und ICAM-1) durch IL-1α sich hemmend auf die Sekretion von IL-4 auswirkt. Einen ähnlichen Ansatz bietet die in Studien demonstrierte Inhibition von IL-4

und IL-13 auf die iNOS [314]. Die durch Th1-Zytokine und auch IL-1β hochregulierte mRNA-Expression der iNOS wird durch IL-4 und IL-13 effektiv gehemmt.

Für IL-5 ließ sich zumindest bei Betrachtung der BAL der durch uns proklamierte Effekt durch die Applikation von IL-1α nachweisen. Dafür spricht beispielweise, dass IL-5 bezüglich der Expression von ICAM-1 und VCAM-1 keine sich mit IL-1α überschneidende Funktionen aufweist, wie es für IL-4 beschrieben ist [313]. Außerdem ist IL-5 im Gegensatz zu IL-4 nicht wesentlich an der Initialisierung einer Th2-Immunantwort beteiligt und dürfte somit keinem negativen Feedbackmechanismus unterliegen.
Wie bereits erwähnt können Makrophagen die IL-5 Sekretion von Th2-Zellen steigern [302], ein Effekt, welcher die Tendenzen unsere Hypothese noch betonen sollte und gut zu den gemessenen Werten für IL-5 passt. Auch die in Abschnitt 5.6.1 beschriebenen Zusammenhänge zwischen IL-5 und eosinophilen Granulozyten sollten in gleicher Weise eine Amplifikation der durch IL-1α erhöhten Produktion des Th2-Zytokins IL-5 erklären.

Dass IL-1α eine Förderung der Th1-Differenzierung und damit die Produktion von IFN-γ bewirkt, wurde erwähnt und ist schon mehrfach beschrieben worden [78,315]. Auch eine direkte Stimulation der IFN-γ-Produktion von T-Zellen durch IL-1β im Sinne einer synergistischen Funktion mit IL-12 ist bekannt [316] und hätte Effekte in dieser Richtung erwarten lassen. Meine Ergebnisse lassen aus meiner Sicht keine seriöse Interpretation in diese Richtung zu, da scheinbar zusätzliche Einflussfaktoren die Tendenzen überlagern. Mögliche Gründe könnten Beteiligung von IFN-γ an vielen nicht direkt IL-1α-abhängigen Vorgängen sein. So beschrieb ich bereit den Einfluss von IFN-γ auf die Expression von verschiedenen Chemokinen und Rezeptoren auf PMN [287,288]. Auch die Fähigkeit von Th1-Zellen durch IFN-γ Makrophagen zu aktivieren lässt hier eine gegenseitige Wechselwirkung erwarten [289]. Dass nebenbei noch andere Zellen eine Rolle bei der IFN-γ Produktion spielen, wie z. B. NK-Zellen, stellt eine weitere Stellgröße dar. Für NK-Zellen ist zusätzlich ebenfalls eine Stimulation durch IL-1α beschrieben [70,71].

Meine Ergebnisse zeigen, dass die aus der BAL isolierten Zellen in Relation zu den Zellen aus der gesamten Lunge höhere Mengen an IL-10 sekretieren, nachdem die Tiere in der frühen Phase der Sensibilisierung gegen OVA IL-1α bekommen hatten. Meiner Ansicht nach

steht dieser Effekt im Zusammenhang mit einer erhöhten Präsenz von regulatorischen T-Zellen (Tregs) in der bronchialen Mukosa, welche IL-10 produzieren. Eine Stimulation von Tregs durch inhalative Antigene wurde bereits beschrieben und u. a. für die Abschwächung einer allergischen Th2-Antwort verantwortlich gemacht [317,318]. Hinzu kommt eine wahrscheinlich IL-1α–abhängige Induktion der Produktion von CCL28 (auch MEC, CCK1 und SCYA28) in den Epithelien der Atemwege [254]. CCL28 wirkt u. a. chemotaktisch auf CCR10-positive Zellen, wie z. B. IL-10 produzierende Tregs [240]. Ich interpretiere diesen Beobachtungen als das Erfassen der frühen Phase einer wesentlich von Tregs getragenen Gegenregulation des Immunsystems als Antwort auf die ablaufende OVA-getriggerte allergische Reaktion, wie sie bereits in anderen Arbeiten beschrieben wurde [319-321]. Daneben gibt es zusätzlich Hinweise auf einen direkten Effekt von IL-1 auf Tregs. In vivo Untersuchungen mit IL-1β konnten einen direkten proliferativen Effekt auf Tregs nachweisen, zusätzlich steigerte sich die Zytokinproduktion der T-Zellen [241]. Dieser Mechanismus könnte die erhöhten IL-10-Konzentrationen ebenfalls erklären.
Ein letzter Ansatz besteht in der nachgewiesenen regulatorischen Wirkung von IL-10 auf eine frühe IL-12 vermittelte Th1-Immunatwort [322]. In einem Vakkzinationsversuch mit IL-12p40- und IL-10-defizienten Mäusen konnte ein inhibierender Effekt von IL-10 auf die lokalen Entzündungsvorgänge und insbesondere auf Th1-assoziierte Zytokine nachgewiesen werden. Ausgehend von unserer Hypothese, dass eine frühe Gabe von IL-1α einen Shift von einer Th2-Reaktion zu einer Th1-getragenen Immunantwort induziert, könnte man den frühen Anstieg von IL-10 erneut im Sinne einer Gegenregulation als Reaktion auf den verstärkten Th1-Charakter interpretieren.

5.3.3 Zusammenfassende Betrachtung der Effekte durch IL-1α

Gemäß unserer Hypothese sollte eine Applikation von IL-1α zu einem frühen Zeitpunkt der Sensibilisierung gegen OVA zu einer Abschwächung einer vorhandenen Th2-Reaktion durch Verstärkung von Th1 führen, eine späte Gabe hätte dagegen eine nochmalige Verstärkung der Th2-Immunantwort zur Folge.

Mittels der im Rahmen meiner Arbeit eingesetzten Untersuchungsverfahren fand ich deutliche Hinweise, die unsere Hypothese stützen und sich im Einklang mit den bisherigen

Erkenntnissen zur Th1-Verstärkung mittels IL-1α befanden [78,315]. Der Einsatz von IL-1α an den Tagen 0 bis 2 resultierte in erniedrigten Werten für eosinophile Granulozyten in der BAL und spricht für eine hemmende Wirkung der IL-1α-vermittelten Th1-Immunantwort auf Th2 [22]. Des Weiteren war ein signifikanter Anstieg der Zellzahl der neutrophilen Granulozyten sowohl in der gesamten Lunge, als auch in der BAL mittels Cytospins und FACS zu messen, auch dies lässt sich mit den publizierten und bereits beschriebenen Studien in Deckung bringen [287,288]. Die Werte der von mir untersuchten Zytokine bestätigten in Teilen ebenfalls den postulierten Th1-stimulierenden/Th2-inhibierenden Effekt durch die frühe Gabe von IL-1α während der Sensibilisierungsphase. In beiden Untersuchungsmaterialien zeigten sich erniedrigte Spiegel für IL-5, in der BAL zusätzlich ebenfalls supprimierte IL-13-Werte. Die in der Literatur beschriebene Aktivierung von Makrophagen durch Th1-Zellen mittels IFN-γ konnte ich in dieser Form nicht nachweisen [298].

Das IL-1α auch einen Th2-fördernden Wirkung hat, hatte ich bereits erläutert [203,204]. Wir vermuteten, dass eine späte Applikation von IL-1α diesen Effekt hervorrufen sollte. Der niedrigere Anteil an PMN in der gesamten Lunge und in der BAL nach Injektion an den Tagen 21 bis 23 werte ich als Hinweis für eine Th1-Hemmung durch Th2-Zellen (Nachweis mittels Cytospin und FACS). Ebenso kann man den durchflusszytometrisch geringeren Anteil an Makrophagen in der gesamten Lunge als Th2-vermittelten proliferationshemmenden Effekt interpretieren. Im selben Kontext ist die stark stimulierte IL-5- und IL-13-Produktion, vor allem in der BAL, als IL-1α-induziert zu deuten.

Daneben zeigt die Betrachtung meiner Ergebnisse Tendenzen, welche sich nicht mittels des Zusammenhanges von IL-1α und dessen Auswirkung auf die Ausrichtung der Th-Immunantwort im Sinne des Th1/Th2-Paradigmas erklären lassen. Wahrscheinlich liegen hier unabhängige direkte IL-1α-Wirkungen auf unterschiedliche Zielzellen zugrunde.

Der durchflusszytometrisch und zytomorphologisch belegte Anstieg der eosinophilen Granulozyten in der gesamten Lunge im Zuge der frühzeitigen Behandlung mit IL-1α ist am ehesten auf eine IL-1α-assoziierte Induktion von CCL28 zu sehen, welches chemotaktisch auf CCR3-positive Eosinophile und CCR10-positive T-Lymphozyten wirkt, was wiederum eine

Erklärung für die erhöhte Zahl für T-Zellen ist [254]. Die direkte positive Wirkung von IL-1α auf die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 [281,313] ist eine weitere probate Erklärung für den dadurch erleichterten Influx an eosinophilen Granulozyten und die dadurch höheren Zellzahlen. Die initial gemessenen höheren Werte an PMN in der gesamten Lunge hängen höchstwahrscheinlich auch mit den bereits ausgeführten direkten IL-1α-Effekten auf neutrophile Granulozyten zusammen [282-284]. Die proliferationsfördernde Wirkung von IL-1α auf CD11c-positive DCs in der gesamten Lunge sehe ich ebenfalls weniger im Zusammenhang mit Th1/Th2, sondern als direkte stimulierende Wirkung von IL-1α auf DCs, wie es für deren Migrationsverhalten bereits nachgewiesen wurde [276]. Auswirkungen auf Makrophagen, wie sie nach den bereits veröffentlichten Studien zu erwarten gewesen wären [181,279], konnte ich mittels der von mir verwendeten Methoden nicht nachweisen.

Der relativ hohe Anteil an IL-10 bei den Tieren der frühen Behandlungsphase ist als IL-1-induzierten CCL28-vermittelter Influx von IL-10 produzierenden regulatorischen T-Zellen zu interpretieren [240,241]. Als weiteren Rückschluss aus meinen Daten werte ich die erhöhte IFN-γ-Antworten auf die IL-1α-Injektionen als direkte Stimulation auf die IFN-γ-Sekretion von NK-Zellen [70].

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass durch die Therapie mit IL-1α eine Modulation der ablaufenden immunologischen Reaktion im allergischen Asthma möglich ist. Es kommt in Teilbereichen zu einem Shifting in Richtung Th1, eine Verstärkung der reinen OVA-induzierten Th2-Charakteristik ist scheinbar nicht wesentlich möglich, da bereits eine offenbar annähernd maximale Ausprägung erreicht ist. Daneben bewirkt IL-1α über weitere, direkte Mechanismen ebenso Veränderungen in der Zusammensetzung der beteiligten Zellen und Zytokine, so dass man in letzter Konsequenz von einem Mischbild der zu beobachtenden Effekte sprechen muss. Die Tatsache, dass die „zusätzlichen“ Wirkungen teilweise einen den Th1/Th2-Einflüssen gegenläufigen Charakter haben, erschwert eine präzise Diskrimination und eindeutige Bewertung der durch mich erhobenen Daten

5.4 Vergleich mit ähnlichen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe

Die Ergebnisse meiner Dissertation reihen sich nahtlos in die bisherigen Erkenntnisse unserer Arbeitsgruppe bezüglich der Rolle von IL-1α im Kontext des Th1/Th2-Paradigmas ein. Für das tendenziell eher Th1-lastige Modell der Infektion mit *L. major* konnten wir bereits eine stark vom Zeitpunkt der Applikation abhängige Modulation der Immunantwort durch IL-1α zeigen [78]. Als wichtige Funktionsträger in diesem Zusammenspiel wurden DC identifiziert, welche ebenfalls im Fokus unserer Forschungen stehen [53]. Meine Hypothese bezüglich der Wirkung von IL-1α beruht wesentlich auf den Erkenntnissen unserer bisherigen Bemühungen und postuliert eine Übertragbarkeit der bisherigen Ergebnisse aus einer Th1-Modellerkrankung in das System des Th2-vermittelten murinen allergischen Asthmas.

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen legen ähnliche Zusammenhänge und Wechselwirkungen für IL-1α und die Immunologie des Asthmas nahe, wie wir sie bereits für die Leishmaniasis zeigen konnten. Allerdings bildet sich beispielsweise das Th1-Shifting nicht mit der in den Vorarbeiten gesehenen Konsequenz in den Daten ab. Zusätzlich kommen durch den Einsatz von IL-1α noch weitere Th1/Th2-unabhängige Einflüsse zum Tragen, welche teilweise den Th1/Th2-Effekten entgegenwirken und dadurch die Aussagekraft meiner Daten bezüglich Th1/Th2 etwas schmälern.

Parallel zu meiner Dissertation widmete sich ein Teil unserer Gruppe ebenfalls der Untersuchung des murinen allergischen Asthmas unter Verwendung von „klassischen“ Untersuchungsmethoden, wie der AHR-Messung, der BAL und Lungenhistologie. Die Erkenntnisse aus diesen Versuchen lassen sich gut mit den Ergebnissen meiner Arbeit in Deckung bringen und werden in Kürze publiziert [323].

5.5 Ausblick

Sicherlich ist es aus immunologischer und aus medizinischer Sicht lohnenswert, den möglichen therapeutischen Nutzen von IL-1α in Th2-vermittelten Erkrankungen, speziell im allergischen Asthma mit seiner hohen Prävalenz, weiter mit Hochdruck zu beforschen. Die bisherigen Erkenntnisse suggerieren eine mögliche klinische Relevanz für die Behandlung erkrankter Menschen mit diesem Zytokin, vor einer Evaluation am Menschen sind sicherlich noch weitere Daten aus der Grundlagenforschung notwendig.

Als zusätzliches Instrument bietet sich mit der Methode der Prozessierung der gesamten murinen Lunge eine viel versprechende Alternative zu etablierten Verfahren in der Asthmaforschung an, welche unbedingt weiter verfolgt und verfeinert werden sollte.
Neben dem Fokus auf der Beeinflussung der Th1/Th2-Balance drängen noch weitere interessante Schauplätze der beim allergischen Asthma ablaufenden Abwehrreaktion in das Rampenlicht. So ist eine tiefer gehende Betrachtung der Rolle von CCL28 sicherlich ein Thema von großem Interesse. Aber auch der Gewinn von weiterem Wissen über die Funktion von regulatorischen T-Zellen oder eosinophilen Progenitorzellen im Zusammenspiel der immunologischen Kräfte ist ein spannendes und weites Forschungsfeld, welches zukünftig sicherlich an Bedeutung gewinnen wird.

6. Zusammenfassung

Dass durch die zusätzliche Gabe von IL-1α die Th1-vermittelte Immunreaktion der kutanen Leishmaniasis wesentlich beeinflusst werden kann, konnte unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen [78]. Als ein wichtiger Faktor erwies sich der Zeitpunkt der Applikation. Meine Arbeit sollte überprüfen, ob sich diese Erkenntnisse im Modell des murinen allergischen Asthmas reproduzieren lassen, auch im Sinne eines zukünftigen therapeutischen Nutzens für die Behandlung dieser epidemiologisch hochrelevanten Erkrankung. Daneben sollte ein neues Verfahren zur Erforschung dieser Effekte entwickelt und etabliert werden, nämlich die Verwendung der gesamten murinen Lunge als Quelle für Untersuchungsmaterial.

Für die Gewinnung von inflammatorischen Zellen aus der kompletten Lunge und deren weitere Untersuchung konnte ich eine Methode entwickeln und standardisieren, welche relativ einfach in der Durchführung ist und zuverlässig eine im Verhältnis zur BAL hohe Zellzahl liefert, was wiederum ein breites Spektrum an weiteren Untersuchungen erlaubt. Durch den Vorgang der mechanischen und enzymatischen Prozessierung scheinen die funktionellen Eigenschaften der Zellen nicht wesentlich beeinträchtigt zu sein, da sie sich gut kultivieren und mit Antigen restimulieren lassen und in signifikantem Maße antigenspezifische Zytokine produzieren.

Der Einfluss von IL-1α auf den Phänotyp der Th2-vermittelten Immunantwort ließ sich ebenfalls auf mehreren Ebenen nachweisen. So zeigt ein Teil meiner Ergebnisse, dass nach der frühen Gabe eine Tendenz zur Verlagerung des Gewichtes der Abwehrreaktion von Th2 in Richtung Th1 besteht. Ebenso finden sich Hinweise für eine relative Augmentation der Th2-Antwort durch den Einsatz von IL-1α zu einem späteren Zeitpunkt. Eine absolute Verstärkung der Th2-Reaktion auf OVA durch IL-1α konnte ich nicht messen. Hier scheint mit OVA allein schon eine maximale Ausprägung erreicht zu sein. Neben den Th1/Th2-Effekten wurden auch einige gegenläufige Beobachtungen gemacht, welche nicht a priori durch das Th1/Th2-Paradigma zu erklären sind, sondern die Rolle von IL-1α auf andere Systeme belegen, wie z. B. die Wirkung auf CCL28 und regulatorische T-Zellen. Es resultiert ein Mischbild der durch IL-1α hervorgerufenen Veränderungen und es bedarf noch weiterer Studien, um die unterschiedlichen induzierten Mechanismen sauber voneinander zu trennen.

Unabhängig davon scheint IL-1α ein viel versprechender Kandidat für einen Ansatzpunkt bei der therapeutischen Modulation der Immunologie des allergischen Asthmas zu sein.

1. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., Innate immunity: impact on the adaptive immune response. Curr Opin Immunol, 1997. 9(1): p. 4-9.

2. Carroll, M.C. and C.A. Janeway, Innate immunity. Curr Opin Immunol, 1999.11(1): p.11-2.

3. Aderem, A. and R.J. Ulevitch, Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. Nature, 2000. 406(6797): p. 782-7.

4. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., Innate immune recognition: mechanisms and pathways. Immunol Rev, 2000. 173: p. 89-97.

5. Aderem, A. and D.M. Underhill, Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annu Rev Immunol, 1999. 17: p. 593-623.

6. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., Innate immune induction of the adaptive immune response. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1999. 64: p. 429-35.

7. Janeway, C.A., Jr., The discovery of T cell help for B cell antibody formation: a perspective from the 30th anniversary of this discovery. Immunol Cell Biol, 1999. 77(2): p. 177-9.

8. Kaufmann, S.H., CD8+ T lymphocytes in intracellular microbial infections. Immunol Today, 1988. 9(6): p. 168-74.

9. Harty, J.T., A.R. Tvinnereim, and D.W. White, CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. Annu Rev Immunol, 2000. 18: p. 275-308.

10. Carter, L.L. and R.W. Dutton, Relative perforin- and Fas-mediated lysis in T1 and T2 CD8 effector populations. J Immunol, 1995. 155(3): p. 1028-31.

11. Hong, S.C., et al., The orientation of a T cell receptor to its MHC class II:peptide ligands. J Immunol, 1997. 159(9): p. 4395-402.

12. Viret, C. and C.A. Janeway, Jr., MHC and T cell development. Rev Immunogenet, 1999. 1(1): p. 91-104.

13. Lenschow, D.J., T.L. Walunas, and J.A. Bluestone, CD28/B7 system of T cell costimulation. Annu Rev Immunol, 1996. 14: p. 233-58.

14. Edmead, C.E., J.R. Lamb, and G.F. Hoyne, The T cell surface protein, CD28. Int J Biochem Cell Biol, 1997. 29(8-9): p. 1053-7.

15. Sharpe, A.H. and G.J. Freeman, The B7-CD28 superfamily. Nat Rev Immunol, 2002. 2(2): p. 116-26.

16. Stanciu, L.A. and R. Djukanovic, The role of ICAM-1 on T-cells in the pathogenesis of asthma. Eur Respir J, 1998. 11(4): p. 949-57.

17. Miceli, M.C. and J.R. Parnes, The roles of CD4 and CD8 in T cell activation. Semin Immunol, 1991. 3(3): p. 133-41.

18. Fleury, S.G., G. Croteau, and R.P. Sekaly, CD4 and CD8 recognition of class II and class I molecules of the major histocompatibility complex. Semin Immunol, 1991. 3(3): p. 177-85.

19. McNamara, M., C.Y. Kang, and H. Kohler, Analysis of a TH1----TH2 helper cell circuit. J Immunol, 1985. 135(3): p. 1603-9.

20. Reiner, S.L. and R.M. Locksley, Cytokines in the differentiation of Th1/Th2 CD4+ subsets in leishmaniasis. J Cell Biochem, 1993. 53(4): p. 323-8.

21. Romagnani, S., et al., An update on human Th1 and Th2 cells. Int Arch Allergy Immunol, 1997. 113(1-3): p. 153-6.

22. Kidd, P., Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. Altern Med Rev, 2003. 8(3): p. 223-46.

23. Neurath, M.F., S. Finotto, and L.H. Glimcher, The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. Nat Med, 2002. 8(6): p. 567-73.

24. van Oosterhout, A.J. and A.C. Motta, Th1/Th2 paradigm: not seeing the forest for the trees? Eur Respir J, 2005. 25(4): p. 591-3.

25. O'Byrne, P.M., M.D. Inman, and K. Parameswaran, The trials and tribulations of IL-5, eosinophils, and allergic asthma. J Allergy Clin Immunol, 2001. 108(4): p. 503-8.

26. Fiorentino, D.F., et al., IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. J Immunol, 1991. 146(10): p. 3444-51.

27. Mosmann, T.R. and K.W. Moore, The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. Immunol Today, 1991. 12(3): p. A49-53.

28. Bellinghausen, I., et al., Inhibition of human allergic T-cell responses by IL-10-treated dendritic cells: differences from hydrocortisone-treated dendritic cells. J Allergy Clin Immunol,
2001. 108(2): p. 242-9.

29. de Waal Malefyt, R., et al., Differential regulation of IL-13 and IL-4 production by human CD8+ and CD4+ Th0, Th1 and Th2 T cell clones and EBV-transformed B cells. Int Immunol,
1995. 7(9): p. 1405-16.

30. Herrick, C.A., et al., IL-13 is necessary, not simply sufficient, for epicutaneously induced Th2 responses to soluble protein antigen. J Immunol, 2003. 170(5): p. 2488-95.

31. Mattes, J., et al., IL-13 induces airways hyperreactivity independently of the IL-4R alpha chain in the allergic lung. J Immunol, 2001. 167(3): p. 1683-92.

32. Webb, D.C., et al., Integrated signals between IL-13, IL-4, and IL-5 regulate airways hyperreactivity. J Immunol, 2000. 165(1): p. 108-13.

33. Cottrez, F. and H. Groux, Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells. Transplantation, 2004. 77(1 Suppl): p. S12-5.

34. Sutton, C.E., et al., Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. Immunity, 2009. 31(2): p. 331-41.

35. Guo, L., et al., IL-1 family members and STAT activators induce cytokine production by Th2, Th17, and Th1 cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(32): p. 13463-8.

36. Annunziato, F., et al., The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. Int Immunol,
2008. 20(11): p. 1361-8.

37. Romagnani, S., Human Th17 cells. Arthritis Res Ther, 2008. 10(2): p. 206.

38. Weigmann, B. and M.F. Neurath, T-bet and mucosal Th1 responses in the gastrointestinal tract. Gut, 2002. 51(3): p. 301-3.

39. Neurath, M.F., et al., The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. J Exp Med, 2002. 195(9): p. 1129-43.

40. Cottone, M., F. Mocciaro, and I. Modesto, Infliximab and ulcerative colitis. Expert Opin Biol Ther, 2006. 6(4): p. 401-8.

41. Brand, S., Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. Gut, 2009. 58(8): p. 1152-67.

42. Grewe, M., et al., A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. Immunol Today, 1998. 19(8): p. 359-61.

43. Zheng, T. and Z. Zhu, Lessons from murine models of atopic dermatitis. Curr Allergy Asthma Rep, 2005. 5(4): p. 291-7.

44. Breuer, K., T. Werfel, and A. Kapp, Allergic manifestations of skin diseases--atopic dermatitis. Chem Immunol Allergy, 2006. 91: p. 76-86.

45. Ong, P.Y. and D.Y. Leung, Immune dysregulation in atopic dermatitis. Curr Allergy Asthma Rep, 2006. 6(5): p. 384-9.

46. Mok, C.C. and C.S. Lau, Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. J Clin Pathol, 2003. 56(7): p. 481-90.

47. Theofilopoulos, A.N. and B.R. Lawson, Tumour necrosis factor and other cytokines in murine lupus. Ann Rheum Dis, 1999. 58 Suppl 1: p. I49-55.

48. Nakashima, H., M. Akahoshi, and K. Masutani, Th1/Th2 balance of SLE patients with lupus nephritis. Rinsho Byori, 2006. 54(7): p. 706-13.

49. Zhang, M., et al., T-cell cytokine responses in human infection with Mycobacterium tuberculosis. Infect Immun, 1995. 63(8): p. 3231-4.

50. Talreja, J., et al., Influence of Mycobacterium tuberculosis on differential activation of helper T-cells. Clin Exp Immunol, 2003. 131(2): p. 292-8.

51. Nabors, G.S., et al., The influence of the site of parasite inoculation on the development of Th1 and Th2 type immune responses in (BALB/c x C57BL/6) F1 mice infected with Leishmania major. Parasite Immunol, 1995. 17(11): p. 569-79.

52. Sacks, D. and N. Noben-Trauth, The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. Nat Rev Immunol, 2002. 2(11): p. 845-58.

53. Nigg, A.P., et al., Dendritic cell-derived IL-12p40 homodimer contributes to susceptibility in cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. J Immunol, 2007. 178(11): p. 7251-8.

54. Duncan, D.D. and S.L. Swain, Role of antigen-presenting cells in the polarized development of helper T cell subsets: evidence for differential cytokine production by Th0 cells in response to antigen presentation by B cells and macrophages. Eur J Immunol, 1994. 24(10): p. 2506-14.

55. Williams, M.E., et al., Activation of functionally distinct subsets of CD4+ T lymphocytes. Res Immunol, 1991. 142(1): p. 23-8.

56. Stevenson, F.T., et al., Interleukin 1: the patterns of translation and intracellular distribution support alternative secretory mechanisms. J Cell Physiol, 1992. 152(2): p. 223-31.

57. Andersson, J., et al., Lipopolysaccharide induces human interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 production in the same cell. Eur J Immunol, 1992. 22(10): p. 2617-23.

58. Lonnemann, G., et al., Differences in the synthesis and kinetics of release of interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta and tumor necrosis factor from human mononuclear cells. Eur J Immunol, 1989. 19(9): p. 1531-6.

59. Kobayashi, Y., J.J. Oppenheim, and K. Matsushima, Human pre-interleukin 1 alpha and beta: structural features revealed by limited proteolysis. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1991. 39(6): p. 1513-7.

60. Kurt-Jones, E.A., et al., Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. 82(4): p. 1204-8.

61. Brody, D.T. and S.K. Durum, Membrane IL-1: IL-1 alpha precursor binds to the plasma membrane via a lectin-like interaction. J Immunol, 1989. 143(4): p. 1183-7.

62. Kaplanski, G., et al., Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism. Blood, 1994. 84(12): p. 4242-8.

63. Loppnow, H. and P. Libby, Functional significance of human vascular smooth muscle cell-derived interleukin 1 in paracrine and autocrine regulation pathways. Exp Cell Res, 1992. 198(2): p. 283-90.

64. Weitzmann, M.N. and N. Savage, Nuclear internalisation and DNA binding activities of interleukin-1, interleukin-1 receptor and interleukin-1/receptor complexes. Biochem Biophys Res Commun, 1992. 187(2): p. 1166-71.

65. Wessendorf, J.H., et al., Identification of a nuclear localization sequence within the structure of the human interleukin-1 alpha precursor. J Biol Chem, 1993. 268(29): p. 22100-4.

66. Mizel, S.B., et al., The interleukin 1 receptor. Dynamics of interleukin 1 binding and internalization in T cells and fibroblasts. J Immunol, 1987. 138(9): p. 2906-12.

67. Curtis, B.M., et al., IL-1 and its receptor are translocated to the nucleus. J Immunol, 1990. 144(4): p. 1295-303.

68. Dinarello, C.A., The interleukin-1 family: 10 years of discovery. Faseb J, 1994. 8(15): p. 1314-25.

69. Bowie, A. and L.A. O'Neill, The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. J Leukoc Biol, 2000. 67(4): p. 508-14.

70. Barksby, H.E., et al., The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. Clin Exp Immunol, 2007. 149(2): p. 217-25.

71. Lin, K.W., et al., The roles of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist in antigen-specific immune responses. J Biomed Sci, 2002. 9(1): p. 26-33.

72. Mizel, S.B., et al., Stimulation of rheumatoid synovial cell collagenase and prostaglandin production by partially purified lymphocyte-activating factor (interleukin 1). Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. 78(4): p. 2474-7.

73. Rooney, M., J.A. Symons, and G.W. Duff, Interleukin 1 beta in synovial fluid is related to local disease activity in rheumatoid arthritis. Rheumatol Int, 1990. 10(5): p. 217-9.

74. Eastgate, J.A., et al., Correlation of plasma interleukin 1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis. Lancet, 1988. 2(8613): p. 706-9.

75. Cooper, K.D., et al., Interleukin-1 in human skin: dysregulation in psoriasis. J Invest Dermatol, 1990. 95(5): p. 24S-26S.

76. Filippi, C., et al., CD4+ T cell polarization in mice is modulated by strain-specific major histocompatibility complex-independent differences within dendritic cells. J Exp Med, 2003. 198(2): p. 201-9.

77. Shibuya, K., et al., IL-1 alpha and TNF-alpha are required for IL-12-induced development of Th1 cells producing high levels of IFN-gamma in BALB/c but not C57BL/6 mice. J Immunol, 1998. 160(4): p. 1708-16.

78. Von Stebut, E., et al., Interleukin 1alpha promotes Th1 differentiation and inhibits disease progression in Leishmania major-susceptible BALB/c mice. J Exp Med, 2003. 198(2): p. 191-9.

79. Kostka, S.L., et al., Distinct roles for IL-1 receptor type I signaling in early versus established Leishmania major infections. J Invest Dermatol, 2006. 126(7): p. 1582-9.

80. Greenbaum, L.A., et al., Autocrine growth of CD4+ T cells. Differential effects of IL-1 on helper and inflammatory T cells. J Immunol, 1988. 140(5): p. 1555-60.

81. Huber, M., et al., Costimulation via TCR and IL-1 receptor reveals a novel IL-1alpha-mediated autocrine pathway of Th2 cell proliferation. J Immunol, 1998. 160(9): p. 4242-7.

82. Lichtman, A.H., et al., Role of interleukin 1 in the activation of T lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. 85(24): p. 9699-703.

83. al-Ramadi, B.K., et al., The Src-protein tyrosine kinase Lck is required for IL-1-mediated costimulatory signaling in Th2 cells. J Immunol, 2001. 167(12): p. 6827-33.

84. Nakae, S., et al., IL-1 alpha, but not IL-1 beta, is required for contact-allergen-specific T cell activation during the sensitization phase in contact hypersensitivity. Int Immunol, 2001. 13(12): p. 1471-8.

85. Beasley, R., et al., Prevalence and etiology of asthma. J Allergy Clin Immunol, 2000. 105(2 Pt 2): p. S466-72.

86. Meiler, F., et al., T-cell subsets in the pathogenesis of human asthma. Curr Allergy Asthma Rep, 2006. 6(2): p. 91-6.

87. Mazzarella, G., et al., Th1/Th2 lymphocyte polarization in asthma. Allergy, 2000. 55 Suppl 61: p. 6-9.

88. Hausding, M., et al., Lung CD11c+ cells from mice deficient in Epstein-Barr virus-induced gene 3 (EBI-3) prevent airway hyper-responsiveness in experimental asthma. Eur J Immunol, 2007. 37(6): p. 1663-77.

89. Lambrecht, B.N., et al., Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice. J Immunol, 1998. 160(8): p. 4090-7.

90. Kumagai, N., et al., Synergistic effect of TNF-alpha and either IL-4 or IL-13 on VCAM-1 expression by cultured human corneal fibroblasts. Cornea, 2003. 22(6): p. 557-61.

91. Yoshifuku, K., et al., IL-4 and TNF-alpha increased the secretion of eotaxin from cultured fibroblasts of nasal polyps with eosinophil infiltration. Rhinology, 2007. 45(3): p. 235-41.

92. Maddox, L. and D.A. Schwartz, The pathophysiology of asthma. Annu Rev Med, 2002. 53: p. 477-98.

93. Wills-Karp, M., Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. Annu Rev Immunol, 1999. 17: p. 255-81.

94. Tellez Gil, L., et al., Modulation of soluble phases of endothelial/leukocyte adhesion molecule 1, intercellular adhesion molecule 1, and vascular cell adhesion molecule 1 with interleukin-1beta after experimental endotoxic challenge. Crit Care Med, 2001. 29(4): p. 776-81.

95. Kumar, R.K., C. Herbert, and P.S. Foster, The "classical" ovalbumin challenge model of asthma in mice. Curr Drug Targets, 2008. 9(6): p. 485-94.

96. Abraham, W.M., et al., Blockade of late-phase airway responses and airway hyperresponsiveness in allergic sheep with a small-molecule peptide inhibitor of VLA-4. Am J Respir Crit Care Med, 1997. 156(3 Pt 1): p. 696-703.

97. Cockcroft, D.W., Airway responses to inhaled allergens. Can Respir J, 1998. 5 Suppl A: p. 14A-7A.

98. Heusser, C.H., et al., Demonstration of the therapeutic potential of non-anaphylactogenic anti-IgE antibodies in murine models of skin reaction, lung function and inflammation. Int Arch Allergy Immunol, 1997. 113(1-3): p. 231-5.

99. van Oosterhout, A.J., et al., Antibody to interleukin-5 inhibits virus-induced airway hyperresponsiveness to histamine in guinea pigs. Am J Respir Crit Care Med, 1995. 151(1): p. 177-83.

100. Finotto, S., et al., Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. Science, 2002. 295(5553): p. 336-8.

101. Maxeiner, J.H., et al., A method to enable the investigation of murine bronchial immune cells, their cytokines and mediators. Nat Protoc, 2007. 2(1): p. 105-12.

102. Taube, C., A. Dakhama, and E.W. Gelfand, Insights into the pathogenesis of asthma utilizing murine models. Int Arch Allergy Immunol, 2004. 135(2): p. 173-86.

103. Schroder, N.W. and M. Maurer, The role of innate immunity in asthma: leads and lessons from mouse models. Allergy, 2007. 62(6): p. 579-90.

104. Bice, D.E., J. Seagrave, and F.H. Green, Animal models of asthma: potential usefulness for studying health effects of inhaled particles. Inhal Toxicol, 2000. 12(9): p. 829-62.

105. Zosky, G.R. and P.D. Sly, Animal models of asthma. Clin Exp Allergy, 2007. 37(7): p. 973-88.

106. Kung, T.T., et al., Characterization of a murine model of allergic pulmonary inflammation. Int Arch Allergy Immunol, 1994. 105(1): p. 83-90.

107. Bochner, B.S. and Q. Hamid, Advances in mechanisms of allergy. J Allergy Clin Immunol, 2003. 111(3 Suppl): p. S819-23.

108. Fujimaki, H., et al., Induction of IgE antibody production to aerosolized ovalbumin in mice treated intratracheally with aluminum silicate. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1986. 79(2): p. 206-10.

109. Steerenberg, P.A., et al., Optimization of route of administration for coexposure to ovalbumin and particle matter to induce adjuvant activity in respiratory allergy in the mouse. Inhal Toxicol, 2003. 15(13): p. 1309-25.

110. Junqueira, Carneiro, Schiebler. Histologie. 4. Auflage. Heidelberg: Springer, 1996: S. 306-372

111. de Vries, J.E., H. Yssel, and H. Spits, Interplay between the TCR/CD3 complex and CD4 or CD8 in the activation of cytotoxic T lymphocytes. Immunol Rev, 1989. 109: p. 119-41.

112. Rudd, C.E., CD4, CD8 and the TCR-CD3 complex: a novel class of protein-tyrosine kinase receptor. Immunol Today, 1990. 11(11): p. 400-6.

113. Scott, C.S., S.J. Richards, and B.E. Roberts, Patterns of membrane TcR alpha beta and TcR gamma delta chain expression by normal blood CD4+CD8-, CD4-CD8+, CD4-CD8dim+ and CD4-CD8- lymphocytes. Immunology, 1990. 70(3): p. 351-6.

114. King, P.D., M.A. Ibrahim, and D.R. Katz, Adhesion molecules: co-stimulators and co-mitogens in dendritic cell-T cell interaction. Adv Exp Med Biol, 1993. 329: p. 53-8.

115. Hladik, F., et al., Dendritic cell-T-cell interactions support coreceptor-independent human immunodeficiency virus type 1 transmission in the human genital tract. J Virol, 1999. 73(7): p. 5833-42.

116. Hong, L., T.J. Webb, and D.S. Wilkes, Dendritic cell-T cell interactions: CD8 alpha alpha expressed on dendritic cells regulates T cell proliferation. Immunol Lett, 2007. 108(2): p. 174-8.

117. Ruedl, C., et al., Phenotypic and functional characterization of CD11c+ dendritic cell population in mouse Peyer's patches. Eur J Immunol, 1996. 26(8): p. 1801-6.

118. Blackford, J., et al., A monoclonal antibody, 3/22, to rabbit CD11c which induces homotypic T cell aggregation: evidence that ICAM-1 is a ligand for CD11c/CD18. Eur J Immunol, 1996. 26(3): p. 525-31.

119. Ihanus, E., et al., Red-cell ICAM-4 is a ligand for the monocyte/macrophage integrin CD11c/CD18: characterization of the binding sites on ICAM-4. Blood, 2007. 109(2): p. 802-10.

120. Meunier, L., et al., Retinoic acid upregulates human Langerhans cell antigen presentation and surface expression of HLA-DR and CD11c, a beta 2 integrin critically involved in T-cell activation. J Invest Dermatol, 1994. 103(6): p. 775-9.

121. Schwarzer, E., et al., Phagocytosis of the malarial pigment, hemozoin, impairs expression of major histocompatibility complex class II antigen, CD54, and CD11c in human monocytes. Infect Immun, 1998. 66(4): p. 1601-6.

122. Tian, T., et al., In vivo depletion of CD11c+ cells delays the CD4+ T cell response to Mycobacterium tuberculosis and exacerbates the outcome of infection. J Immunol, 2005. 175(5): p. 3268-72.

123. Hirsch, S., J.M. Austyn, and S. Gordon, Expression of the macrophage-specific antigen F4/80 during differentiation of mouse bone marrow cells in culture. J Exp Med, 1981. 154(3): p. 713-25.

124. Austyn, J.M. and S. Gordon, F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. Eur J Immunol, 1981. 11(10): p. 805-15.

125. Ginsel, L.A., F4/80 and peroxidatic activity of macrophages. J Histochem Cytochem, 1987. 35(10): p. 1168-70.

126. Lin, H.H., et al., The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. J Exp Med, 2005. 201(10): p. 1615-25.

127. van den Berg, T.K. and G. Kraal, A function for the macrophage F4/80 molecule in tolerance induction. Trends Immunol, 2005. 26(10): p. 506-9.

128. Shen, H.H., et al., CCR3 monoclonal antibody inhibits airway eosinophilic inflammation and mucus overproduction in a mouse model of asthma. Acta Pharmacol Sin, 2006. 27(12): p. 1594-9.

129. Grimaldi, J.C., et al., Depletion of eosinophils in mice through the use of antibodies specific for C-C chemokine receptor 3 (CCR3). J Leukoc Biol, 1999. 65(6): p. 846-53.

130. Kato, H., et al., New variations of human CC-chemokine receptors CCR3 and CCR4. Genes Immun, 1999. 1(2): p. 97-104.

131. Uguccioni, M., et al., High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. J Clin Invest, 1997. 100(5): p. 1137-43.

132. Sallusto, F., C.R. Mackay, and A. Lanzavecchia, Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. Science, 1997. 277(5334): p. 2005-7.

133. Hochstetter, R., et al., The CC chemokine receptor 3 CCR3 is functionally expressed on eosinophils but not on neutrophils. Eur J Immunol, 2000. 30(10): p. 2759-64.

134. Elsner, J., et al., The CC chemokine antagonist Met-RANTES inhibits eosinophil effector functions through the chemokine receptors CCR1 and CCR3. Eur J Immunol, 1997. 27(11): p. 2892-8.

135. El-Shazly, A., et al., Novel association of the src family kinases, hck and c-fgr, with CCR3 receptor stimulation: A possible mechanism for eotaxin-induced human eosinophil chemotaxis. Biochem Biophys Res Commun, 1999. 264(1): p. 163-70.

136. Van Lent, P.L., et al., Monocytes/macrophages rather than PMN are involved in early cartilage degradation in cationic immune complex arthritis in mice. J Leukoc Biol, 1997. 61(3): p. 267-78.

137. Tacchini-Cottier, F., et al., An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2 response in BALB/c mice infected with Leishmania major. J Immunol, 2000. 165(5): p. 2628-36.

138. Xiao, H., et al., The role of neutrophils in the induction of glomerulonephritis by anti-myeloperoxidase antibodies. Am J Pathol, 2005. 167(1): p. 39-45.

139. Lavigne, S., et al., Identification and analysis of eosinophils by flow cytometry using the depolarized side scatter-saponin method. Cytometry, 1997. 29(3): p. 197-203.

140. Thurau, A.M., et al., Identification of eosinophils by flow cytometry. Cytometry, 1996. 23(2): p. 150-8.

141. Gopinath, R. and T.B. Nutman, Identification of eosinophils in lysed whole blood using side scatter and CD16 negativity. Cytometry, 1997. 30(6): p. 313-6.

142. Noble, A., et al., Elimination of IgE regulatory rat CD8+ T cells in vivo increases the co-ordinate expression of Th2 cytokines IL-4, IL-5 and IL-10. Immunology, 1993. 80(2): p. 326-9.

143. Mosmann, T.R., et al., Isolation of monoclonal antibodies specific for IL-4, IL-5, IL-6, and a new Th2-specific cytokine (IL-10), cytokine synthesis inhibitory factor, by using a solid phase radioimmunoadsorbent assay. J Immunol, 1990. 145(9): p. 2938-45.

144. Noble, A., et al., Elimination of IgE regulatory rat CD8+ T cells in vivo increases the co-ordinate expression of Th2 cytokines IL-4, IL-5 and IL-10. Immunology, 1993. 80(2): p. 326-9.

145. Yanagida, M., et al., Effects of T-helper 2-type cytokines, interleukin-3 (IL-3), IL-4, IL-5, and IL-6 on the survival of cultured human mast cells. Blood, 1995. 86(10): p. 3705-14.

146. Fort, M.M., et al., IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. Immunity, 2001. 15(6): p. 985-95.

147. de Vries, J.E., The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. J Allergy Clin Immunol, 1998. 102(2): p. 165-9.

148. O'Garra, A., Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. Immunity, 1998. 8(3): p. 275-83.

149. Mosmann, T.R., et al., T-cell and mast cell lines respond to B-cell stimulatory factor 1. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. 83(15): p. 5654-8.

150. Howard, M. and W.E. Paul, Interleukins for B lymphocytes. Lymphokine Res, 1982. 1(1): p. 1-4.

151. Bogdan, C. and C. Nathan, Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10. Ann N Y Acad Sci, 1993. 685: p. 713-39.

152. Paul, C.C., et al., Epstein-Barr virus transformed B lymphocytes produce interleukin-5. Blood, 1990. 75(7): p. 1400-3.

153. Warren, H.S., et al., Production of IL-5 by human NK cells and regulation of IL-5 secretion by IL-4, IL-10, and IL-12. J Immunol, 1995. 154(10): p. 5144-52.

154. Karlen, S., et al., Biological and molecular characteristics of interleukin-5 and its receptor. Int Rev Immunol, 1998. 16(3-4): p. 227-47.

155. Lopez, A.F., et al., Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. J Exp Med, 1988. 167(1): p. 219-24.

156. Yamaguchi, Y., et al., Highly purified murine interleukin 5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil chemotactic factor. J Exp Med, 1988. 167(5): p. 1737-42.

157. Walsh, G.M., et al., IL-5 enhances the in vitro adhesion of human eosinophils, but not neutrophils, in a leucocyte integrin (CD11/18)-dependent manner. Immunology, 1990. 71(2): p. 258-65.

158. Akutsu, I., et al., Antibody against interleukin-5 prevents antigen-induced eosinophil infiltration and bronchial hyperreactivity in the guinea pig airways. Immunol Lett, 1995. 45(1-2): p. 109-16.

159. Mauser, P.J., et al., Effects of an antibody to interleukin-5 in a monkey model of asthma. Am J Respir Crit Care Med, 1995. 152(2): p. 467-72.

160. Koike, M. and K. Takatsu, IL-5 and its receptor: which role do they play in the immune response? Int Arch Allergy Immunol, 1994. 104(1): p. 1-9.

161. Sanderson, C.J., Interleukin-5, eosinophils, and disease. Blood, 1992. 79(12): p. 3101-9.

162. Moore, K.W., et al., Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu Rev Immunol, 2001. 19: p. 683-765.

163. Moore, K.W., et al., Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRFI. Science, 1990. 248(4960): p. 1230-4.

164. Fiorentino, D.F., et al., IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. J Immunol, 1991. 146(10): p. 3444-51.

165. Koch, F., et al., High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. J Exp Med, 1996. 184(2): p. 741-6.

166. Steinbrink, K., et al., Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. J Immunol, 1997. 159(10): p. 4772-80.

167. Luttmann, W., et al., Synergistic effects of interleukin-4 or interleukin-13 and tumor necrosis factor-alpha on eosinophil activation in vitro. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. 20(3): p. 474-80.

168. Wills-Karp, M., The gene encoding interleukin-13: a susceptibility locus for asthma and related traits. Respir Res, 2000. 1(1): p. 19-23.

169. Dent, G., et al., Effects of a selective PDE4 inhibitor, D-22888, on human airways and eosinophils in vitro and late phase allergic pulmonary eosinophilia in guinea pigs. Pulm Pharmacol Ther, 1998. 11(1): p. 13-21.

170. Minty, A., et al., Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. Nature, 1993. 362(6417): p. 248-50.

171. Naseer, T., et al., Expression of IL-12 and IL-13 mRNA in asthma and their modulation in response to steroid therapy. Am J Respir Crit Care Med, 1997. 155(3): p. 845-51.

172. Wills-Karp, M., et al., Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. Science, 1998. 282(5397): p. 2258-61.

173. Verhagen, C.E., et al., Type 1- and type 2-like lesional skin-derived Mycobacterium leprae-responsive T cell clones are characterized by coexpression of IFN-gamma/TNF-alpha and IL-4/IL-5/IL-13, respectively. J Immunol, 1998. 160(5): p. 2380-7.

174. Gajewski, T.F. and F.W. Fitch, Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. J Immunol, 1988. 140(12): p. 4245-52.

175. Bach, E.A., M. Aguet, and R.D. Schreiber, The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. Annu Rev Immunol, 1997. 15: p. 563-91.

176. Young, H.A., Regulation of interferon-gamma gene expression. J Interferon Cytokine Res, 1996. 16(8): p. 563-8.

177. Taya, Y., et al., Cloning and structure of the human immune interferon-gamma chromosomal gene. Embo J, 1982. 1(8): p. 953-8.

178. Schroder, K., et al., Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. J Leukoc Biol, 2004. 75(2): p. 163-89.

179. Akira, S., The role of IL-18 in innate immunity. Curr Opin Immunol, 2000. 12(1): p. 59-63.

180. Dinarello, C.A., IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. J Allergy Clin Immunol, 1999. 103(1 Pt 1): p. 11-24.

181. MacMicking, J., Q.W. Xie, and C. Nathan, Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol, 1997. 15: p. 323-50.

182. Shirayoshi, Y., et al., Interferon-induced transcription of a major histocompatibility class I gene accompanies binding of inducible nuclear factors to the interferon consensus sequence. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. 85(16): p. 5884-8.

183. Boehm, U., et al., Cellular responses to interferon-gamma. Annu Rev Immunol, 1997. 15: p. 749-95.

184. Yoshida, A., et al., IFN-gamma induces IL-12 mRNA expression by a murine macrophage cell line, J774. Biochem Biophys Res Commun, 1994. 198(3): p. 857-61.

185. Gajewski, T.F. and F.W. Fitch, Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. J Immunol, 1988. 140(12): p. 4245-52.

186. Hou, J., V. Baichwal, and Z. Cao, Regulatory elements and transcription factors controlling basal and cytokine-induced expression of the gene encoding intercellular adhesion molecule 1. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(24): p. 11641-5.

187. Jesse, T.L., et al., Interferon regulatory factor-2 is a transcriptional activator in muscle where It regulates expression of vascular cell adhesion molecule-1. J Cell Biol, 1998. 140(5): p. 1265-76.

188. De Bie, J.J., et al., Modulation of airway hyperresponsiveness and eosinophilia by selective histamine and 5-HT receptor antagonists in a mouse model of allergic asthma. Br J Pharmacol, 1998. 124(5): p. 857-64.

189. Hamada, K., C.A. Goldsmith, and L. Kobzik, Increased airway hyperresponsiveness and inflammation in a juvenile mouse model of asthma exposed to air-pollutant aerosol. J Toxicol Environ Health A, 1999. 58(3): p. 129-43.

190. Goldsmith, C.A., et al., Effects of environmental aerosols on airway hyperresponsiveness in a murine model of asthma. Inhal Toxicol, 1999. 11(11): p. 981-98.

191. Joachim, R.A., et al., Stress enhances airway reactivity and airway inflammation in an animal model of allergic bronchial asthma. Psychosom Med, 2003. 65(5): p. 811-5.

192. Khor, Y.H., et al., Airway cell and cytokine changes in early asthma deterioration after inhaled corticosteroid reduction. Clin Exp Allergy, 2007. 37(8): p. 1189-98.

193. Kwon, O.K., et al., Inhibitory effect of kefiran on ovalbumin-induced lung inflammation in a murine model of asthma. Arch Pharm Res, 2008. 31(12): p. 1590-6.

194. Iwakura, Y., Roles of IL-1 in the development of rheumatoid arthritis: consideration from mouse models. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. 13(4-5): p. 341-55.

195. Ji, J., J. Sun, and L. Soong, Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with Leishmania amazonensis. Infect Immun, 2003. 71(8): p. 4278-88.

196. al-Ramadi, B.K., et al., The Src-protein tyrosine kinase Lck is required for IL-1-mediated costimulatory signaling in Th2 cells. J Immunol, 2001. 167(12): p. 6827-33.

197. Satoskar, A.R., et al., Enhanced Th2-like responses in IL-1 type 1 receptor-deficient mice. Eur J Immunol, 1998. 28(7): p. 2066-74.

198. Broide, D.H., M.M. Paine, and G.S. Firestein, Eosinophils express interleukin 5 and granulocyte macrophage-colony-stimulating factor mRNA at sites of allergic inflammation in asthmatics. J Clin Invest, 1992. 90(4): p. 1414-24.

199. Thomas, S.S. and S.K. Chhabra, A study on the serum levels of interleukin-1beta in bronchial asthma. J Indian Med Assoc, 2003. 101(5): p. 282, 284, 286 passim.

200. Johnson, V.J., B. Yucesoy, and M.I. Luster, Prevention of IL-1 signaling attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. J Allergy Clin Immunol, 2005. 116(4): p. 851-8.

201. Zhang, Y., L.O. Cardell, and M. Adner, IL-1beta induces murine airway 5-HT2A receptor hyperresponsiveness via a non-transcriptional MAPK-dependent mechanism. Respir Res, 2007. 8: p. 29.

202. Broide, D.H., et al., Inhibition of eosinophilic inflammation in allergen-challenged, IL-1 receptor type 1-deficient mice is associated with reduced eosinophil rolling and adhesion on vascular endothelium. Blood, 2000. 95(1): p. 263-9.

203. Schmitz, N., M. Kurrer, and M. Kopf, The IL-1 receptor 1 is critical for Th2 cell type airway immune responses in a mild but not in a more severe asthma model. Eur J Immunol, 2003. 33(4): p. 991-1000.

204. Nakae, S., et al., IL-1 is required for allergen-specific Th2 cell activation and the development of airway hypersensitivity response. Int Immunol, 2003. 15(4): p. 483-90.

205. Ottesen, G.L., et al., Tissue disaggregation for flow cytometric DNA analysis: comparison of fine-needle aspiration and an automated mechanical procedure. Cytometry, 1996. 26(1): p. 65-8.

206. Brockhoff, G., et al., Use of a mechanical dissociation device to improve standardization of flow cytometric cytokeratin DNA measurements of colon carcinomas. Cytometry, 1999. 38(4): p. 184-91.

207. Novelli, M., et al., Collagenase digestion and mechanical disaggregation as a method to extract and immunophenotype tumour lymphocytes in cutaneous T-cell lymphomas. Clin Exp Dermatol, 2000. 25(5): p. 423-31.

208. London, N.J., S.M. Swift, and H.A. Clayton, Isolation, culture and functional evaluation of islets of Langerhans. Diabetes Metab, 1998. 24(3): p. 200-7.

209. Paget, M., et al., Human islet isolation: semi-automated and manual methods. Diab Vasc Dis Res, 2007. 4(1): p. 7-12.

210. Sauer, K.A., et al., Isolation of CD4+ T cells from murine lungs: a method to analyze ongoing immune responses in the lung. Nat Protoc, 2006. 1(6): p. 2870-5.

211. Day, C.E., et al., A novel method for isolation of human lung T cells from lung resection tissue reveals increased expression of GAPDH and CXCR6. J Immunol Methods, 2009. 342(1-2): p. 91-7.

212. York, I.A., et al., Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation. Immunol Rev, 1999. 172: p. 49-66.

213. Villadangos, J.A., et al., Proteases involved in MHC class II antigen presentation. Immunol Rev, 1999. 172: p. 109-20.

214. Pierre, P., [Proteases, natural protease inhibitors and activation of the machinery of antigen presentation in dendritic cells]. Pathol Biol (Paris), 2001. 49(6): p. 494-5.

215. Kloetzel, P.M. and F. Ossendorp, Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. Curr Opin Immunol, 2004. 16(1): p. 76-81.

216. Janssen, E.M., et al., Opposite effects of immunotherapy with ovalbumin and the immunodominant T-cell epitope on airway eosinophilia and hyperresponsiveness in a murine model of allergic asthma. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. 21(1): p. 21-9.

217. Renz, H., et al., Comparison of the allergenicity of ovalbumin and ovalbumin peptide 323-339. Differential expansion of V beta-expressing T cell populations. J Immunol, 1993. 151(12): p. 7206-13.

218. James, D.G., G. Rizzato, and O.P. Sharma, Bronchopulmonary lavage (BAL). A window of the lungs. Sarcoidosis, 1992. 9(1): p. 3-14.

219. Frangova, V., et al., BAL neutrophilia in asthmatic patients. A by-product of eosinophil recruitment? Chest, 1996. 110(5): p. 1236-42.

220. Keatings, V.M., et al., Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. Am J Respir Crit Care Med, 1996. 153(2): p. 530-4.

221. Pabst, R., et al., Evidence of a selective major vascular marginal pool of lymphocytes in the lung. Am Rev Respir Dis, 1987. 136(5): p. 1213-8.

222. Schuster, M., et al., Lymphocytes migrate from the blood into the bronchoalveolar lavage and lung parenchyma in the asthma model of the brown Norway rat. Am J Respir Crit Care Med, 2000. 161(2 Pt 1): p. 558-66.

223. Buijs, J., et al., Toxocara canis-induced murine pulmonary inflammation: analysis of cells and proteins in lung tissue and bronchoalveolar lavage fluid. Parasite Immunol, 1994. 16(1): p. 1-9.

224. Zhang, Y.J., et al., Montelukast modulates lung CysLT(1) receptor expression and eosinophilic inflammation in asthmatic mice. Acta Pharmacol Sin, 2004. 25(10): p. 1341-6.

225. Ceyhan, B.B., et al., Effect of inhaled cyclosporin on the rat airway: histologic and bronchoalveolar lavage assessment. Respiration, 1998. 65(1): p. 71-8.

226. Silkoff, P.E., et al., The relationship of induced-sputum inflammatory cells to BAL and biopsy. Chest, 2003. 123(3 Suppl): p. 371S-2S.

227. Maestrelli, P., et al., Comparison of leukocyte counts in sputum, bronchial biopsies, and bronchoalveolar lavage. Am J Respir Crit Care Med, 1995. 152(6 Pt 1): p. 1926-31.

228. Adelroth, E., How to measure airway inflammation: bronchoalveolar lavage and airway biopsies. Can Respir J, 1998. 5 Suppl A: p. 18A-21A.

229. Fend, F., et al., Diagnostic value of combined bronchoalveolar lavage and transbronchial lung biopsy. Pathol Res Pract, 1989. 184(3): p. 312-7.

230. Krug, N., et al., How do lymphocytes get into the asthmatic airways? Lymphocyte traffic into and within the lung in asthma. Clin Exp Allergy, 1998. 28(1): p. 10-8.

231. Elwood, W., et al., Characterization of allergen-induced bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation in actively sensitized brown-Norway rats. J Allergy Clin Immunol, 1991. 88(6): p. 951-60.

232. Krug, N., et al., Enhanced expression of fas ligand (CD95L) on T cells after segmental allergen provocation in asthma. J Allergy Clin Immunol, 1999. 103(4): p. 649-55.

233. Lehmann, C., et al., Lymphocytes in the bronchoalveolar space reenter the lung tissue by means of the alveolar epithelium, migrate to regional lymph nodes, and subsequently rejoin the systemic immune system. Anat Rec, 2001. 264(3): p. 229-36.

234. Bradley, B.L., et al., Eosinophils, T-lymphocytes, mast cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma: comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness. J Allergy Clin Immunol, 1991. 88(4): p. 661-74.

235. Bentley, A.M., et al., Identification of T lymphocytes, macrophages, and activated eosinophils in the bronchial mucosa in intrinsic asthma. Relationship to symptoms and bronchial responsiveness. Am Rev Respir Dis, 1992. 146(2): p. 500-6.

236. Webb, D.C., et al., Distinct spatial requirement for eosinophil-induced airways hyperreactivity. Immunol Cell Biol, 2001. 79(2): p. 165-9.

237. Ward, C., et al., Airway inflammation, basement membrane thickening and bronchial hyperresponsiveness in asthma. Thorax, 2002. 57(4): p. 309-16.

238. Olivieri, D. and A. Foresi, Correlation between cell content of bronchoalveolar lavage (BAL) and histologic findings in asthma. Respiration, 1992. 59 Suppl 1: p. 3-5.

239. Radinger, M. and J. Lotvall, Eosinophil progenitors in allergy and asthma - do they matter? Pharmacol Ther, 2009. 121(2): p. 174-84.

240. Eksteen, B., et al., Epithelial inflammation is associated with CCL28 production and the recruitment of regulatory T cells expressing CCR10. J Immunol, 2006. 177(1): p. 593-603.

241. O'Sullivan, B.J., et al., IL-1 beta breaks tolerance through expansion of CD25+ effector T cells. J Immunol, 2006. 176(12): p. 7278-87.

242. Karjalainen, J., et al., The IL1A genotype associates with atopy in nonasthmatic adults. J Allergy Clin Immunol, 2002. 110(3): p. 429-34.

243. Adjers, K., et al., Epistatic effect of IL1A and IL4RA genes on the risk of atopy. J Allergy Clin Immunol, 2004. 113(3): p. 445-7.

244. Pessi, T., et al., A common IL-1 complex haplotype is associated with an increased risk of atopy. J Med Genet, 2003. 40(5): p. e66.

245. Ramadas, R.A., et al., IL-1 Receptor antagonist as a positional candidate gene in a murine model of allergic asthma. Immunogenetics, 2006. 58(10): p. 851-5.

246. Hang, L.W., et al., Interleukin-10 gene -627 allele variants, not interleukin-I beta gene and receptor antagonist gene polymorphisms, are associated with atopic bronchial asthma. J Clin Lab Anal, 2003. 17(5): p. 168-73.

247. Thomas, S.S. and S.K. Chhabra, A study on the serum levels of interleukin-1beta in bronchial asthma. J Indian Med Assoc, 2003. 101(5): p. 282, 284, 286 passim.

248. Johnson, V.J., B. Yucesoy, and M.I. Luster, Prevention of IL-1 signaling attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. J Allergy Clin Immunol, 2005. 116(4): p. 851-8.

249. Lappalainen, U., et al., Interleukin-1beta causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. 32(4): p. 311-8.

250. Wang, C.C., et al., Adenovirus expressing interleukin-1 receptor antagonist alleviates allergic airway inflammation in a murine model of asthma. Gene Ther, 2006. 13(19): p. 1414-21.

251. Whelan, R., et al., Role and regulation of interleukin-1 molecules in pro-asthmatic sensitised airway smooth muscle. Eur Respir J, 2004. 24(4): p. 559-67.

252. Erb, K.J., et al., Infection of mice with Mycobacterium bovis-Bacillus Calmette-Guerin (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia. J Exp Med, 1998. 187(4): p. 561-9.

253. Fremond, C.M., et al., IL-1 receptor-mediated signal is an essential component of MyD88-dependent innate response to Mycobacterium tuberculosis infection. J Immunol, 2007. 179(2): p. 1178-89.

254. O'Gorman, M.T., et al., IL-1beta and TNF-alpha induce increased expression of CCL28 by airway epithelial cells via an NFkappaB-dependent pathway. Cell Immunol, 2005. 238(2): p. 87-96.

255. Nakae, S., et al., IL-1 is required for allergen-specific Th2 cell activation and the development of airway hypersensitivity response. Int Immunol, 2003. 15(4): p. 483-90.

256. Dulin, A.M., M.J. Paape, and B.T. Weinland, Cytospin centrifuge in differential counts of milk somatic cells. J Dairy Sci, 1982. 65(7): p. 1247-51.

257. Chapin-Robertson, K., S.E. Dahlberg, and S.C. Edberg, Clinical and laboratory analyses of cytospin-prepared Gram stains for recovery and diagnosis of bacteria from sterile body fluids. J Clin Microbiol, 1992. 30(2): p. 377-80.

258. Landry, M.L., D. Ferguson, and J. Wlochowski, Detection of herpes simplex virus in clinical specimens by cytospin-enhanced direct immunofluorescence. J Clin Microbiol, 1997. 35(1): p. 302-4.

259. Burton, J.L., J.R. Goepel, and J.A. Lee, Demand management in urine cytology: a single cytospin slide is sufficient. J Clin Pathol, 2000. 53(9): p. 718-9.

260. Wardlaw, A.J., Eosinophils in the 1990s: new perspectives on their role in health and disease. Postgrad Med J, 1994. 70(826): p. 536-52.

261. Wardlaw, A.J., et al., Eosinophils in asthma and other allergic diseases. Br Med Bull, 2000. 56(4): p. 985-1003.

262. Daneshpouy, M., et al., Activated eosinophils in upper gastrointestinal tract of patients with graft-versus-host disease. Blood, 2002. 99(8): p. 3033-40.

263. Janin, A., M. Ertault-Daneshpouy, and G. Socie, Eosinophils and severe forms of graft-versus-host disease. Blood, 2003. 101(5): p. 2073.

264. Conroy, D.M. and T.J. Williams, Eotaxin and the attraction of eosinophils to the asthmatic lung. Respir Res, 2001. 2(3): p. 150-6.

265. Makino, S. and T. Fukuda, Eosinophils and allergy in asthma. Allergy Proc, 1995. 16(1): p. 13-21.

266. Krug, N., et al., [Is asthma a disease of the T-helper lymphocytes (TH2 Cells)? The significance of activated T-cells and eosinophils in chronic inflammatory reaction in bronchial asthma]. Med Klin (Munich), 1993. 88(6): p. 377-80.

267. Stirling, R.G., et al., Interleukin-5 induces CD34(+) eosinophil progenitor mobilization and eosinophil CCR3 expression in asthma. Am J Respir Crit Care Med, 2001. 164(8 Pt 1): p. 1403-9.

268. Woerly, G., et al., Expression of Th1 and Th2 immunoregulatory cytokines by human eosinophils. Int Arch Allergy Immunol, 1999. 118(2-4): p. 95-7.

269. Spencer, L.A., et al., Human eosinophils constitutively express multiple Th1, Th2, and immunoregulatory cytokines that are secreted rapidly and differentially. J Leukoc Biol, 2009. 85(1): p. 117-23.

270. Tateda, K., et al., Early recruitment of neutrophils determines subsequent T1/T2 host responses in a murine model of Legionella pneumophila pneumonia. J Immunol, 2001. 166(5): p. 3355-61.

271. Glowacka, E., et al., The effect of LPS on neutrophils from patients with high risk of type 1 diabetes mellitus in relation to IL-8, IL-10 and IL-12 production and apoptosis in vitro. Scand J Immunol, 2002. 55(2): p. 210-7.

272. McFarlane, E., et al., Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with Leishmania donovani. Infect Immun, 2008. 76(2): p. 532-41.

273. Singh, V. and J.N. Agrewala, Regulatory role of pro-Th1 and pro-Th2 cytokines in modulating the activity of Th1 and Th2 cells when B cell and macrophages are used as antigen presenting cells. BMC Immunol, 2006. 7: p. 17.

274. Stout, R.D., et al., Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. J Immunol, 2005. 175(1): p. 342-9.

275. Murata, Y., T. Shimamura, and J. Hamuro, The polarization of T(h)1/T(h)2 balance is dependent on the intracellular thiol redox status of macrophages due to the distinctive cytokine production. Int Immunol, 2002. 14(2): p. 201-12.

276. Tang, C., et al., Th type 1-stimulating activity of lung macrophages inhibits Th2-mediated allergic airway inflammation by an IFN-gamma-dependent mechanism. J Immunol, 2001. 166(3): p. 1471-81.

277. 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.

278. Bingisser, R.M. and P.G. Holt, Immunomodulating mechanisms in the lower respiratory tract: nitric oxide mediated interactions between alveolar macrophages, epithelial cells, and T-cells. Swiss Med Wkly, 2001. 131(13-14): p. 171-9.

279. Dinarello, C.A., Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood, 1996. 87(6): p. 2095-147.

280. Verhein, K.C., D.B. Jacoby, and A.D. Fryer, IL-1 receptors mediate persistent, but not acute, airway hyperreactivity to ozone in guinea pigs. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008. 39(6): p. 730-8.

281. Jagels, M.A., et al., Mechanisms and regulation of polymorphonuclear leukocyte and eosinophil adherence to human airway epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. 21(3): p. 418-27.

282. Liu, L., et al., Neutrophil transmigration across monolayers of endothelial cells and airway epithelial cells is regulated by different mechanisms. Ann N Y Acad Sci, 1996. 796: p. 21-9.

283. Morzycki, W., J. Sadowska, and A.C. Issekutz, Interleukin-1 and tumour necrosis factor alpha induced polymorphonuclear leukocyte-endothelial cell adhesion and transendothelial migration in vitro: the effect of apical versus basal monolayer stimulation. Immunol Lett, 1990. 25(4): p. 331-40.

284. Moser, R., et al., Interleukin 1 and tumor necrosis factor stimulate human vascular endothelial cells to promote transendothelial neutrophil passage. J Clin Invest, 1989. 83(2): p. 444-55.

285. Shieh, J.H., et al., Interleukin-1 modulation of cytokine receptors on human neutrophils: in vitro and in vivo studies. Blood, 1993. 81(7): p. 1745-54.

286. Shieh, J.H., R.H. Peterson, and M.A. Moore, Cytokines and dexamethasone modulation of IL-1 receptors on human neutrophils in vitro. J Immunol, 1993. 150(8 Pt 1): p. 3515-24.

287. Bonecchi, R., et al., Up-regulation of CCR1 and CCR3 and induction of chemotaxis to CC chemokines by IFN-gamma in human neutrophils. J Immunol, 1999. 162(1): p. 474-9.

288. Kasama, T., et al., Interferon gamma modulates the expression of neutrophil-derived chemokines. J Investig Med, 1995. 43(1): p. 58-67.

289. Stout, R.D. and K. Bottomly, Antigen-specific activation of effector macrophages by IFN-gamma producing (TH1) T cell clones. Failure of IL-4-producing (TH2) T cell clones to activate effector function in macrophages. J Immunol, 1989. 142(3): p. 760-5.

290. Mori, A., et al., Selective suppression of Th2-mediated airway eosinophil infiltration by low-molecular weight CCR3 antagonists. Int Immunol, 2007. 19(8): p. 913-21.

291. Bullock, J.Z., et al., Interplay of adaptive th2 immunity with eotaxin-3/c-C chemokine receptor 3 in eosinophilic esophagitis. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2007. 45(1): p. 22-31.

292. Lloyd, A.R. and J.J. Oppenheim, Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. Immunol Today, 1992. 13(5): p. 169-72.

293. Fava, R.A., et al., Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues: implications for TGF-beta-driven synovial inflammation and hyperplasia. J Exp Med, 1991. 173(5): p. 1121-32.

294. Cassatella, M.A., et al., Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes. Eur J Immunol, 1995. 25(1): p. 1-5.

295. Sypek, J.P., et al., Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. J Exp Med, 1993. 177(6): p. 1797-802.

296. Hsieh, C.S., et al., Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. Science, 1993. 260(5107): p. 547-9.

297. Nagelkerken, L., et al., Role of transforming growth factor-beta in the preferential induction of T helper cells of type 1 by staphylococcal enterotoxin B. Eur J Immunol, 1993. 23(9): p. 2306-10.

298. Bright, J.J. and S. Sriram, TGF-beta inhibits IL-12-induced activation of Jak-STAT pathway in T lymphocytes. J Immunol, 1998. 161(4): p. 1772-7.

299. Beil, W.J., et al., Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. J Leukoc Biol, 1992. 52(2): p. 135-42.

300. Lopez Kostka, S., et al., IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. J Immunol, 2009. 182(5): p. 3039-46.

301. Tang, C., et al., Differential regulation of allergen-specific T(H2)- but not T(H1)-type responses by alveolar macrophages in atopic asthma. J Allergy Clin Immunol, 1998. 102(3): p. 368-75.

302. Tang, C., et al., Alveolar macrophages from atopic asthmatics, but not atopic nonasthmatics, enhance interleukin-5 production by CD4+ T cells. Am J Respir Crit Care Med, 1998. 157(4 Pt 1): p. 1120-6.

303. Strickland, D.H., et al., Regulation of T-cell function in lung tissue by pulmonary alveolar macrophages. Immunology, 1993. 80(2): p. 266-72.

304. Strickland, D.H., U.R. Kees, and P.G. Holt, Suppression of T-cell activation by pulmonary alveolar macrophages: dissociation of effects on TcR, IL-2R expression, and proliferation. Eur Respir J, 1994. 7(12): p. 2124-30.

305. Xin, L., Y. Li, and L. Soong, Role of interleukin-1beta in activating the CD11c(high) CD45RB- dendritic cell subset and priming Leishmania amazonensis-specific CD4+ T cells in vitro and in vivo. Infect Immun, 2007. 75(10): p. 5018-26.

306. Nishibu, A., et al., Roles for IL-1 and TNFalpha in dynamic behavioral responses of Langerhans cells to topical hapten application. J Dermatol Sci, 2007. 45(1): p. 23-30.

307. Lambrecht, B.N., et al., Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice. J Immunol, 1998. 160(8): p. 4090-7.

308. Stumbles, P.A., et al., Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. J Exp Med, 1998. 188(11): p. 2019-31.

309. Helmby, H. and R.K. Grencis, Interleukin 1 plays a major role in the development of Th2-mediated immunity. Eur J Immunol, 2004. 34(12): p. 3674-81.

310. Lin, K.W., et al., The roles of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist in antigen-specific immune responses. J Biomed Sci, 2002. 9(1): p. 26-33.

311. Colotta, F., et al., Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. Science, 1993. 261(5120): p. 472-5.

312. Rauschmayr, T., R.W. Groves, and T.S. Kupper, Keratinocyte expression of the type 2 interleukin 1 receptor mediates local and specific inhibition of interleukin 1-mediated inflammation. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(11): p. 5814-9.

313. Spoelstra, F.M., et al., Interferon-gamma and interleukin-4 differentially regulate ICAM-1 and VCAM-1 expression on human lung fibroblasts. Eur Respir J, 1999. 14(4): p. 759-66.

314. Berkman, N., et al., Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by interleukin-4 and interleukin-13 in human lung epithelial cells. Immunology, 1996. 89(3): p. 363-7.

315. Juffermans, N.P., et al., Interleukin-1 signaling is essential for host defense during murine pulmonary tuberculosis. J Infect Dis, 2000. 182(3): p. 902-8.

316. Tominaga, K., et al., IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells. Int Immunol, 2000. 12(2): p. 151-60.

317. Burchell, J.T., et al., Attenuation of allergen-induced airway hyperresponsiveness is mediated by airway regulatory T cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009. 296(3): p. L307-19.

318. Strickland, D.H., et al., Mucosal regulatory T cells in airway hyperresponsiveness. Chem Immunol Allergy, 2008. 94: p. 40-7.

319. Robinson, D.S., M. Larche, and S.R. Durham, Tregs and allergic disease. J Clin Invest, 2004. 114(10): p. 1389-97.

320. O'Garra, A. and P. Vieira, Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. Nat Med, 2004. 10(8): p. 801-5.

321. Larche, M., Regulatory T cells in allergy and asthma. Chest, 2007. 132(3): p. 1007-14.

322. Hogg, K.G., S. Kumkate, and A.P. Mountford, IL-10 regulates early IL-12-mediated immune responses induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine. Int Immunol, 2003. 15(12): p. 1451-9.

323. Caucig, P., et al., Dual role of IL-1[alpha] in delayed type hypersensitivity and airway hyperresponsiveness. International Archives of Allergy and Immunology, October 6, 2009, Manuscript No.: 200903019

8. Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Soweit nicht anderweitig deklariert, handelt es sich bei den Abbildungen um eigene Darstellungen.

	Seite
Abb. 1.1: Ontogenese der T-Helferzelle	2
Abb. 1.2: Th1/Th2-Differenzierung	5
Abb. 1.3: Interleukin-1α, Tertiärstruktur (Quelle: Wikipedia, the free encyclopedia, „Crystal structure of IL-1a“, Copyright released into public domain, 2008)	8
Abb. 1.4: Der Einfluss von IL-1α auf die Th-Zell-Differenzierung	11
Abb. 1.5: Pathogenese des allergischen Asthmas (nach Eckard Hamelmann, „Mechanismus der Allergen-induzierten Ausbildung von Atemwegs-Entzündung und Atemwegs-Hyperreaktivität“, 2002)	12
Abb. 3.1: Induktion des allergischen Asthmas und Behandlung mit IL-1α	30
Abb. 3.2: Mechanische Separation mittels Pinzette, Spritze und Zellsieb	32
Abb. 3.3: Lichtmikroskopische Darstellung eines Cytospins und einzelner Zellen	36
Abb. 3.4: Repräsentative FACS-Analyse muriner Lungenzellen	41
Abb. 4.1: Methodenetablierung zur Zellgewinnung, Zellausbeute und Restimulation	49
Abb. 4.2: Histologische Differenzierung der aus der kompletten Lunge und aus der BAL isolierten inflammatorischen Zellen mittels Cytospin	52
Abb. 4.3: Durchflusszytometrisch bestimmte Anteile der phänotypisch charakterisierten inflammatorischen Zellen aus der gesamten Lunge und der BAL	56
Abb. 4.4: Durchflusszytometrisch bestimmte Anteile der phänotypisch charakterisierten inflammatorischen Zellen aus der gesamten Lunge und der BAL	57
Abb. 4.5: Analyse der aus den Überständen der kultivierten Lungenzellen und der BAL bestimmten Zytokine	62

8.2 Tabellenverzeichnis

Soweit nicht anderweitig deklariert, handelt es sich bei den Tabellen um eigene Darstellungen.

Seite

Tab. 3.1: Im Rahmen der Durchflusszytometrie verwendete phänotypische Marker zur Charakterisierung einzelner Zelltypen. 38

Tab. 3.2: Im Rahmen der Durchflusszytometrie eingesetztes Antikörperpanel. Dargestellt sind die verwendeten Kofärbungen. 39

Tab. 4.1: Zusammenfassung der Effekte von IL-1α auf die zelluläre Zusammensetzung und die produzierten Zytokine der Zellisolate aus der kompletten Lunge und der BAL 65

8.3 Danksagung

aufgrund datenschutzrechtlicher Gründe angepasst

Mein Dank gilt an erster Stelle meiner Betreuerin, die viel Zeit, Herzblut und besonders in der letzten Phase viel Geduld in mich und meine Dissertation investiert hat. Besonders hervorheben möchte ich auch meine Postdoc und die MTA, welche mich gründlich und intensiv eingearbeitet und unterstützt und mir den Umgang mit Versuchstieren und die Durchführung der verschiedenen Verfahren und Methoden beigebracht haben. Aber auch die anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe haben Anteil am Gelingen dieser Arbeit. MTAs und Mitdoktoranden haben mich mit offenen Armen in ihren Kreis aufgenommen und standen mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Dasselbe gilt auch für die anderen Arbeitsgruppen der Hautklinik, welche im Bedarfsfall bereitwillig ihr Wissen mit mir geteilt und auch kurzfristig unkompliziert mit Material ausgeholfen haben.

Den darüber hinaus mit uns kooperierenden Arbeitsgruppen möchte ich für ihre konstruktive Zusammenarbeit und für die Bereitstellung von OVA-Peptid danken.

Erwähnen möchte ich ebenfalls den Leiter meiner neuen Arbeitsgruppe, welcher es mir ermöglicht hat, während meiner wissenschaftlichen Vertiefungszeit die schriftliche Ausarbeitung meiner Dissertation parallel zu meiner Arbeit im Labor fertig zu stellen. Ich freue mich auf eine weitere spannende Zusammenarbeit über das Jahr 2009 hinaus.

Abschließend möchte ich meinen Eltern danken, die mich während meines Studiums und meiner Promotion fortwährend tatkräftig unterstützt haben. Auch ohne die Hilfe meines Bruders, meiner Tante und meiner Patentante hätte sich der Verlauf meiner Ausbildung sicherlich schwieriger gestaltet. Hervorheben möchte ich außerdem meine wundervolle Partnerin, welche mir besonders in der Endphase meiner Arbeit den Rücken freigehalten hat und meine süße Tochter, die des Öfteren an Wochenenden und Feiertagen mit mir im Labor war und fleißig Pipettenspitzen gesteckt hat, während ich Überstände abgenommen habe.

8.4 Lebenslauf

aufgrund datenschutzrechtlicher Gründe gelöscht