

**Die Bedeutung der Anaphylatoxine
C3a und C5a
im Mausmodell der allergischen Atemwegsentszündung**

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol. Ralf Bälder
geb. am 09.04.1971
in Nienburg/Weser

Referent: Prof. Dr. Walter Müller

Korreferent: Prof. Dr. Dr. Wilfried Bausch

Tag der Promotion: 14. Mai 2004

1a. Zusammenfassung

Die Anaphylatoxine sind biologisch aktive Spaltprodukte der Komplementkaskade, die in Mechanismen der Wirtsabwehr und Immunmodulation eine wichtige Rolle spielen. Die Anaphylatoxine vermitteln ihre Wirkungen über spezifische Rezeptoren, die von myeloiden und einer Vielzahl nicht-myeloider Zellen wie Endothel-, Epithelzellen sowie glatten Muskelzellen und auch Neuronen exprimiert werden. Sie vermitteln Wirkungen wie Zellaktivierung, Chemotaxis und die Kontraktion der glatten Muskulatur. Anaphylatoxine besitzen vor allem entzündungsfördernde Wirkungen und sind an der Pathogenese von Erkrankungen wie Sepsis und Immunkomplex-Erkrankungen beteiligt.

Jüngste Untersuchungen deuten darüber hinaus auf eine Bedeutung der Anaphylatoxine in der Pathogenese des Asthma bronchiale. Die Konzentrationen von C3a- und C5a-Spaltprodukten sind in der BAL von Asthmatikern nach segmentaler Allergenprovokation erhöht. Versuche an C3 sowie C3a Rezeptor defizienten Mäusen in Asthma-Modellen zeigen einen Einfluss auf die Ausbildung der Atemwegsreagibilität und der Atemwegseosinophilie.

Um die Bedeutung von C3a und C5a als pharmakologische Zielstrukturen für das allergische Asthma näher zu untersuchen, wurde die Funktion der Anaphylatoxinrezeptoren im murinen Asthmodell blockiert und die Auswirkung auf die Ausprägung des asthmatischen Phänotyps analysiert. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Einstrom eosinophiler und neutrophiler Granulozyten in die Lunge durch Blockade des C3a oder des C5a Rezeptors gehemmt werden kann. Die Einwanderung von Lymphozyten war unabhängig von einer C3a Rezeptor-Hemmung, wurde aber durch die Blockade des C5a Rezeptors signifikant vermindert. Die Reduktion der Lymphozyten über den C5aR war assoziiert mit einer Verringerung der Atemwegshyperreagibilität (AHR).

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die Anaphylatoxine in unterschiedlicher Weise an der Ausprägung des Asthma bronchiale beteiligt sind, und dass die pharmakologische Unterbrechung der Signaltransduktion ihrer Rezeptoren der Pathogenese entgegenwirken kann.

Schlagwörter: *Anaphylatoxine, Asthma, Maus*

1b. Abstract

The anaphylatoxins C3a and C5a are important mediators of host defence and immune regulation. They act via specific receptors, expressed e.g. on leukocytes, epithelial and smooth muscle cells, and mediate functions as chemotaxis, cell activation and smooth muscle contraction. These features are thought to be crucial sequences in the pathophysiology of allergic asthma.

Anaphylatoxins have shown to be elevated in asthmatic patients after segmental allergen provocation. In Animal models of experimental asthma mice deficient for the C3a receptor gene exhibit diminished airway hyperresponsiveness, lung eosinophilia and Th2 effector functions after allergen challenge.

To investigate whether the actions of anaphylatoxins are critical for the development of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness, the response of C3a- and C5a-receptors in BALB/c mice sensitized with aspergillus fumigatus extract was blocked by the administration of a non-peptide C3aR-inhibitor and a blocking C5aR-antibody. Mice treated with the C3aR-inhibitor and the C5aR-antibody in combination or alone showed a significant decrease in the number of BAL eosinophils and neutrophils. Airway hyperresponsiveness (AHR) was significantly improved for mice treated with the C5a receptor antibody. The decreased airway hyperresponsiveness was associated with a significant reduction in the number of BAL lymphocytes.

These results demonstrate, that pharmacological targeting of anaphylatoxins is effective in suppressing asthma typical symptoms like allergic inflammation and AHR in a murine model of allergic lung disease.

Keywords: *Anaphylatoxins, Asthma, Mouse*

Inhaltsverzeichnis

1a. Zusammenfassung	2
1b. Abstract	3
Inhaltsverzeichnis	4
2. Vorwort	8
3. Einleitung	9
3.1 Asthma bronchiale	9
3.1.1. Genetik	10
3.1.2. Th-1/Th-2 Gleichgewicht	10
3.1.3. Th2-Lymphozyten im Asthma bronchiale	12
3.1.4. Immunglobulin E (IgE)	13
3.1.5. Interleukin-4	14
3.1.6. Interleukin-13	15
3.1.7. Interleukin-5	16
3.1.8. Interleukin-6	17
3.1.9. Eotaxin	18
3.1.10. Eosinophile Granulozyten und ihre Mediatoren	19
3.1.11. Allergische Früh- und Spätreaktion der Lunge (EAR, LAR)	21
3.2. Atemwegshyperreagibilität	22
3.2.1. Mechanismus der Atemwegshyperreaktivität	23
3.2.2. Abnormalität der Atemwegs-Muskulatur	24
3.2.3. Strukturelle Abnormitäten	24
3.2.4. Neurologische Abnormitäten	25
3.2.5. Atemwegs-Entzündung und Atemwegshyperreaktivität	25
3.3. Therapien des Asthma bronchiale	26
3.4. Tiermodelle des allergischen Asthma Bronchiale	28
3.5. Das Komplementsystem	29
3.5.1. Evolution	30
3.5.2. Komplementaktivierung und Funktion	30
3.5.3. Der Alternative Weg der Komplementaktivierung	31
3.5.4. Der MPL-Weg der Komplementaktivierung (Lektin-Weg)	31
3.5.5. Der Klassische Weg der Komplementaktivierung	32
3.5.6. Regulation der Komplementkaskade	33
3.5.7. Komplement-assoziierte Erkrankungen	35
3.6. Anaphylatoxine	36
3.7. Biologische Wirkungen der Anaphylatoxine	36
3.8. Anaphylatoxin-Rezeptoren	38

3.9. Signaltransduktion der Anaphylatoxinrezeptoren	39
3.10. Regulation der Anaphylatoxine	39
3.11. Bedeutung der Anaphylatoxine beim Asthma bronchiale	39
3.12. Ziele der Arbeit	42
4. Material und Methoden	43
4.1. Hersteller/Vertreiberverzeichnis	43
4.2. Material	46
4.2.1. Chemikalien	46
4.2.2. Kits	49
4.2.3. Geräte	49
4.2.4. Verbrauchsmaterial	50
4.3. Puffer, Medien und Lösungen	51
4.3.1. Puffer	51
4.3.2. Medien	52
4.3.3. Lösungen	52
4.4. Medikamente und pharmakologische Agenzien	53
4.5. Allergene	54
4.6. Versuchstiere	54
4.7. Behandlungen	54
4.7.1. Behandlungsprotokolle	55
4.7.2. Sensibilisierungen	55
4.7.3 Inhalative Allergenprovokation (Challenge)	55
4.8. Parameter für die Phänotypisierung des allergischen Asthma	56
4.9. Lungenfunktionsmessung	57
4.9.1. Lungenfunktionsmessung im Headout System.	57
4.9.2. Lungenfunktionsmessung an der intubierten Maus	60
4.9.3. Auswertung	64
4.10. Gewinnung des Probenmaterials	64
4.10.1 Blut	64
4.10.2. Bronchoalveolarlavage (BAL)	64
4.10.3. Lunge	65
4.11. Analysen an der BAL	65
4.11.1. Mikroskopische Zelldifferenzierung nach Pappenheimfärbung	65
4.11.2. Bestimmung des Gehaltes an Eotaxin-2, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 in der BAL mittels ELISA	66
4.11.3 Bestimmung der Konzentrationen von C3a desarg und C5a desarg mittel Radio- Immunoassay (RIA)	67

4.11.3.1. Messung des Gehaltes an C3a desarg und C5a desarg in der BAL	67
4.11.3.2. Überprüfung des RIA's für humanes C3a desarg und C5a desarg auf Kreuzreaktivität zu den entsprechenden murinen Proteinen	68
4.12. Analysen am Blut.....	69
4.12.1. Bestimmung der Gesamt-IgE Konzentration im Plasma mittels ELISA.....	69
4.13. Analysen an der Lunge	70
4.13.1 Quantitative Bestimmung des RNA-Gehalts der Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR in Halblungenlysaten.....	70
4.13.1.1. RNA-Isolierung mit dem Nucleo Spin RNA II-Kit von Machery-Nagel	70
4.13.1.2. RNA-Isolierung aus Lungenlysat	70
4.13.1.3. DNA-Verdau.....	71
4.13.1.4. cDNA-Synthese aus RNA	71
4.13.1.5. Quantitative Realtime-PCR	71
4.13.1.6. Elektrophorese im Agarosegel	75
4.13.1.7. Primersequenzen und Amplifikate	75
4.13.2. Histologische Untersuchungen an Kryoschnitten der Mauslunge	77
4.13.2.1. Herstellung von Kryoschnitten der Mauslunge	77
4.13.2.3. Giemsa-Färbung von Lungenschnitten zum Nachweis von Eosinophilen Granulozyten.....	77
4.13.2.4. Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung von Lungenschnitten zur Charakterisierung struktureller Veränderungen des Lungengewebes.....	78
4.13.2.5. Immunhistologischer Nachweis von C5aR in Kryoschnitten der Mauslunge	79
4.14. Statistische Methoden	81
5. Ergebnisse	82
5.1 Parameter für die Phänotypisierung des allergischen Asthma	82
5.2. Etablierung der Lungenfunktionsmessung an der Maus.....	82
5.2.1. Lungenfunktionsmessung	82
5.2.2. Quasi-nicht-invasive Lungenfunktionsmessung orotracheal intubierter Mäuse.....	83
5.2.2.1. Methacholinprovozierte Atemwegsreaktivität an intubierten Mäusen.....	83
5.2.2.2. Allergische Frühreaktion an intubierten Mäusen	84
5.2.3. Headout Bodyplethysmographie an wachen Mäusen.....	85
5.2.3.1. Methacholinprovozierte Atemwegsreaktivität an wachen Mäusen	85
5.2.3.2. Allergische Frühreaktion auf inhalative Allergenprovokation an wachen Mäusen	87
5.2.4. Aerosolcharakterisierung	89
5.2.4.1. Aerosolgröße	89

5.2.4.2. Fotometrische Gravimetrie für Methacholin	90
5.3. Mausmodelle für das allergische Asthma.....	91
5.3.1. Vergleich von OVA- und Aspergillus Modell.....	92
5.3.2. Inhalative versus intratracheale Allergenprovokation im Aspergillus Modell	95
5.3.3. Vergleich der Zeitpunkte 24h versus 48h nach Allergenprovokation	99
5.3.4. Vergleich der Mausstämme C57BL/5 und BALB/c im Aspergillus- Modell.....	102
5.3.5. Vergleich zweier unterschiedlicher Formen der Negativkontrolle	106
5.4. Untersuchung zur Diskriminierung zwischen C3aR- und C5aR-vermittelten Effekten im Aspergillus Modell	113
5.5. Proteinexpression des C5a-Rezeptors in Kryoschnitten der Mauslunge	123
5.6. Bestimmung der Konzentrationen von C3a desarg und C5a desarg in der BAL.....	124
5.6.1. C3a desarg und C5a desarg Konzentration in der BAL von Asthmatiker nach segmentaler Allergenprovokation	124
5.6.2. Prüfung der human spezifischen C3a desarg- und C5a desarg-RIA auf Kreuzreaktivität zu den analogen Maus-Peptiden.....	125
6. Diskussion.....	127
6.1. Mausmodelle für die Untersuchung des Asthma bronchiale.....	127
6.1.1. Lungenfunktionsmessung der Atemwegsreagibilität	127
6.1.2. Lungenfunktionsmessung der allergischen Frühreaktion	129
6.2. Mausmodelle für die Untersuchung des Asthma bronchiale.....	130
6.2.1. Allergene	130
6.2.2. Unterschiede zwischen den Maustämmen C57BL/6 und BALB/c in der Ausprägung der Atemwegseosinophilie im Aspergillus Modell	133
6.3. Kreuzreaktivität des hum C3a desarg und C5a desarg für murine Anaphylatoxine ..	136
6.4. Immunhistochemischer Nachweis von C5aR in Kryoschnitten der Mauslunge.....	136
6.5. Die Rolle der Anaphylatoxine in der Effektorphase der allergischen Atemwegsentzündung im Mausmodell	137
7. Schlussfolgerung.....	145
8. Ausblick.....	145
9. Literaturverzeichnis	146
10. Abkürzungsverzeichnis.....	167
11. Danksagungen	172
12. Eidesstattliche Erklärung	173
13. Lebenslauf.....	174

2. Vorwort

Allergien haben sich in den letzten Dekaden zu einem zunehmenden medizinischen und wirtschaftlichen Problem entwickelt. Symptome der immunologischen Intoleranz gegenüber bestimmten Nahrungsmitteln, insbesondere Käse, wurden bereits von Hippokrates (460 – 375 v. Chr.) beschrieben. Seit Anbeginn der Neuzeit wurde eine Vielzahl von medizinischen Reporten respiratorischen Versagens gesammelt, die aus heutiger Sicht, retrospektiv, als Erkrankungen von asthmatischem Phänotyp angesehen werden können. In den frühen Zwanzigern des zwanzigsten Jahrhunderts wurde die Existenz von „Reaginen“ postuliert, die wenig immunologischen Schutz aber Gewebsschädigungen vermitteln können. Erst 1968 wurden diese von Ishizakas als IgE Moleküle identifiziert und werden heute als die zentralen Effektormoleküle allergischer Reaktionen betrachtet. [Burgio GR 2003]

Trotz des immensen Wissenszuwachses, vor allem auf den Gebieten der Immunologie und Genetik, die unser Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge enorm erweitert haben, zeigen allergische Erkrankungen einen steten Anstieg in ihrer Inzidenz und Prävalenz. Vor allem schwere allergische Erkrankungen des Respirationstraktes in der Form des Asthma bronchiale, mit z.T. tödlichem Verlauf, sind Gegenstand intensiver Forschung und Pharmazeutikaentwicklung geworden. Innovative Therapieansätze, die sich gegen das IgE oder andere zentrale Mediatoren der allergischen Entzündung wie IL-5 richten, zeigten bisher allerdings nicht die erhofften Heilungserfolge. Aus der Komplexität des Erkrankungsgeschehens rücken zunehmend auch Faktoren des natürlichen Immunsystems wie das Komplementsystem in den Vordergrund. Im Besonderen die Anaphylatoxine, biologisch aktive Spaltprodukte aus der Komplementkaskade, zeigen eine Reihe asthmafördernde Effekte auf die am Asthma bronchiale beteiligten Kompartimente wie Leukozyten, glatte Muskulatur, Endo- und Epithelien.

Die Bedeutung der Anaphylatoxine C3a und C5a in der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale ist Gegenstand dieser Doktorarbeit, und wurde am murinen Modell der allergischen Atemwegsentzündung und Atemwegshyperreagibilität bearbeitet.

3. Einleitung

3.1 Asthma bronchiale

Erkrankungen der Atemwege wie das Asthma bronchiale zeigen nach den Daten der nationalen und internationalen Gesundheitswesen einen kontinuierlichen Zuwachs der Erkrankungs- und Sterbefälle. Durch obstruktive Erkrankungen des Respirationstraktes verursachte Sterbefälle rangierten in Deutschland 2001 an achter Stelle [StbA 2001]. 10% der Kinder und 5% der Erwachsenen leiden in Deutschland an Asthma. Der geschätzte wirtschaftliche Schaden, verursacht durch direkte und indirekte Kosten des Asthma bronchiale betrug in Deutschland für das Kalenderjahr 1996 5,81 Milliarden DM [Weissflog D 2001].

Das Asthma bronchiale wird heute definiert als chronische entzündliche Erkrankung der Atemwege an der komplexe zelluläre sowie humorale Mechanismen beteiligt sind. Die chronische Entzündung ist assoziiert mit erhöhter Atemwegsreagibilität und führt zu wiederkehrenden Episoden von Atemnot und Husten, besonders in der Nacht und am frühen Morgen. Diese Episoden sind gemeinhin assoziiert mit einer ausgedehnten Atemwegsobstruktion die oftmals reversibel ist, sowohl spontan als auch medikamentös. [*Global Initiative for Asthma Global Strategy for Asthma Management and Prevention (updated 2002)*] [Ennis M 2003]

Kennzeichnend sind weiterhin eine erhöhte Mukusproduktion, Eosinophilie und erhöhte Serum-Immunglobulin E (IgE) Spiegel [Hamelmann E and Gelfand EW 2001]. Nach Allergenkontakt lässt sich beim allergischen Asthma eine zweiphasige Atemwegsobstruktion nachweisen, die in der Lungenfunktion als Abnahme des Tiffeneau-Indexes, dem Quotienten aus FEV₁ (forced expiratory Volume, forciertes Expirationsvolumen nach 1 sec.) und FVC (forced vital capacity, forcierte Vitalkapazität) zu erkennen ist. Die erste Phase wird als EAR (early airway response) und die zweite Phase als LAR (late airway response) bezeichnet. Diesen spezifischen Symptomen liegen unterschiedliche immunologische Prozesse zu Grunde. Die EAR setzt unmittelbar nach Allergenkontakt ein und wird durch Mastzellen initiiert, die über die Stimulierung hochaffiner IgE Rezeptoren durch das Antigen, unter anderem Autokoide (Histamin, PDG₂ und LTC₄) freisetzen, die zu einer Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur führen. Die LAR beginnt nach 6 bis 12 Stunden. Sie wird über die Aktivierung des Atemwegsendothels vermittelt, die zur Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten in das Lungengewebe führt. Die eosinophilen Granulozyten sezernieren ihrerseits eine Reihe von Mediatoren wie die eosinophilen-spezifischen Proteine (ECP, MBP, END), verschiedene Zytokine und setzen Lipidmediatoren frei. Diese Entzündungsprozesse bewirken eine Reihe physiologischer Veränderungen der Lunge und können die Ausbildung von Ödemen der Atemwegsmukosa einleiten [Wills-Karp M 1999].

Die Chronifizierung der inflammatorischen Prozesse als Ursache und Manifestation der pathologischen Veränderung beim Asthma, wird allgemein anerkannt.

Die Heterogenität des Krankheitsbildes spiegelt sich in der Vielzahl an Faktoren wider, die in unterschiedlicher Ausprägung an der Pathogenese beteiligt sind und sich gegenseitig beeinflussen. Diese Faktoren lassen sich grob in 4 funktionale Kompartimente einteilen:

1. Genetische Prädisposition und Umweltfaktoren
2. eine Th-2 dominierte Entzündungsreaktion.
3. veränderte Funktionen der Atemmuskulatur
4. Neuronale Interaktionen

3.1.1. Genetik

Die Ausbildung des Asthma bronchiale und ihr Schweregrad werden in Zusammenhang mit einer genetischen Prädisposition gesehen. Ein genetischer Polymorphismus für den IL-4-, IL-10 und den IL-13 Rezeptor sowie für den β -2-Adenorezeptor und der Myosinlightchain-Kinase wurden beschrieben und mit einer Prädisposition für die Ausbildung des Asthma bronchiale in Verbindung gebracht [Hakonarson H and Wjst M 2001, Hang LW 2003, Howard T D 2002, Wjst M and Dold S 1999, Wjst M 2002].

3.1.2. Th-1/Th-2 Gleichgewicht

Das Asthma bronchiale ist in 70% aller Erkrankungsfälle mit einer Allergie assoziiert. Allergien zeigen v.a. in den westlichen Industrieländern eine steigende Inzidenz und Prävalenz. Eine Erklärung für diese Beobachtung bietet die so genannte „Hygiene Hypothese“. Diese stützt sich auf die Erkenntnis, dass Th1-vermittelte Immunantworten wie Infektionen die Ausbildung von Th2-vermittelten Immunantworten wie Allergien unterdrücken [Mattes J and Karmaus W 1999].

B- und T-Lymphozyten sind antigenspezifische Zellen des Immunsystems mit variablen Effektorfunktionen, die auf die Natur des Antigens abgestimmt sind. Die Identifizierung eines Antigens durch antigenpräsentierende Zellen (APZ) erfolgt über so genannte „Pathogen associated pattern“ also bestimmte spezifische Strukturen des Pathogens wie sie unter anderem von Toll-like Rezeptoren (TLR) erkannt werden. Antigenkontakt und -verarbeitung aktivieren Makrophagen und Dendritische Zellen in einem bestimmten Muster, dass letztendlich Lymphozyten instruiert, welche Zytokine zu sezernieren sind und welcher Immuglobulin-Isotyp zu produzieren ist. Im Wesentlichen lassen sich hierbei eine Th1-Immunreaktion, die gegen extra- wie intrazelluläre Mikroorganismen gerichtet ist und eine Th-2 Immunreaktion, die effektiv in der Bekämpfung von Heminthen und Arthropden ist, unterscheiden [Abbas A K 1996, Locksley RM 1994, Yamashita N 1997].

Die T-Zell Population neugeborener Kinder besteht zunächst fast ausschließlich aus Th2-Zellen [Holt PG 1998]. Aus diesem einseitigen T-Zell Spektrum entwickelt sich während der ersten Lebensjahre u.a. durch die Auseinandersetzung mit Pathogenen wie *M. tuberculosis*, Masern- oder Hepatitis-A Viren, die eine Th1 Antwort induzieren, ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Th1- und Th2-Zellen [Hopkin JM 1997, Matricardi P 1997, Shaheen SO 1996]. Die Hygienehypothese besagt, dass Kinder in Ländern mit hohem hygienischem Standard einem geringeren Infektionsrisiko ausgesetzt sind und sich infolgedessen ihr „Th2-lastiges“ T-Zell Repertoire nicht in Richtung der Th1-Zellen verschiebt. Auf der anderen Seite weiß man, dass bestimmte Antigene präferentiell eine Th2-Antwort induzieren und somit als Allergen wirken. Die meisten charakterisierten Säugetierallergene sind ligandbindende Proteine (Lipokaline oder Calycine) Diese Proteine weisen eine charakteristische Lipokalininfaltung auf, die kleine hydrophobe Moleküle wie Pheromone, Steroide und Retenoide binden können [Aalberse RC 2000, Pomes A 2002]. Einige andere bedeutende Allergene besitzen enzymatische Aktivität, wie das Hauptallergen der Hausstaubmilbe Der P1. Diese Allergene können bestimmte Rezeptoren wie CD25, die 55kDa Untereinheit des IL-2 Rezeptors, spalten und die Zytokinregulation von T-Lymphozyten beeinflussen [Schulz O 1998, Wierenga EA 1991]. Im normal gesunden Individuum lösen Der P1 und andere enzymatisch aktive Allergene jedoch keine Th2 Immunreaktion hervor, sodass neben der Natur der Allergene noch andere Faktoren eine Atopie beeinflussen müssen.

Entscheidend für die Ausbildung einer allergischen Entzündungsreaktion ist die Entwicklung von Th2-Lymphozyten. Die Entwicklung eines antigenspezifischen Th2-Lymphozyten aus einem naiven Th0-Lymphozyten hängt sowohl vom lokalen Zytokinmilieu, als von einer Vorprägung „Priming“ des Lymphozyten und der akzessorischen, antigenpräsentierenden Zelle ab. Ein aktivierter Th2-Lymphozyt produziert große Mengen an IL-4, das seinerseits die Entwicklung naiver T-Lymphozyten in Richtung Th2 fördert (Amplifikationsmechanismus) und gleichzeitig die Entwicklung in Th1-Lymphozyten unterdrückt. Bisher nicht eindeutig geklärt ist das Initiierungssignal, dass diese Polarisierung in Gang setzt.

Dendritische Zellen sind die effektiven antigenpräsentierenden Zellen der Lunge. Sie nehmen inhalierte Antigene auf, prozessieren sie und präsentieren die Proteinfragmente über MHC II Moleküle naiven T- Lymphozyten [Lambrecht BN 1998]. Untersuchungen an Mäusen deuten darauf hin, dass bereits während der Reifung der Dendritischen Zelle eine Prägung in Richtung ihrer Fähigkeit, eine Th1 oder Th2 Immunantwort zu induzieren, stattfindet, die unanhängig von einem Th1- oder Th2 favorisierendem Zytokinmilieu ist [Masten BJ 200, Cunningham AF 2002]. Ein weiterer kritischer Faktor bei der Reifung der Dendritischen Zelle könnte das IL-12 darstellen. Bei Asthmatikern konnte eine verringerte IL-12 Produktion sowohl in der Lunge als auch systemisch nachgewiesen werden [Naseer T 1997, van der Pouw Kraan TC 1997]. IL-12 wird von Makrophagen, Dendritischen Zellen und

auch von Neutrophilen und Keratinozyten produziert und wurde als maßgeblicher Mediator einer Th1-Polarisation und somit der Th2-Hemmung identifiziert [Wills-Karp M 2001].

Für die Aktivierung eines T-Lymphozyten durch die Dendritische Zelle sind neben der TCR-MHCII-Bindung Ko-Stimulatorische Signale von Bedeutung. Vermittelt werden sie über Korezeptor-Interaktionen zwischen B7-CD28 und CD40-CD40L. Diese Korezeptoren wurden hinsichtlich ihrer Effekte auf die Differenzierung von T-Lymphozyten untersucht. Innerhalb des B7-CD28 Systems wurde der CD86/B7-2 –Komplex mit einer Th2-Entwicklung assoziiert [Rulifson IC 1997, Freeman GJ 1995], während CD80/B7-1 –Komplexe ein neutrales Differenzierungssignal vermitteln [Xu H 1997, De Smedt T 1997]. Andere kostimulatorische Moleküle, die auf T-Lymphozyten gefunden wurden sind das ICOS, eine CD28 –verwandtes Molekül, das möglicherweise zu einer Th2-Entwicklung beitragen kann [Hutloff A 1999, Watts TH 1999]; und 2 Vertreter aus der TNF-Superfamilie, OX40 und 4-1BB, die in der Th1/Th2-Entwicklung involviert zu sein scheinen [Ohshima Y 1998, Lane PJ 1999].

Th1 und Th2 Phänotypen

	Th1 Phänotyp	Th2 Phänotyp
Zytokine	IFN γ , TNF β , IL-2	IL-4, IL-5, IL-6, IL-10*, IL-13
Rezeptoren	IL-12R β 1 und β 2 IFN γ α - - CXCR3, CCR5	IL-12R β 1 IFN γ R α und β IL-1R ST2L/T1 CXCR4, CCR3, CCR4, CCR7, CCR8

Tabelle 1: Übersicht der Zytokine und Rezeptoren von Th1- und Th2 –Zellen. (*: IL-10 wird oft als Th-2 Zytokin bei der Maus klassifiziert. Humane Th1 und Th2 Subtypen können beide IL-10 produzieren.)

3.1.3. Th2-Lymphozyten im Asthma bronchiale

Th2-Lymphozyten sind entscheidend an der Ausbildung einer IgE-dominierten Sekundärantwort und der Entwicklung einer Atemwegseosinophilie beteiligt. Eine Expansion von CD4+ und z.T. auch von CD8+ T-Lymphozyten vom Th2-Typ ist bei Asthmatikern mit der Erkrankung korreliert [Pala P 2002]. Kennzeichnend für die immunregulatorische Funktion der Th2-Zellen ist die Sezernierung von Zytokinen wie IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 und GM-CSF. Dieses Zytokinprofil induziert eine IgE dominierte Immunreaktion und fördert die Entwicklung von eosinophilen Granulozyten die als die maßgeblichen Effektorzellen in der

Pathogenese des Asthma bronchiale angesehen werden. Darüber hinaus kommt den Th2-Lymphozyten eine besondere Stellung in der Pathophysiologie des Asthma bronchiale im Hinblick auf die AHR zu. Konkrete Hinweise hierzu wurden in Mausmodellen erarbeitet, in denen die Ausbildung einer AHR durch Depletion von CD4⁺ T-Lymphozyten vor der Allergenprovokation verhindert wurde [Gavett SH 1994]. Darüber hinaus induziert allein der adoptive Transfer von *ex-vivo* stimulierten T-Lymphozyten eine Atemwegshyperreagibilität in T-Lymphozyt-defizienten Mäusen [Wise JT 1999, Corry DB 1998].

3.1.4. Immunglobulin E (IgE)

Die primäre Immunreaktion gegen Antigene mündet in der Produktion von Immunglobulinen, überwiegend vom Typ IgM und teilweise vom Typ IgG. Außerdem werden Gedächtnis-B-Lymphozyten generiert. Der erneute Kontakt mit dem Antigen induziert die sekundäre Immunantwort, gekennzeichnet durch eine Affinitätsreifung und einem Isotypenwechsel der schweren Immunglobulinkette zu IgA, IgE oder IgG (mit entsprechenden Subtypen). Der Isotypenwechsel in dem konstanten Bereich der schweren Immunglobulinkette ist abhängig vom direkten T-Zellkontakt über B7-1(CD80)-CD28 und CD40-CD40L (STAT-6, NF- κ B, und B-Lymphozyten-spezifisches Aktivator Protein (BSAP) neben anderen) und wird vom Zytokinmuster der T-Lymphozyten bestimmt. IFN γ induziert die Synthese von IgG1 und IgG3 (Maus: IgG2a) während das Vorhandensein von IL-4 zur Expression und Sezernierung von IgE und IgG4 (Maus IgG1) führt. IgG4 Antikörper können kein Komplement binden, sind funktionell monovalent und binden schwach an Fc Rezeptoren. Eine Antigenbindung durch IgG4 hat im Gegensatz zu IgE daher kaum schädliche Konsequenzen [Aalberse RC 1983, van der Zee JS 1986].

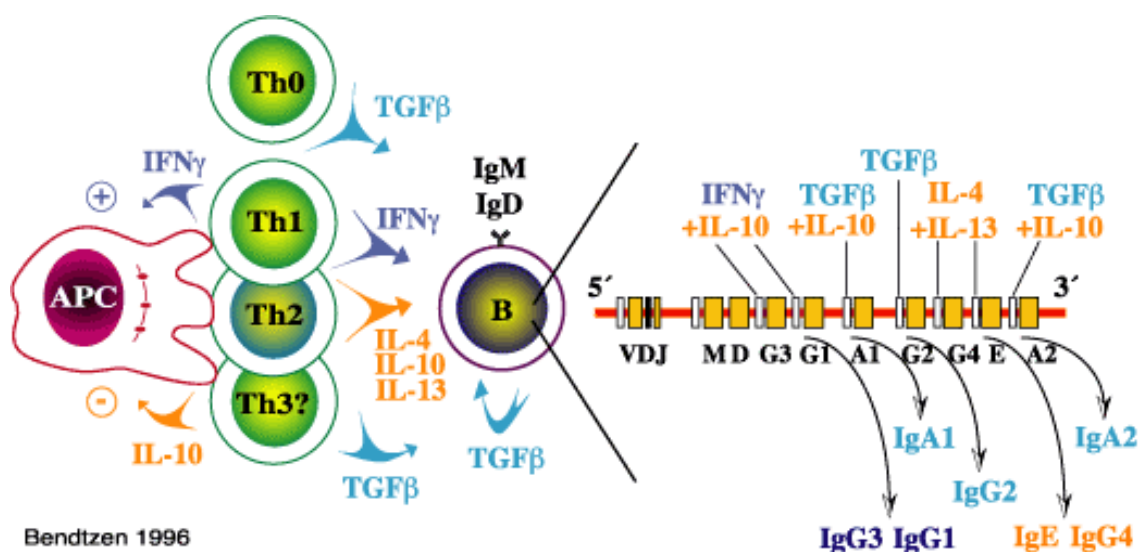


Abb. 1: Schematische Darstellung der Regulation des Isotypenwechsels der schweren Immunglobulinkette in B-Lymphozyten.

Die IgG1 und IgG3 vermittelten Effektorfunktionen beinhalten Opsonierung, Neutralisierung, Komplementaktivierung und Antikörper-abhängige zellvermittelte Zelltoxizität (ADCC). Die Wirkung von IgE ist beschränkt auf seine über Fc ϵ Rezeptoren vermittelten Funktionen. Fc ϵ Rezeptoren existieren in 2 primären Typen, einem hochaffinen Fc ϵ RI, der vornehmlich von Mastzellen und Basophilen exprimiert wird und einem niedrigaffinen Fc ϵ RII, der in 2 Subtypen Fc ϵ RIIa und Fc ϵ RIIb (CD23) vorkommt und auf APZ, Eosinophilen und Lymphozyten exprimiert wird. Die Bindung von CD23 auf B-Lymphozyten ist ein negativer Feedback-Mechanismus der IgE-Synthese. Über die Funktionen des Fc ϵ RII in anderen Zelltypen ist wenig bekannt. Für Eosinophile ist eine Steigerung der Migrationsfähigkeit über die verstärkte Expression von LFA-1 (late function antigen-1) und Mac-1 (CD18/CD11B) beschrieben [Lanero S 2000].

Die IgE vermittelte Mastzellfunktion über Fc ϵ RI ist die allergische Sofortreaktion. Beim Menschen ist die allergische Frühphase-Reaktion der Lunge von IgE und Mastzellen abhängig. In der Maus ist die IgE-abhängige Mastzellfunktion für die Ausbildung einer EAR allerdings in Frage gestellt [Crosby JR 2002]. In beiden Spezies ist unklar welche Rolle das IgE bei der Ausbildung und Chronifizierung der allergischen Entzündung und der AHR einnimmt. Anti-IgE Therapien zeigen in klinischen Studien kaum Einfluss auf die Entzündung und AHR. IgE- sowie Mastzell-defiziente Mäuse können eine Atemwegseosinophilie und AHR entwickeln [Fahy JV 1997, Takeda K 1997, Mayr SI 2002]. Serum IgE Spiegel sind bei Asthmatikern jedoch mit dem Schweregrad der Erkrankung assoziiert und Tierexperimente zeigen deutlich, dass IgE-abhängige Prozesse die allergische Entzündung triggern und die AHR verstärken [Siroux V 2003, Lanero S 2000, Mayr SI 2002, Maezawa Y 2004].

3.1.5. Interleukin-4

Interleukin-4 ist ein variabel glykolisiertes 15 kDa Protein mit mehreren Disulfidbrücken, die für seine biologische Aktivität entscheidend sind. Insgesamt ist seine molekulare Struktur ähnlich der von Wachstumsfaktoren wie z.B. GM-CSF. Erstmals beschrieben wurde IL-4 1982 als ein Kofaktor für die Proliferation von ruhenden B-Lymphozyten [Maizel A 1982]. Sein Wirkungsspektrum ist jedoch sehr viel größer. IL-4 wirkt auch als Wachstumsfaktor für T-Lymphozyten und Mastzellen. Es induziert und verstärkt die Expression von MHCII und CD23 auf B-Lymphozyten, seines eigenen Rezeptors auf T-Lymphozyten und von VCAM-1 auf Endothelzellen. IL-4 wird von CD4⁺ Th2 Lymphozyten und einigen T-Zell-Subtypen wie CD8⁺, NK1⁺ und $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten nach Antigenaktivierung produziert [Le Gros G 1990, Chen H 1997, Uzonna JE 1998]. Daneben sind Mastzellen, basophile und eosinophile

Granulozyten sowie Makrophagen in der Lage IL-4 zu produzieren [Okayama Y 1995, Schroeder JT 2001, Moqbel R 1995, Buttner C 1997].

Der IL-4 Rezeptor wird von einer Vielzahl myeloider und nicht-myeloider Zellen exprimiert. Der IL-4 Rezeptor ist ein Heterodimer, bestehend aus einer IL-4R α –Kette und einer zweiten Untereinheit, die entweder die γ c Untereinheit (ebenso Teil des IL-2, -7, -9, und-15 Rezeptors) oder die IL-13R α Kette darstellt [Nelms K 1999].

Die Bedeutung von IL-4 in der Pathogenese des Asthma bronchiale liegt in der Entwicklung und Expansion von Th2-Lymphozyten und der Förderung der eosinophilen Entzündung über die verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen. Darüber hinaus ist IL-4 über die Stimulation von muskusproduzierenden Zellen und Fibroblasten an der Ausbildung lungenphysiologischer Veränderungen direkt beteiligt [Dabbagh K 1999, Doucet C 1998]. Für die Ausbildung einer IgE dominierten B-Zell-Antwort im Tiermodell scheint IL-4 nicht essentiell zu sein [Emson CL 1998, Morawetz RA 1996].

Möglicherweise werden diese durch IL-13 komplementiert. Beim Asthmatiker sind erhöhte Serum IgE Konzentration jedoch mit IL-4 korreliert [Kimura M 2000]. Eine Redundanz für die Funktion zum IgE-Isotypenwechsel durch Interleukin-13 ist bekannt, aber ihre Bedeutung beim Asthma unklar.

Sowohl für IL-4 als auch IL-4Ra sind Polymorphismen beschrieben und stehen im Zusammenhang mit dem Schweregrad des Asthma bronchiale [Sandford AJ 2000].

3.1.6. Interleukin-13

IL-13 ist eng verwandt mit IL-4. Es zeigt überlappende biologische Funktionen mit IL-4 und beide Gene sind beim Menschen auf dem Chromosom 5q lokalisiert. IL-13 wird von Th0, Th1, Th2 sowie CD8-positiven Lymphozyten produziert. Das entsprechende Maus-Homolog ist beschrieben als P600. IL-13 hat multiple Effekte auf die Differenzierung und Funktion von Monozyten/Makrophagen. Es hemmt z.B. die zytotoxischen Funktionen von Monozyten/Makrophagen sowie die Produktion von Proinflammatorischen Zytokinen und erhöht die Expression von IL-1Ra [Grunig G 1998, Wills-Karp M 1998].

Die teilweise identischen Funktionen von IL-13 und IL-4 basieren auf der Verwendung gemeinsamer intrazellulärer Signalketten. Sowohl der IL-13 als der IL-4 Rezeptor verwenden die α -Kette des IL-4 Rezeptors für die Signaltransduktion, was zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT-6 führt. Der IL-13 Rezeptorkomplex ist komplex. Die IL-4R α Domäne spielt eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion, obwohl sie eine geringe Affinität zu IL-13 aufweist. Die gemeinsame γ -Kette spielt ebenfalls eine Rolle im IL-13R Komplex. Sie hat keine Affinität zu IL-13, ist aber wahrscheinlich an der Signaltransduktion beteiligt.

Darüber hinaus existieren zwei Rezeptorproteine IL-13R α 1 und IL-13R α 2, die mit der γ - und der IL-4R α Untereinheit im Wesentlichen vier verschiedenen Komplexe formen können (siehe Tabelle 2).

IL-13 Rezeptor Komplex

IL-13R Komplex	Beispiel	Ligandbindungseigenschaften	
		IL-4	IL-13
IL-13R α 1, IL-13R α 2	RCC und U251	keine Konkurrenz mit IL-13	Konkurrenz mit IL-4
IL-13R α 1, IL-4R α	Cos-7, A431 und Colo201	Konkurrenz mit IL-13	hochaffin: Konkurrenz mit IL-4
IL-13R α 1, IL-4R α , γ -Kette	TF-1	Konkurrenz mit IL-13	Konkurrenz mit IL-4
IL-13R α 1 (niedrig), IL-4R α , γ -Kette	Raji, MLA-144	bindet an alle Ketten	limitierte Bindung: Konkurrenz mit IL-4

Tabelle 2: Assoziationen der verschiedenen Untereinheiten des IL-13 Rezeptorkomplexes mit ihren unterschiedlichen Ligandbindungseigenschaften in den jeweiligen untersuchten Zelltypen. [Obiri NI 1997, Obiri NI 1995, Zurawski SM 1993 Zurawski SM 1995]

Wie IL-4 induziert IL-13 die CD23 Expression in B-Lymphozyten und Isotypenwechsel zu IgE. Die Funktionen von IL-13 und IL-4 im allergischen Asthma sind allerdings nicht redundant. Während die IL-4 Blockade in der Sensibilierungsphase im Tiermodell die Ausbildung eines asthmatischen Phänotyps verhindert, zeigt sie keinen Einfluss auf die AHR und Eosinophilie während der Effektorphase [Kurup VP 2001]. Im Gegensatz dazu verhindert die Blockade von IL-13 während der Effektorphase die Ausbildung einer AHR, zeigt aber kaum Einfluss auf die Eosinophilie der Lunge. Darüber hinaus kann allein die Applikation von IL-13 in die Lunge eine AHR auslösen [Wills-Karp M 2003, Wills-Karp M 1998]. Dabei kommt es auch zu einer geringen und zeitlich begrenzten Einwanderung von Eosinophilen in die Lunge, die vermutlich über die Induktion der Chemokinsynthese in Endothelzellen ausgelöst wird [Goebeler M 1997, Moore PE 2002].

3.1.7. Interleukin-5

Während die Rolle der Eosinophilen in Entzündungsprozessen schon seit längerem bekannt ist, wurden die löslichen Mediatoren, die die Verfügbarkeit und die Funktion der eosinophilen Granulozyten steuern, erst in neuerer Zeit identifiziert. IL-5 zusammen mit Eotaxin sind die zentralen Mediatoren für die Koordination der eosinophilen Entzündung [Mattes J 2003].

IL-5 wird als 115 Aminosäure-langes Protein synthetisiert, das als hochglykolisiertes 22 kDa Monomer ein über Disulfidbrücken verbundenes 40 – 50 kDa Homodimer formt. Der hohe Grad der Glykolisierung ist für die biologische Aktivität unerheblich. Die Bildung eines Homodimers aber für seine Funktionalität entscheidend.

IL-5 wird primär von T-Lymphozyten sezerniert, aber auch von Eosinophilen, Mastzellen und IL-1 β aktivierten Endothelzellen produziert.

Der IL-5 Rezeptor besteht aus einer ligandspezifischen α -Untereinheit und einer signaltransduzierenden β -Kette, die es mit den Rezeptoren für IL-3 und GM-CSF gemein hat. Die humane IL-5Ra (CD125) Untereinheit ist ein 60 kDa großes Transmembranglykoprotein, das IL-5 mit relativ geringer Affinität bindet. Die IL-5 Bindung an den murinen IL-5R α ist sehr viel stärker. (Kd hum 600-200 pM vs. Kd mm 2-10 nM) [Takaki S 1994],

IL-5 ist ein selektiver Wachstums- und Differenzierungsfaktor für eosinophile Granulozyten. IL-5 Blockade oder Gendefizienz verhindern im Tiermodell eine Eosinophilie [039]. In klinischen Studien mit monoklonalen Antikörpern gegen IL-5 konnten Eosinophile in Blut und Sputum nach Allergenprovokation in Asthmatikern reduziert werden. Die Behandlung zeigte jedoch keinen oder nur moderaten Effekt auf die Atemwegsreaktivität, je nach Schweregrad des Asthma [Leckie MJ 2000, Flood-Page PT 2003].

3.1.8. Interleukin-6

IL-6 ist ein 26 kDa großes Zytokin, das von mononukleären Phagozyten, Gefäßendothelzellen, Fibroblasten und verschiedenen anderen Zelltypen hauptsächlich als Antwort auf IL-1 β oder TNF- α synthetisiert wird. Darüber hinaus wird es auch von aktivierten Th2-Lymphozyten und Mastzellen sezerniert. Die funktionelle Form von IL-6 ist wahrscheinlich ein Homodimer. IL-6 wirkt auf Hepatozyten und induziert unter Beteiligung von IL-1 die Produktion von Akut-Phasen-Proteinen, wie das Fibrinogen, das C-reaktive Protein und das mannosebindende Protein.

IL-6 wirkt als Differenzierungs- und Wachstumsfaktor für hämatopoetische Vorläuferzellen, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Keratinozyten, Fibroblasten, Neurone, Osteoklasten und Endothelzellen [Peters M 1996].

Der IL-6 Rezeptor besteht aus einem 60 kDa-Bindungsprotein und einer 130 kDa-Untereinheit (gp130), die das Signal weiterleitet. Beide Untereinheiten kommen als lösliche Formen vor und die Eigenschaft des gp130 sich in die Plasmamembran funktionell einlagern zu können, bedingt, dass weitaus mehr Zelltypen auf IL-6 reagieren als eine Expression seines Rezeptor aufweisen.

Die Bedeutung von IL-6 im Asthma bronchiale ist wenig untersucht, obwohl es in vielerlei Hinsicht an den pathologischen Prozessen beteiligt ist. Es wirkt proinflammatorisch, ist

Wachstumsfaktor für T- und B-Lymphozyten und unterstützt die Antikörpersekretion. Besondere Bedeutung als Mediator von Reparaturprozessen und als Wachstumsfaktor für Fibroblasten kommt IL-6 in der Ausbildung des Airwayremodeling zu [Knight D 2001]. Beschrieben ist auch eine durch IL-6 von APZ induzierte Stimulation der IL-4- und IL-4R-Expression in naiven T-Lymphozyten, die somit Einfluss auf die TH1/Th2-Polarisation der Immunantwort nehmen kann [Heijink ICH 2002].

3.1.9. Eotaxin

Das humane Eotaxin ist ein 8,4 kDa großes Protein, das von einer Reihe von Zellen sezerniert wird. Hierzu zählen Epithelzellen, Endothelzellen, Makrophagen, Fibroblasten und glatte Muskelzellen [Cuvelier SL 2001, Jose PJ 1994]. Es wird angenommen, dass Eotaxin als Monomer aktiv ist, aber Dimere und Trimere wurden ebenfalls identifiziert [Garcia-Zepeda EA 1996]. Das Molekül besitzt keine N-Glykolisierungen, aber eine O-Glykolisierung wird angenommen [Jose PJ 1994]. Basierend auf der Homologie zu den Monozyten chemotaktischen Proteinen (MCPs) wird Eotaxin in die stetig expandierende β - oder C-C-Chemokin-Unterfamilie eingeordnet. Weitere Vertreter dieser Gruppe sind MIP-1 α (macrophage inflammatory protein 1 α), MIP-1 β , MIP-1 γ , MIP-3 α , MIP-3 β , MIP-4, MIP-5, LD78 β (CCL3L1), SIS ϵ (p500), TARC (thymus and activation-regulated chemokine), RANTES (regulated on activation normally T-cell expressed and secreted (CCL5)), Eotaxin (CCL11), I-309 (CCL1), die humanen Proteine HCC-1 (NCC-2, CCL14) sowie das Mausprotein C10.

Eotaxin zeigt zu seinen verwandten Chemokinen eine relativ geringe Aminosäuresequenz-Homologie, 60 bis 64% zu den MCPs und nur 33 bis 37% zu RANTES. Auch im Vergleich zu anderen Spezies ist die Aminosäuresequenz des humanen Eotaxins nur zu 60% mit denen von Maus und Meerschweinchen identisch. Von Eotaxin sind 3 verschiedene Formen bekannt: Eotaxin-1 (CCL11), Eotaxin-2 (CCL24) und Eotaxin-3 (CCL26); für letzteres wurde bisher kein murines Homolog gefunden. Sie unterscheiden sich in ihrem Expressionsprofil, ihrer Zellspezifität und Effektorikinetik, was verschiedene biologische Funktionen vermuten lässt [Dulkys Y 2001].

Den Eotaxinen kommt in Bezug auf ihre Rezeptorspezifität eine besondere Stellung zu, so wurde ihnen ursprünglich eine exklusive Affinität für den des CCR3 zugesprochen [Wells TN 1999]. Neueste Untersuchungen ergaben auch eine Affinität von Eotaxin zum CCR5 und zum CCR2 [Murphy PM 2002, Ogilvie P 2001]. Auch die Expression des CCR3 wurde ursprünglich für eosinophilen-spezifisch gehalten. Kürzlich konnte er aber auch auf basophilen Granulozyten, Epithelzellen, Untergruppen von Th2-Lymphozyten und neuralen Geweben nachgewiesen werden [Humbles AA 2002]. Der CCR3 ist der einzige Chemokinrezeptor, den gereifte Mastzellen beibehalten [Kaplan AP 2001]. Zwar bindet

Eotaxin an den CCR3, der Rezeptor selbst hingegen zeigt Spezifitäten für eine Reihe anderer CC-Chemokine wie vor allem RANTES, MCP-3 und MCP-4 [Ugucioni M 1996]. Die Transkription der Eotaxingene wird durch TNF- α und IL-4 angeregt und wird über STAT6 vermittelt [Tomkinson A 2001].

Die biologische Funktion von Eotaxin ist die Steuerung der Aktivierung und Migration der eosinophilen Granulozyten. Der Eotaxinlevel ist bei Asthmatikern nachweislich erhöht und wird mit der Beeinträchtigung der Lungenfunktionen in Zusammenhang gebracht [Pease JE 2001]. Eotaxin induziert die intrazelluläre Aktinpolymerisation und die Produktion von Sauerstoffradikalen in eosinophilen Granulozyten und stimuliert die IL-4 -Sekretion [Bandeira-Melo C 2001]. Versuche an CCR3-defizienten Mäusen zeigen, dass im OVA-Modell eine Bluteosinophilie ausgeprägt bleibt, die Eosinophilen aber im subendothelialen Raum der Lungengefäße akkumulieren und die Einwanderung ins Lungengewebe unterdrückt ist [Humbles AA 2002].

3.1.10. Eosinophile Granulozyten und ihre Mediatoren

Paul Ehrlich prägte 1879 erstmals den Begriff des eosinophilen Granulozyten, als er erkannte, dass sich die Granula bestimmter weißer Blutkörperchen durch eine besonders hohe Affinität zu dem sauren Farbstoff Eosin auszeichnen und sich die Zellen auf diese Weise charakteristisch anfärben lassen [Ehrlich P 1879]. Die endgültige Ausreifung der eosinophilen Vorläuferzelle zum nicht mehr teilungsfähigen eosinophilen Granulozyten sowie seine Freisetzung in den Blutstrom findet unter dem maßgeblichen Einfluss von IL-5 statt [Clutterbuck EJ 1989].

Die spezifischen oder auch sekundären Granula der eosinophilen Granulozyten werden während des Reifungsprozesses der Zellen zuerst im Stadium des Myelozyten sichtbar und zeichnen sich durch einen kristalloiden Kern, umgeben von einer weniger elektronendichten Matrix, aus [Hardin JH 1970]. Der Kern setzt sich aus Major Basic Protein (MBP) zusammen, während in der Matrix die drei anderen basischen Granulaproteine, Eosinophiles Kationisches Protein (ECP), Eosinophile Peroxidase (EPO) und Eosinophil-Derived Neurotoxin (EDN oder EPX), enthalten sind [Egesten A 1986]. Kleine Granula wurden ausschließlich in humanen Gewebe-Eosinophilen identifiziert und enthalten Enzyme wie Arylsulfatase B, saure Phosphatase [Parmley RT 1974] und Katalase [Iozzo RV 1982]. Eine dritte Gruppe der Granula-Population sind die Lipidkörperchen. Sie dienen als Hauptspeicher für Arachidonsäure in Form von Glycerophospholipid-Estern, und enthalten außerdem die Enzyme Cyclooxygenase und 5-Lipoxygenase [Dvorak AM 1994, Weller PF 1985, Weller PF 1991, Weller PF 1994].

Für die Aktivierung und Degranulation eosinophiler Granulozyten sind die Zytokine IL-3, IL-5 und GM-CSF von Bedeutung [307]. Des Weiteren zählen zu den Stimuli eosinophiler Granulozyten die Komplement-Faktoren C5a und C3a sowie die Chemokine PAF und Eotaxin [Elsner J 1994, Zeck-Kapp G 1995].

Die physiologische Funktion der eosinophilen Granulozyten besteht primär in der Wirtsabwehr von Heminthen. Diese sind gegen eine Lyse durch Neutrophile u. Monozyten/Makrophagen relativ resistent, wohingegen v.a. das basische Hauptprotein MBP der eosinophilen Granulozyten sehr wirksam ist. Die Mediatoren der sekundären Granula MBP, ECP und EPX wirken nicht nur speziell toxisch auf Parasiten, sondern schädigen auch das Wirtsgewebe. Außerdem wirken sie als Neurotoxine und können die Histaminausschüttung aus Mastzellen stimulieren. Die sekundären Lipidmetabolite wie Leukotriene und Prostaglandine sowie die von aktivierten Eosinophilen sezernierten Zytokine IL-1a, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, IL-16, TGF- α , TGF- β , GM-CSF und TNF- α wirken v.a. proinflammatorisch [Moqbel R 1994].

Die Freisetzung von Mediatoren erfolgt erst nach vorangegangener Aktivierung des eosinophilen Granulozyten an seinen membranständigen Rezeptoren. Eosinophile exprimieren Oberflächenrezeptoren für Immunglobuline (Fc ϵ R, Fc α R, Fc γ R), Komplementfaktoren (C1q, C3a/C3b, C5a), Lipidmediatoren (PAF, LTB₄) Adhärenzfaktoren (Mac-1, LFA-1, VLA-4) sowie zahlreiche Rezeptoren für Zytokine und Chemokine (IL-2, IL-3, IL-5, GM-CSF, IFN γ , TNF, RANTES) [Nagase H 2001, Liu LY 2003]. Somit besitzen eosinophile Granulozyten eine Vielzahl von Möglichkeiten der Interaktion und spielen im Sinne einer proinflammatorischen und immunregulatorischen Effektorzelle eine bedeutende Rolle bei allergischen Reaktionen und chronisch entzündlichen Erkrankungen [Martin LB 1996, Elsner J 2001].

Die eosinophile Entzündung ist kennzeichnend sowohl für das atopische als auch das intrinsische Asthma bronchiale [Wardlaw AJ 1888]. Eine ausgeprägte Bluteosinophilie und die verstärkte Migration von eosinophilen Granulozyten in die Lunge ist kennzeichnend für die späte Phase der allergischen Antwort. Die Chronifizierung dieser Entzündung ist maßgeblich für die Umbauprozesse in der Lunge und die Beeinträchtigung der Lungenphysiologie verantwortlich.

Die Eosinophilen werden für die akute (reversible) Ausbildung der AHR verantwortlich gemacht. Ihre Granulaproteine wirken toxisch auf das Lungenepithel und können Neuropeptide inaktivieren und die Produktion von epithelialen Relaxationsfaktoren stören, die an der Regulation der Atmungsphysiologie beteiligt sind. Andere Mediatoren wie das MBP können auch direkt eine AHR induzieren [Broide DH 2001].

MBP bindet an den inhibitorischen M2-Autorezeptor der parasympathischen Nervenendigung und nimmt so Einfluss auf die Freisetzung des Neurotransmitters Acetylcholin.

Die Steigerung der Acetylcholinausschüttung führt zu einer verstärkten Reaktion auf einen nachfolgenden Reiz, also zu einer verstärkten Kontraktion der Atemmuskulatur.

Das Potential der Eosinophilen Mediatoren legt die Bedeutung der Eosinophilen in der Ausbildung einer AHR und Atemwegsobstruktion nahe. Nichts desto trotz sind im Tiermodell Eosinophilie und AHR nicht unbedingt gekoppelt [Corry DB 1998]. Die AHR ist ein Symptom von sehr heterogener Pathophysiologie (3.2.). Im definierten Tiermodell sind die zugrunde liegenden Mechanismen je nach Protokoll unterschiedlich gewichtet und daher nicht unbedingt vergleichbar zu beeinflussen [Whitehead GS 2003]. Beim atopischen Asthmatiker sind eosinophile Entzündung und AHR i.d.R. nicht voneinander zu trennen [Obase Y 2001].

3.1.11. Allergische Früh- und Spätreaktion der Lunge (EAR, LAR)

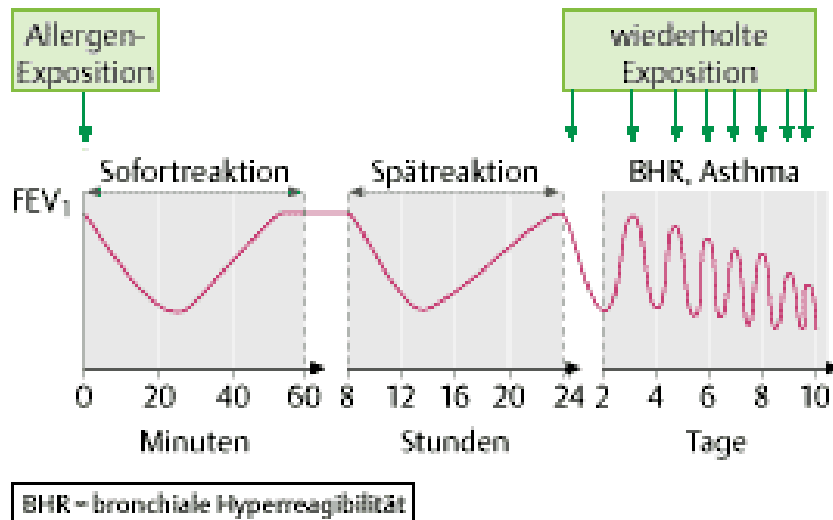
Die asthmatische Frühreaktion entwickelt sich innerhalb weniger Minuten nach Allergenexposition und ist klinisch durch eine ausgeprägte Verengung der Bronchien, die sich im Verlauf von 1 bis 2 Stunden wieder zurückbildet. Pathogenetisch liegt ihr v.a. die Aktivierung von Mastzellen über die klassische, Fc ϵ RI-IgE-vermittelte Immunreaktion vom Soforttyp zugrunde. Auf humoraler Ebene dominieren in den ersten Minuten nach Allergenexposition die Bildung und lokale Freisetzung von Mediatoren, zu denen v.a. Histamin, PGD₂, Leukotriene und PAF gehören. Diese Mediatoren erhöhen die vaskuläre Permeabilität, stimulieren die Mukusproduktion und Bronchokonstriktion, was insgesamt zur Beeinträchtigung der Lungenfunktion führt [Befus D 1987].

Neben Leukotrienen und Prostaglandinen produzieren aktivierte Mastzellen eine Reihe von Zytokinen wie IL-3, IL-4, IL-5, TNF α und GM-CSF, die Entzündungsprozesse ankurbeln und somit die Spätphasenreaktion einleiten [Pradaliere A 1993].

IL-3, IL-5, GM-CSF wirken auf die Bildung und Differenzierung von eosinophilen Granulozyten im Knochenmark und ihrer Auswanderung ins Blut [Mould AW 2000]. IL-4 und TNF α aktivieren Endothelzellen und induzieren die Expression von Adhäsionsmolekülen [316]. Aktivierte Mastzellen produzieren ebenfalls Chemokine wie MIP-1 α und MCP-1, die chemotaktisch auf Makrophagen, Monozyten und neutrophile Granulozyten wirken. Als Resultat der proinflammatorischen Mastzellaktivität wandern 1 bis 2 Stunden nach Allergenkontakt die ersten Granulozyten ins Lungengewebe. Nach 8 bis 12 Stunden ist diese eosinophile Entzündungsreaktion bei einigen Asthmatikern mit einem erneuten Abfall der Lungenfunktion assoziiert. Eosinophile Granulozyten setzen eine Reihe von Entzündungsmediatoren frei, die toxisch auf das Atemwegsepithel wirken, die Mukusproduktion stimulieren und zur Ödembildung führen. Eine begleitende Bronchokonstriktion wird vornehmlich über die Freisetzung von Cysteinyl-Leukotrienen

(LTC₄, LTD₄, and LTE₄) und ihre Bindung an ihre Rezeptoren CysLT1 und CysLT2 auf glatten Muskelzellen hervorgerufen.

Exogen-allergisches Asthma – Sofort- und Spätreaktion



Georg Thieme Verlag

Abb. 2: Zeitlicher Verlauf der asthmatischen Früh- und Spätreaktion, dargestellt als Änderungen in der Lungenfunktion über die FEV₁ [Georg Thieme Verlag]

3.2. Atemwegshyperreagibilität

Die Atemwegs-Reaktivität oder -Reagibilität (AR) ist definiert als der Grad, indem die Atemwege auf unspezifische Stimuli mit Konstriktion reagieren [Cockcroft DW 1990]. Eine normal ausgeprägte AR ist ein physiologischer Schutzmechanismus, der einerseits die Ventilation den derzeitigen Perfusionsverhältnissen anpasst und andererseits das Lungengewebe vor dem Eindringen toxischer Substanzen weitestgehend abschirmen soll [Blyth DI 2001]. Zur Bestimmung der AR bedient man sich der Messung der Lungenfunktion nach Provokation der Atemwege mit unspezifischen Stimuli [Cockcroft DW 1985, Cockcroft DW 2001]. Diese Stimulation kann vermittelt werden durch pharmakologische Irritantien wie Metacholin (MCh), Histamin, Serotonin, Bradykinin oder durch physikalische Reizung wie Anstrengung, Hyperventilation oder kalter Luft. Bei asthmatischen Patienten mit AHR ergeben sich hieraus steile Dosis-Wirkungs-Kurven im niedrigen Dosisbereich ohne Plateau-(Sättigungs-)Phase. Für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Lungenfunktionsmessung wird zumeist die effektive Dosis angegeben, die einen 20%-igen Abfall der FEV₁ relativ zum Basalwert provoziert.

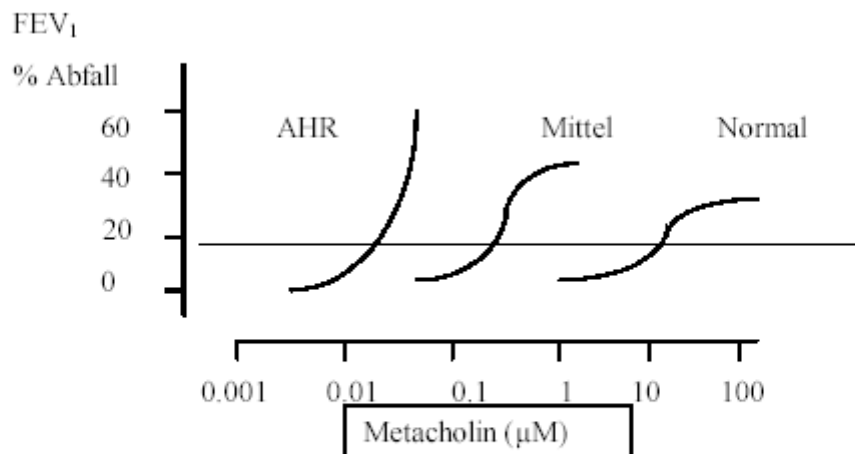


Abbildung 1.1.1: Dosis-Wirkungs-Kurve bei Vorliegen von AHR

Abb. 3: Dosis-Wirkungs-Kurven der Methacholinprovokation bei Gesunden und Asthmatikern. Eine AHR zeichnet sich durch eine Reaktion bereits bei sehr niedrigen Methacholindosen und das Fehlen der Ausbildung einer Sättigung aus.

3.2.1. Mechanismus der Atemwegshyperreaktivität

Der genaue Pathomechanismus der Entwicklung einer AHR ist unbekannt [Boulet LP 2003, Wills-Karp M 1999]. Mehrere mögliche Ursachen können jedoch in der Ausbildung einer AHR eine Rolle spielen und möglicherweise additiv wirken (Tabelle 3).

Ursache	Mechanismus
1. Muskuläre Abnormalität	Hypertrophie, Hyperplasie
2. Strukturelle Abnormalität	Atemwegs-Durchmesser Atemwegs-Wandstärke Atemwegs-Permeabilität
3. Neurologische Abnormalität	β-adrenerge Blockade α-adrenerge Übererregbarkeit Cholinerge Übererregbarkeit iNANC/ eNANC Ungleichgewicht
4. Atemwegs-Entzündung	Inflammation, Gewebsschädigung

Tabelle 3: Mechanismen der Atemwegshyperreagibilität

3.2.2.. Abnormalität der Atemwegs-Muskulatur

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die isolierte Atemwegsmuskulatur von Patienten mit Asthma bronchiale *in vitro* eine gesteigerte AR aufwies [de Jongste JC 1991]. Direkte Veränderungen des β 2-Adrenorezeptors, der Myosin-light-chain-Kinase sowie des M2-Rezeptors durch MBP sind im Zusammenhang mit Asthma beschrieben [Song P 1997, Bai TR 1990, ten Berge RE 1995, Coulson FR 2003]. Hypertrophie und Hyperplasie der Atemmuskulatur können ebenfalls die normale Kontraktilität der Bronchien stark beeinflussen [Glassberg MK 1994]. Darüber hinaus werden die kontraktilen Eigenschaften der glatten Muskelzellen von einer Vielzahl von Mediatoren reguliert, die in der asthmatischen Lunge in einem gestörten physiologischen Gleichgewicht stehen können. Glatte Muskelzellen produzieren ebenfalls eine Vielzahl von Mediatoren und nehmen somit aktiv am Entzündungsgeschehen teil [Hakonarson H 2003, Schmidt D 2000].

3.2.3. Strukturelle Abnormitäten

Die AHR zeichnet sich durch einen erhöhten Atemwegswiderstand aus. Es wäre möglich, dass die AHR auf einem verminderten Ausgangs-Durchmesser der (kleinen) Atemwege basiert [Benson MK 1975]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass beim Asthma bronchiale die Ausgangswerte für FEV₁ (proportional zum Widerstand) und Werte für PC₂₀ (Provokationskonzentration, die einen 20% Abfall der FEV₁ bewirkt) nach Histamin- oder MCh-Stimulation (proportional zur AR) nicht gut korrelierten, und dass bei asthmatischen Patienten mit milder oder moderater AHR die Atemwege keinen verkleinerten Durchmesser aufwiesen [Cockcroft DW 1990].

In morphometrischen Analysen der Atemwege von asthmatischen Patienten wurde eine erhöhte Zellularität und vermehrter Flüssigkeitsgehalt in den Wänden der Atemwege nachgewiesen. Diese erhöhte Dicke der Atemwegswand könnte als eigenständiger Faktor zur Erhöhung der AR beitragen [James AL 1989]. Ultrastrukturelle Analysen von Atemwegen asthmatischer Patienten ergaben, dass sog. "tight junctions", Zellverbindungen in endothelialen und epithelialen Barrieren, verlorengegangen waren. Dies könnte eine erhöhte Permeabilität der Atemwege und damit eine gesteigerte Bioverfügbarkeit der inhalierten Stimuli zur Folge haben [Hogg JC 1981]. Im Vergleich mit den Atemwegen von Rauchern wurde jedoch gefunden, dass letztere zwar deutlich erhöhte Permeabilität aber keine AHR aufweisen, während Asthmatiker AHR ohne Zeichen von Permeabilitätserhöhung (gemessen durch radioaktiv markierte Tracer) erkennen ließen. Das bedeutet, dass Permeabilitätserhöhungen der Atemwege bei Asthma bronchiale nicht die grundlegende

Ursache von AHR darstellen können, wohl aber eine Begleiterscheinung bei Atemwegs-Entzündung darstellen [Hargreave FE 1986].

3.2.4. Neurologische Abnormitäten

Die Kontraktion der glatten Muskulatur der Atemwege steht unter komplexer neuronaler Kontrolle. Viele der Stimuli, die zur Bestimmung der AR verwandt werden, setzen an den entsprechenden Nervenrezeptoren an. Das autonome Nervensystem kontrolliert durch β -adrenerge (sympathische) Hemmung und α -adrenerge sowie cholinerge (parasympathische) Exzitation den Kontraktionszustand der glatten Muskulatur. Ein Ungleichgewicht dieser autonomen Innervation mit vorherrschendem parasympathischem Tonus wurde für das Auftreten einer AHR verantwortlich gemacht.

Im Vergleich dazu ist die Bedeutung der α -adrenergen Exzitation der Atemwegs-Muskulatur als gering zu werten, wenn auch eine erhöhte Reaktivität auf α -adrenerge Stimulation bei Asthmatikern zu beobachten ist [Barnes PJ 1987]. Wesentlich wichtiger erscheint die cholinerge Kontrolle von Muskeltonus und Sekretion in den Atemwegen. Viele Stimuli der Bronchokonstriktion greifen direkt an der parasympathischen Innervation an, und Parasympatolytika wie Atropin blockieren zumindest teilweise die Bronchokonstriktion.

Es wurde vermutet, dass die erleichterte Erregbarkeit des afferenten Vagusnervs die Ursache der cholinergen Überreaktivität bei Asthmatikern darstellt, möglicherweise aufgrund inflammatorischer Irritation oder Schädigung. Da die Atemwege von Asthmatikern auch nach Stimulation mit nicht-cholinergen Substanzen wie Histamin überempfindlich reagieren, kann die cholinerge Überreaktivität das Auftreten von AHR jedoch nicht vollständig erklären [Barnes PJ 1992, Barnes PJ 1997]. In jüngerer Zeit ist ein noch nicht vollständig verstandener, zusätzlicher Teil des autonomen Nervensystems beschrieben worden, der nicht-adrenerge-nicht-cholinerge inhibitorische (NANCI) und exzitatorische (NANCIe) Fasern beinhaltet. Ein möglicherweise durch Entzündung hervorgerufener Defekt in diesem Abschnitt der neuronalen Kontrolle der Atemwegs-Muskulatur könnte Ursache einer gesteigerten cholinergen Innervation und eines erhöhten Muskeltonus sein [Barnes PJ 1997, Barnes PJ 1986, Braun A 2002].

3.2.5. Atemwegsentszündung und Atemwegshyperreaktivität

Einer der kardinalen Faktoren in der Pathogenese von Asthma bronchiale stellt die Inflammation der Atemwege dar. Erst im letzten Jahrzehnt hat sich das Verständnis der pathophysiologischen Befunde von Asthma Patienten dahingehend verändert, dass die Erkrankung als chronische Entzündung der Atemwege aufgefasst wurde.

Die allergische Atemwegsentzündung steht in Verbindung mit einer Reihe von pathophysiologischen Vorgängen, die funktionelle (AHR, Obstruktion) und später auch strukturelle Veränderungen nach sich ziehen [Hogg JC 1991].

Die Atemwegsentzündung spielt daher die wohl maßgebliche Rolle bei der Ausbildung von AHR durch Induktion von strukturellen, neurologischen und anderen funktionellen Veränderungen [Boulet LP 2003 Wills-Karp M 1999, Wardlaw AJ 2002]. Eine Zusammenfassung zeigt Tabelle 4.

Pathophysiologischer Vorgang	Strukturelle Folge
1. Freisetzung von Mediatoren	
1.1 Zellwand (Arachidonsäure-Derivate)	Zerstörung von Epithel und subepithelialen Strukturen
1.2 Plasma (Komplement, Kinine, Gerinnung)	
1.3 Gewebe (Nervenendigungen)	
2. Gefäßreaktion	
2.1 Zunahme des Blutstroms	Hyperämie
2.2 Exsudation	Ödem
3. Zelluläre Antwort	
3.1 Infiltration	Leukozytäres Infiltrat
3.2 Freisetzung inflammatorischer Mediatoren	Epitheliale Zerstörung
4. Reparatur	
4.1 Stimulation des Epithels	Goblet-Zell-Metaplasie
4.2 Stimulation des subepithelialen Bindegewebes	Basalmembran-Verdickung Muskuläre Hyperplasie

Tabelle 4: Pathologie der asthmatischen Atemwegsentzündung (nach Hamelmann 2002).

3.3. Therapien des Asthma bronchiale

Für die Behandlung von asthmatischen Erkrankungen werden derzeit vor allem Pharmazeutika verwendet, die Symptome eines asthmatischen Anfalls lindern. Hierzu zählen zum einen Bronchodilatoren wie Phosphodiesterasehemmer und β 2-Sympathomimetika. Für die Therapie bei schweren Formen werden überwiegend Kortikosteroide eingesetzt

Phosphodiesterasehemmer

Der Phosphodiesterasehemmer Theophyllin wurde bereits 1881 entdeckt und gehört heute mit zu den am häufigsten angewendeten Asthmamedikamenten [Somerville LL 2001]. Die Hemmung der Phosphodiesterase verhindert die Degradation von cAMP, das die Relaxation der glatten Muskelzellen vermittelt. Theophyllin wirkt somit über eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels bronchodilatatorisch [Hansen G 2000]. Ein weiterer Wirkungsmechanismus besteht in der antagonistischen Wirkung zu dem Bronchokonstriktor Adenosin. Theophyllin zeigt zudem auch antiinflammatorische Wirkung, v.a. in Verbindung mit Kortikosteroiden. Der Mechanismus ist bis heute ungeklärt, vermutet wird eine

unterstützende Funktion der Kortikosteroid-Wirkung auf die Histon Deacetylasen [Ito K 2002].

β-2-Sympathomimetika

Medikamente mit primärer bronchodilatatorischer Eigenschaft sind die β-2-Sympathomimetika, die β-adrenerge Rezeptoren der Atemmuskulatur stimulieren und somit deren Relaxation bewirken. Die β-adrenergen Bronchodilatoren stehen im Verdacht, die Hyperreagibilität der Bronchien zu erhöhen. Dieser Effekt ist allerdings nur von geringer klinischer Relevanz [Finotto S 2001].

Leukotrien-Rezeptorantagonisten

Effektive Inhibitoren der allergischen Früh- und Spätreaktion stellen Leukotrien-rezeptorantagonisten wie das Montelukast dar. Sie verdrängen die physiologischen Liganden des Cys-Leukotrien-1 Rezeptors LTC₄, LTD₄ und LTE₄, von denen v.a. LTD₄ ein sehr starker Bronchokonstriktor der Früh- und Spätreaktion ist. Leukotrien-Rezeptorantagonisten wirken auch antiinflammatorisch. Dieser Effekt ist z.T. über die Hemmung der chemotaktischen Eigenschaften der Leukotriene auf Granulozyten vermittelt. Ihre Bedeutung bei der Asthmatherapie ist in dieser Hinsicht aber umstritten [Corless JA 2002, Eum SY 2003].

Kortikosteroide

Eine kausale Therapie des allergischen Asthma bronchiale existiert derzeit lediglich durch die Gabe von Glucocorticoiden. Glucocorticoide wie z.B. Dexamethason gehören zur Stoffklasse der Steroide und werden allgemein zur antiinflammatorischen Therapie eingesetzt. Dexamethason ist effizient in der kausalen Allergietherapie, indem es vornehmlich die AP-1- und NFκb-abhängige Transkription vieler Chemokine und Zytokine der Th2-Immunreaktionen hemmt [Kaplan AP 2001]. Der genaue Wirkmechanismus ist nicht geklärt. Das lipophile Steroid bindet im Zytoplasma an seinen Rezeptor, transloziert in den Zellkern und kann dort mit Transkriptionsfaktoren interagieren. Vermutlich liegt die eigentliche Wirkung aber *downstream* auf der Ebene der Histon-Azylierung. Die Histon-Azylierung ist Voraussetzung für die Transkription, sie wird über Histon Deazetylasen (HDAC) reguliert deren Aktivität durch Corticosteroidrezeptorkomplexe stimuliert wird und somit die Azylierung der Histone verhindert [Barnes PJ 2003].

3.4. Tiermodelle des allergischen Asthma Bronchiale

Zur Klärung der pathophysiologischen Mechanismen im bronchialen Asthma kommen neben Ratten überwiegend in-vivo-Mausmodelle zum Einsatz [Braun A 1998, Neuhaus-Steinmetz U 2000, Hogaboam CM 2000], zur Entwicklung von neuen Asthmamedikamenten werden dagegen oft Ratten verwendet [Hoymann HG 1994]. Andere Tierarten, die in der Asthmaforschung Einsatz finden, sind das Meerschweinchen [Bautsch W 2000] - mit einer ausgeprägten bronchialen Reagibilität - und weitaus seltener Kaninchen, Affe und Beagle. In-vitro-Untersuchungen können an isoliert perfundierten Lungen [Martin C 2001], an isolierten Tracheen [Chen G 2001] und an Precision Cut Lung Slices (PCLS) [Martin C 1996, Wohlsen A 2001] durchgeführt werden.

Jedes Tiermodell hat dabei Vor- und Nachteile, die bei der Bearbeitung der spezifischen Fragestellungen abgewogen werden müssen. So bieten sich die größeren Tierarten besonders für Fragen zur Atemmechanik und respiratorischen Physiologie an [Abraham WM 1997, Cockcroft DW 1998]. Fragen zur Pathophysiologie und Intervention der Atemwegs-Entzündung können aber sehr viel effektiver an kleineren Tieren wie Nagern untersucht werden [Heusser CH 1997, van Oosterhout AJ 1995]. Untersuchungen zu immunologischen Zusammenhängen bei der Entwicklung von Sensibilisierung und AHR setzen wiederum ein Modell voraus, in dem eine immunologisch sehr gut charakterisierte Tierart Verwendung findet. Hieraus ist ersichtlich, dass nicht ein Tiermodell alle Fragen zu einer Erkrankung beantworten kann, sondern dass die Wahl des geeigneten Tiermodells für die Bearbeitung spezieller Aspekte der Erkrankung wesentlich den Erfolg und den Stellenwert der Untersuchungen bestimmt.

3.5. Das Komplementsystem

“Le sérum de nombreux animaux renferme de l’alexine, c’est-à-dire une matière mal définie, encore inconnue dans sa constitution chimique, à la présence de laquelle on attribue cette propriété qu’ont généralement les sérums, d’exercer une influence destructive sur diverses cellules et sur certaines microbes. L’alexine perd son activité lorsqu’on chauffe à 55° le sérum qui la contient.” Diese Beschreibung der antimikrobiellen Wirkung und Hitze-Inaktivierbarkeit des Komplementsystems – hier Alexine genannt – durch Bordet und Gengou (1901) stellt eine der ersten Veröffentlichungen über das Komplementsystem dar [Bordet J and Gengou O 1901].

Das Komplementsystem ist ein Komplex aus mehr als 30 verschiedenen Glykoproteinen, die überwiegend im Blut lokalisiert sind und in Form von Komponenten, Faktoren und Zellrezeptoren ein zymogenes Abwehrsystem darstellen, dass unter permanenter Kontrolle wirtseigener Regulatoren steht. Das Komplementsystem ist für sich autark, die unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen und das weite Wirkungsspektrum seiner aktivierten Komponenten und Spaltprodukte verknüpfen jedoch auf mannigfaltige Weise das natürliche Immunsystem mit den spezifischen humoralen und zellulären Abwehrmechanismen [Perlmutter DH 1997].

3.5.1. Evolution

Das Komplementsystem taucht phylogenetisch bereits bei Echinodermaten auf und entwickelte sich vor ca. 600 bis 700 Millionen Jahren, lange vor dem Auftauchen der Immunglobuline. Die drei Komplementkomponenten C3, C4 und C5 sind vermutlich aus sukzessiven Genduplikationen entstanden, dessen Ursprungsmolekül das α 2-Makroglobulin darstellte [Clemenza L 2000]. Es wird vermutet, dass das Komplementsystem ursprünglich ein breiteres Erkennungsprofil von pathogenen Strukturen aufwies. So findet man in triploiden (Karpfen *Cyprinus carpio*) aber auch in diploiden Fischen wie der Goldbrasse (*Sparus aurata*) und dem Medeka Fisch (*Oryzias latipes*) verschiedene C3-Isoformen mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften zu Erythrozyten und Zymosan. Dies könnte Ausdruck der Konservierung eines multiplen C3-Systems sein, dass die bescheidenen Immunglobulinfunktionen der Fische komplementiert [Sahu A 2001].

3.5.2. Komplementaktivierung und Funktion

Die Komplementaktivierung ist eine kaskadenartig ablaufende Reaktion proteolytischer Spaltungen und damit verbundenen Anlagerungsreaktionen, die zur Bildung und Aktivierung von Enzymkomplexen führt. Das Komplementsystem kann auf drei verschiedene Arten aktiviert werden: durch Zuckerstrukturen auf bakteriellen Membranen (Mannose-Bindungslektin-Weg, MBL), durch stabilisierende Oberflächen (alternativer Weg) und durch Antigen-Antikörper-Komplexe (klassischer Weg) (siehe Abb. 5). Alle drei Aktivierungsarten können in der Bildung eines porenbildenden Komplexes, den Membran-Angriffs-Komplexes (MAC) münden. Darüber hinaus können einige Exproteasen von Bakterien und Pilzen C3 und C5 direkt spalten, bzw. die Aktivierung über C3b und C4b vermitteln. Auch bestimmte Säugerenzyme, die z.T. in Entzündungsprozessen freigesetzt werden wie Mastzelltryptase und auch Kallikrein und Plasmin besitzen ein komplementaktivierendes Potential [Schwartz LB 1983, Kirschfink M 1988].

Die Hauptaufgaben des Komplementsystems liegen in der Lyse und Opsonierung von Pathogenen, der Vermittlung von Entzündungsreaktionen, der Beseitigung von Immunkomplexen und der Modulierung der Immunantwort.

Viele in den Körper eindringende Bakterien, Viren und Parasiten lösen aufgrund wirtsfremder Oberflächenmotive die Aktivierung des Komplementsystems aus. Daraus resultiert letztendlich die Zerstörung der eingedrungenen Fremdorganismen, durch die terminalen porenbildenden Proteine des Membranangriffskomplexes (MAC) oder durch die Opsonierung mit aktivierten Komponenten des Komplementsystems wie C3b bzw. durch Abbauprodukte desselben (iC3b). Derartig opsonisierte Strukturen werden von Makrophagen und

Granulozyten über die Komplementrezeptoren CR1 (CD35), CR3 (CD11b, Mac-1, α M β 2-Integrin), und CR4 (CD11c) erkannt, gebunden und phagozytiert. Ebenso geschieht dies mit Antigen-Antikörper-Komplexen. Die den klassischen Komplementweg aktivierenden Immunkomplexe, werden mit C3b beladen, für die Phagozytose markiert und löslich gehalten. Eine weitere wichtige Aufgabe des Komplementsystems ist die Vermittlung von Entzündungsreaktionen. Im Zuge der Komplementaktivierung werden C3 und C5 sowie einige andere Komplementfaktoren proteolytisch gespalten. Viele dieser Spaltprodukte besitzen immunmodulatorische Aktivitäten. C3d, C3dg und iC3b binden an den CR2 (CD21) auf B-Lymphozyten und stimulieren die Antikörpersynthese [Carroll MC 1998]. C3e (Leukozyten-Mobilisierungsfaktor) fördert die Freisetzung von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark [Ghebrehiwet B 1979]. Bb als Spaltprodukt von Faktor B unterstützt die Monozyten/Makrophagen Funktionen [Hirani S 1985]. Die potentesten Spaltprodukte der Komplementaktivierung, mit einer Reihe entzündungsfördernder Wirkungen auf myeloide und nicht-myeloide Zellen, stellen die Anaphylatoxine C3a und C5a dar.

3.5.3. Der Alternative Weg der Komplementaktivierung

Der alternative Komplementaktivierungsweg ist antikörperunabhängig. Er besteht aus 6 Serumglykoproteinen: C3 und den Faktoren B,D,H,I und P, sowie den Rezeptoren Membran-Kofaktor-Protein (MCP = CD46) und CR1. C3 besitzt eine reaktive Thiolesterbindung, die durch Umlagerungen im Molekül an die Oberfläche gelangen kann und mit H₂O reagiert. Dieses hydrolytisch aktivierte C3(H₂O) wirkt wie C3b, kann aber nicht mehr an Membranen binden, da seine Thiolestergruppe bereits „verbraucht“ ist. Es kann jedoch mit Faktor B (FB) interagieren, der von Faktor D (FD) zu Bb und Ba gespalten wird. Auf diese Weise entsteht eine Serum-C3-Konvertase C3(H₂O)BbP, die C3 zu C3b umsetzen kann (vgl. Abb.5). C3b bindet sowohl an pathogene Oberfläche als auch an körpereigene Zellen. Letztere exprimieren jedoch i.d.R. sehr große Mengen an CR1 und MCP, die die Dissoziation und damit die Inaktivierung von C3b durch Faktor I katalysieren. Auf bakteriellen Oberflächen und z.T. entarteten Zellen führt die fehlende Inaktivierung zur Anlagerung von Faktor B und dessen Spaltung durch Faktor D zu Bb, das mit dem oberflächengebundenem C3b die C3 Konvertase C3bBb des alternativen Weges bildet [Meri S 1990].

3.5.4. Der MPL-Weg der Komplementaktivierung (Lektin-Weg)

Das zentrale Protein des MBL-Weges ist das Mannose-Bindungslektin (MBL), das durch die Bindung an bakterielle Zuckerstrukturen aktiviert wird. MBL ist strukturell verwandt mit der C1q-Komponente des klassischen Komplementaktivierungsweges und gehört zur Familie

der Kalzium-abhängigen Lektine mit Kollagendomänen, die auch als Collectine bezeichnet werden. Es erkennt spezifisch Mannose- und N-Acetylglucosamin-Reste auf Bakterien, Viren und Parasiten. Die Kollagendomäne im MBL-Molekül ist essentiell für die Interaktion mit Collectin-Rezeptoren, die sich vor allem auf Phagozyten befinden, und für die Aktivierung von Komplement [Sumiya M 1997]. MBL kann mit den Serinproteasen MASP-1 (MBL-assoziierte Serinprotease), MASP-2 und MASP-3, sowie einer verkürzten Version von MASP-2, genannt M_{Ap}19 assoziieren, die strukturell mit den C1q Proteasen C1r und C1s des klassischen Weges verwandt sind [Turner MW 2003]. Für die Komplementaktivierung scheint das MASP-2 von größter Bedeutung zu sein. MBL- MASP-2-Komplexe werden aktiviert, wenn sie an bestimmte Zuckerstrukturen, v.a. Mannose- und N-Acetylglykosamin-Reste binden. Der aktivierte MBL- MASP-1/2 –Komplex hat Serinprotease-Aktivität und spaltet C4 und C2 deren Spaltprodukte die C3 Konvertase des MBL und klassischen Weges C4b2a bilden (vgl. Abb.5). Der MBL-Weg ist phylogenetisch gesehen relativ alt. Dafür sprechen die Entdeckungen von MBL-Homologen in Invertebraten und die antikörperunabhängige Aktivierung [Ji X 1997]

3.5.5. Der Klassische Weg der Komplementaktivierung

Der klassische Komplementweg wird durch Antikörperkomplexe und Aggregationen von Antikörpern, wie sie auf multideterminanten Antigenen (z.B. bakteriellen Oberflächen) vorliegen, aktiviert. Dazu muss das Serumprotein C1 - ein Heterodecamer aus 6 C1q-, 2 C1s- und 2 C1r-Untereinheiten – gleichzeitig an mehrere Fc-Teile der komplement-aktivierenden Antikörperklassen IgM und die IgG-Subklassen 1, 2 und 3 binden. Die Moleküle C1s und C1r sind an den kollagenähnlichen Bereich des C1q-Hexamers angelagert und werden dort nach Kontakt mit Antigen-Antikörperkomplexen aktiviert. Wenn zwei C1q-Untereinheiten gleichzeitig in Kontakt mit Antigen-Antikörperkomplexen gelangen, wird C1r enzymatisch aktiviert, spaltet sich selbst und wirkt als Serinesterase. Diese wirkt auf C1s, wobei zwei Spaltfragmente entstehen, von denen das kleinere ebenfalls Serinesteraseaktivität besitzt und auf die Serumproteine C4 und C2 wirkt. C4 wird in C4a und C4bgespalten. Membrangebundenes C4b lagert sich mit C2 zusammen und auch dieses wird von der C1s-Serinesterase in C2b und C2a gespalten. C2b verlässt den Komplex, der nun aus C4b2a besteht und die C3-Konvertase des klassischen Komplementweges darstellt. Analog zum alternativen Weg wird C3 in C3a und C3b gespalten. Nicht hydrolytisch inaktiviertes C3b opsonisiert die umgebenden Oberflächen und bereitet diese für die Phagozytose durch Makrophagen und Granulozyten vor. Die weitere Anlagerung von C3b an die C3-Konvertase zu führt zur C5-Konvertase C4b2a3b, die C5 spaltet und die Bildung der terminalen MAC-Komplexe einleiten kann (vgl. Abb.5) [James K 1982].

3.5.6. Regulation der Komplementkaskade

Das Komplementsystem steht unter der Kontrolle von Serum- und Membranproteinen. An erster Stelle der klassischen Aktivierungskaskade steht der C1 Inhibitor (C1INH). C1INH ist in sehr hohen Konzentrationen im Blut vorhanden und C1 ist zum größten Teil an diesen Inhibitor gebunden. Erst die Bindung der C1q-Untereinheit an Antigen/Antikörper-Komplexe setzt C1INH frei und ermöglicht die Aktivierung der Serinprotease. Der Hauptregulator der klassischen Aktivierung ist Faktor I, der C4b in C4c und C4d spaltet. Die Inaktivierung ist von den Kofaktoren C4-bindendes Protein und den Membranproteinen CR1 und DAF (decoy acceleration factor) abhängig, die auch als RCA Elemente (regulator of complement activation) bezeichnet werden. Faktor I reguliert auch die Bildung der alternativen C3 Konvertase und bedient sich der zusätzlichen Kofaktoren Faktor H und MCP, wodurch C3b in iC3b und weiter in C3c und C3dg gespalten wird. Zusätzlich wird die Bindung von Faktor H durch einen hohen Gehalt an Neuraminsäuren gefördert, deren Gehalt auf Säugerzellen im Vergleich zu Mikroorganismen sehr hoch ist.

Auch der MAC wird von einigen Faktoren reguliert. Dazu gehören CD 59 (Membranhemmer der reaktiven Lyse, MIRL), HRF (Homologer Restriktionsfaktor, C8-bindendes Protein), das S-Protein (Vitronektin) und das Protein SP-40,40, dessen genaue Funktion ungeklärt ist [Meri S 1998].

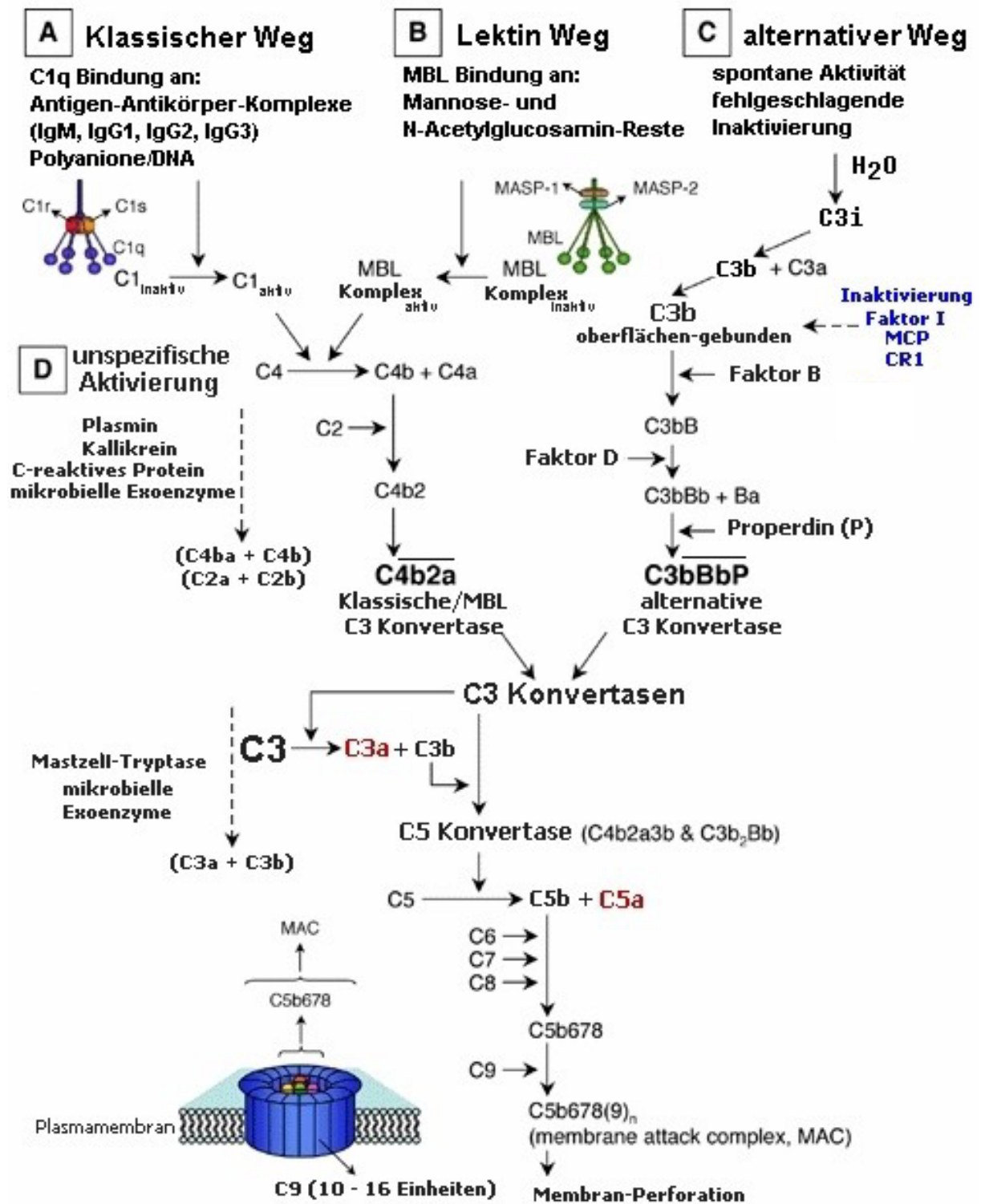


Abb. 5: Mechanismen der Komplementaktivierung und ihre Regulation (näheres siehe Text).

3.5.7. Komplement-assoziierte Erkrankungen

Die Funktionalität des Komplementsystems wird durch Erkrankungen, die mit Defekten in bestimmten Komponenten des Komplementsystems assoziiert sind, dokumentiert. Mangelerkrankungen im C1INH führen zu hereditären Angiodömen. Defekte in den Strukturproteinen C1, C2 und C4 sind oft mit Immunkomplexerkrankungen assoziiert, während ein C3 Defizit von einer gesteigerten Anfälligkeit für bakterielle Infektionen begleitet ist. Eine Beeinträchtigung in der Fähigkeit zur Bildung des MAC ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Empfänglichkeit gegenüber Neisserien-Infektionen [O'Neil KM 2000, Bartholomew WR 1990].

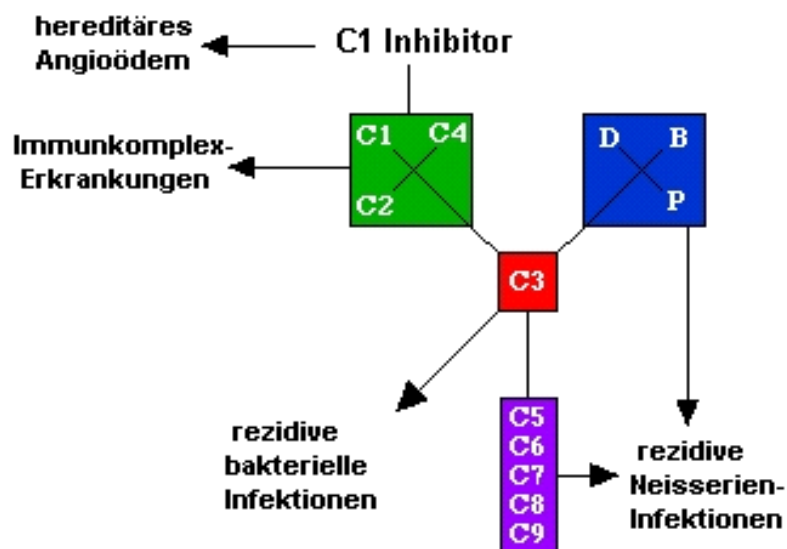


Abb. 6: Krankheitsbilder, die mit Komplementmangelerkrankungen assoziiert sind.

Neben einer Einschränkung der Funktionalität des Komplementsystems steht auch eine erhöhte und unkontrollierte Aktivität mit bestimmten Erkrankungen wie dem systemischem Lupus erythematodes (SLE), rheumatoider Arthritis (RA), Morbus Alzheimers und Multipler Sklerose (MS) in Verbindung [Kirschfink M 2001].

Auch die Anaphylatoxine und v.a. C5a sind maßgeblich an der Pathogenese von Erkrankungen beteiligt, wie Sepsis, Trauma, ARDS, ischämische Herzerkrankungen, Post-Dialyse Syndrom, Hypersensitivitätsreaktionen vom Typ IV und verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis, Lupus Erythrematosus und akute Glomerulonephritis. [Green RH 2003, Chakraborti T 2000, Belmont HM 1986, Welch TR 2002].

3.6. Anaphylatoxine

1913 wurde Charles Richet für die Entdeckung der Anaphylatoxine, die er Toxigenine nannte, mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Besredka bezeichnete sie später als Sensibilisine und Friedberger prägte schließlich den Begriff der Anaphylatoxine.

Anaphylatoxine sind bioaktive Moleküle, die proteolytisch aus Ihren Muttermolekülen C3, C4 und C5 während der Komplementaktivierung freigesetzt werden. Die Anaphylatoxine C3a, C4a und C5a werden von auf einem einzelnen Exon innerhalb ihrer Komplementgene kodiert, und sind im humanem Genom auf Chromosom 19, 6 bzw. 9 lokalisiert.

Strukturell handelt es sich bei den Anaphylatoxinen C3a und C5a um kurze, basische Polypeptide von 77, 76 bzw. 74 Aminosäuren Länge und hoher Sequenzhomologie (ca. 24 – 31% [Hugli TE 1975, Fernandez HN 1978]), wobei natürliches C5a an Position 64 N-glykosyliert vorliegt. NMR- und Röntgenbeugungsstudien [Zuiderweg ER 1989] ergaben für C3a- und C5a- Moleküle auch eine homologe Raumstruktur. Von einem N-terminalen, globulären, durch drei Disulfidbrücken stabilisierten Kernbereich, der aus drei bzw. vier α -Helices gebildet wird, stehen die C-terminalen ca. 11 Aminosäurereste als flexibler "Finger" mit wenig geordneter Struktur hervor. Neuere NMR-Studien für C5a zeigen allerdings, dass der C-Terminus aufgrund einer Wechselwirkung zwischen dem terminalen Arg74 und Arg62 dazu tendiert, sich in Richtung auf den Kernbereich zurückzufalten [Zhang X 1997].

3.7. Biologische Wirkungen der Anaphylatoxine

Die Anaphylatoxine vermitteln eine Reihe funktioneller und proinflammatorischer Wirkungen. Die physiologische Bedeutung von C4a ist allerdings unklar. Es wird vermutet, dass C4a an den C3a Rezeptor binden kann, und eine Hemmung der C3a-vermittelten Chemotaxis auf Makrophagen ist beschrieben worden [Hennecke M 1998]. C4a und C4a-analoge Peptide können bei Injektion in die Haut eine dosisabhängige Schwellung und Rötung hervorrufen [Tsuruta T 1993, Hugli TE 1983]. Der C3a-Rezeptor des Meerschweinchens exprimiert in HEK-293 Zellen reagiert funktionell auf humanes C4a, wohingegen mit dem humanen C3a Rezeptor transfizierte Zellen keine Resonanz zeigen [Lienenklaus S 1998]. C4 wird im Gegensatz zu C3 und C5 nicht durch ein amplifizierendes System zu C4a gespalten. Seine physiologische Präsenz ist daher schon alleine im Vergleich zu C3a und C5a gering zu bewerten. Auch in anderen Spezies neben Mensch und Meerschwein sind bis jetzt keine eindeutigen *in vivo* Effekte von C4a beschrieben worden.

C3a und C5a sind potente Mediatoren und entfalten ihre Wirkungen über ihre spezifischen Rezeptoren auf myeloiden wie nicht-myeloiden Zellen. Sie regulieren die Vasodilatation, erhöhen die Vasopermeabilität kleiner Blutgefäße und sind in der Lage die Kontraktion glatter Muskelzellen zu induzieren [Ember, J.A 1998]. C5a ist in der Vermittlung dieser Wirkungen prinzipiell sehr viel effektiver. Die Kontraktion der glatten Muskelzellen wird in der Lunge primär durch die Leukotriene LTC₄ und LTD₄ vermittelt. Diese Aktivität nimmt in der Reihenfolge C5a > Histamin > Acetylcholin > C3a > C4a ab. Die schwächere Aktivität von C3a könnte allerdings durch die höhere maximal mögliche Serumkonzentration des C3-Spaltproduktes ausgeglichen werden.

C3a und C5a wirken aktivierend auf eine Reihe von Leukozyten. Sie stimulieren den *oxidativen Burst* in Makrophagen und neutrophilen und eosinophilen Granulozyten [Murakami Y 1993, Elsner J 1994, Elsner J 1]. Basophile und serosale Mastzellen setzen nach Stimulation mit C3a und C5a Histamin frei [Gorski JP 1979, Erdei A 1999]. Darüber hinaus regulieren C3a und C5a die Synthese von ECP in eosinophilen Granulozyten und die Expression von Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen [Takafuji S 1996, DiScipio RG 1999]. C3a regt die Freisetzung von Serotonin in Thrombozyten des Meerschweinchens an. In B-Lymphozyten und Monozyten moduliert C3a die Synthese von IL-6 und TNF α [Fischer WH 1997, Fischer WH 1999]. C5a spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation von IL-6 bei Erkrankungen wie Sepsis, und hat modulierenden Einfluss auf die Sezernierung von IL-1 β und IL-6 in Monozyten und Osteoblasten [Pobanz JM 2000, O'Barr S 2000]. C5a induziert zudem *in vitro* die Genexpression von IL-8, IL-1 β , und RANTES in Endothelzellen und von MCP-1 und GM-CSF in retinalen Epithelzellen [Luccioli S 2002, Fukuoka Y 2003]. Des Weiteren induziert C5a die Freisetzung von IL-4 und IL-13 aus basophilen Granulozyten [Eglite S 2000]. C5a ist auch ein Chemotaktikum für Makrophagen, neutrophile Granulozyten, aktivierte B- und T-Lymphozyten, basophile Granulozyten und Mastzellen [Ember JA 1998, Murakami Y 1993, Kretzschmar T 1993, Nataf S 1999, Lett-Brown MA 1977, Hartmann K 1997]. Ebenfalls besitzt auch C3a chemotaktische Aktivitäten. C3a ist das stärkste bekannte Chemotaktikum für Mastzellen [Nilsson G 1996]. Ursprünglich wurde C3a ein chemotaktisches Potential für neutrophile Granulozyten zugesprochen. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass diese Beobachtungen auf Verunreinigungen durch eosinophile Granulozyten in den Zellpräparationen zurückzuführen sind, die nach Aktivierung sekundär chemotaktische Produkte für neutrophile Granulozyten produzieren [Daffern PJ 1995]. C3a induziert zwar wie C5a die Expression von β 2-Integrinen in Granulozyten, die Oberflächenexpression von L-Selektinen wird aber nur in Eosinophilen induziert, während C5a sowohl in eosinophilen als auch in neutrophilen Granulozyten die Oberflächenexpression von L-Selektin induziert [Jagels MA 2000, DiScipio RG 1999].

C3a und C5a können außerdem den Arachidonsäure-Stoffwechsel in basophilen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten stimulieren und damit die Produktion von Eicosanoiden fördern. Eine Aktivierung der Granulozyten durch IL-3 oder IL-5 ist hierfür Voraussetzung [Eglite S 2000, Kodani M 2000, Bischoff SC 1990, Haurand M 1989, Takafuji S 1991].

C5a scheint auch eine wichtige Rolle in der Regulation der Fc γ -vermittelten Makrophagenfunktionen zu spielen. Die Rezeptoren für C5a und IgG sind auf Makrophagen koexprimiert und die Bindung von C5a unterstützt die Wirkungen des aktivierenden Fc γ RIII, während es die des hemmenden Fc γ RII negativ beeinflusst [Shushakova N 2002].

3.8. Anaphylatoxin Rezeptoren

Die Anaphylatoxine binden an spezifische G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die zur Rhodopsin-Familie zählen. Der C3a Rezeptor (C3aR, C3aR1) und der C5a Rezeptor (C5aR, C5R1, CD88) sind im humanen Genom auf Chromosom 19 bzw. 12 kodiert.

Der Nachweis von Anaphylatoxinrezeptoren auf den verschiedensten Zelltypen lässt ein breites Spektrum von physiologischen und pathophysiologischen Effekten erwarten. Nach derzeitigem Wissenstand werden C3aR und C5aR auf Epithel- und Endothelzellen, vaskulären wie bronchialen glatten Muskelzellen und auf Neuronen und Gliazellen exprimiert [Riedemann NC 2002, Drouin SM 2001, Laudes IJ 2002, Haviland DL 1995, Nataf S 1999, Lacy M 1995]. C5aR wird zudem von Hepatozyten und abgeleiteten Zelllinien exprimiert [356]. C3aR und C5aR werden von basophilen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Mastzellen und Monozyten/Makrophagen exprimiert [Soruri A 2003, Zwirner J 1999, Jagels MA 2000, Hartmann K 1997]. Auch die Expression und chemotaktische Funktion des C5aR für Dendritische Zellen ist beschrieben [Kirchhoff K 2001].

Ebenso wurde für humane T-Lymphozyten die Expression von C3aR und C5aR nachgewiesen [Nataf S 1999, Werfel T 2000]. Derzeit kontrovers diskutiert wird die Expression von Anaphylatoxin-Rezeptoren auf B- Lymphozyten und murinen T-Lymphozyten [Soruri A 2003, Zwirner J 1999].

Für C5a wurde kürzlich ein weiterer Rezeptor beschrieben, der den Namen C5L2 trägt und im Gegensatz zu C5aR sowohl C5a als auch v.a. C5a desarg mit hoher Affinität bindet.

C5L2 ist nicht mit G-Proteinen gekoppelt und zeigt keine Rezeptorinternalisierung nach Ligandenbindung. Ungewiss ist, ob der Rezeptor über G-Protein unabhängige Mechanismen zu einer Signaltransduktion befähigt ist [Okinaga S 2003, Cain SA 2002, Otto M 2003]. Das Expressionsspektrum im Menschen und der Maus ist vergleichbar mit dem von C5aR [58]. Die Beobachtung, dass der C5L2 keine typischen inflammatorischen Gene aktiviert und mit

dem C5aR koexprimiert wird, lässt vermuten, dass er funktionell als Decoy-Rezeptor fungieren könnte [Okinaga S 2003].

3.9. Signaltransduktion der Anaphylatoxinrezeptoren

Die Ligandenbindung von C3aR und C5aR führt zur Aktivierung der Phospholipase C und Ca^{2+} Mobilisation, was die Aktivierung von MAP-Kinasen über den Ras/Raf –Signalweg bewirkt [Knall C 1995, Eglite S 2000]. In Leukozyten ist dieser Prozess an Pertussistoxin (PT)-sensitive $G_{1\alpha}$ und PT-unsensitive $G_{\alpha 16}$ Einheiten gekoppelt.

In anderen Zelltypen kann das Rezeptorsignal ebenso durch PT-sensitive $G_{\alpha 12}$ und $G_{\alpha 13}$ Einheiten vermittelt sein und rho-abhängige Signalwege stimulieren, wie es für C3aR an HUVEC-Zellen gezeigt wurde. Darüber hinaus ist in dieser Endothelzelllinie die C5aR-Signalvermittlung Phosphatidylinositol und src-Kinase abhängig [Schraufstatter IU 2002]. Die Verwendung von G-Protein-Typen zur Signalvermittlung der Anaphylatoxin Rezeptorbindung kann abhängig vom Zelltyp sehr unterschiedlich sein; und G-Protein-unabhängige Signalwege sind ebenfalls möglich.

3.10. Regulation der Anaphylatoxine

Im Blut werden die Anaphylatoxine rasch durch die Carboxypeptidase N, eine Serum α -Globulin Metallproteinase, das ebenso Bradikinin, Kallidin und Fibrinopeptide spaltet, durch hydrolytische Abspaltung des terminalen Argininrestes zu C3a-, C4a- und C5a-desarg inaktiviert. Während C3a und C4a durch Desarginierung ihre biologische Aktivität nahezu vollständig verlieren, vermittelt C5aR desarg immer noch bestimmte Wirkungen, die allerdings im Vergleich zum intakten Protein viel schwächer sind. Als Chemotaktikum wirkt C5a desarg z.B. 100-fach schwächer auf neutrophile Granulozyten als arginiertes C5a.

3.11. Bedeutung der Anaphylatoxine beim Asthma bronchiale

Anaphylatoxine sind an einer Vielzahl pathophysiologischer Prozesse beteiligt (vgl. 3.5.6.). In neuerer Zeit wird den Anaphylatoxinen auch eine Bedeutung in der Pathogenese des Asthma bronchiale beigemessen [Gerard NP 2002]. In einer klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass eine Komplementaktivierung in der Lunge durch Allergenprovokation ausgelöst wird, die sich in hohen Konzentration von C3a desarg und C5a desarg in der BAL äußert [Krug N 2002].

Die Funktionelle Bedeutung der Anaphylatoxine bei der Ausbildung eines asthmatischen Phänotyps wurde in verschiedenen Tiermodellen dargestellt. Dabei zeigen sich Einflüsse in den unterschiedlichen Phasen der asthmatischen Reaktion.

Eine Verminderung der Bronchokonstriktion in der allergischen Frühreaktion konnte in Meerschweinchen mit einem natürlichen Defekt des Rezeptors für das Anaphylatoxin C3a im Vergleich zu einem C3a-Rezeptor kompetenten Kontrollstamm beobachtet werden [Bautsch W 2000]. Ein Einfluss auf die allergische Spätreaktion wurde in Ratten-Modellen durch die Antagonisierung des C5aR, bzw. durch die intratracheale Gabe von C5a desarg gezeigt [Abe M 2001, Kodani M 2000]. In C3a-defizienten Mäusen sind sowohl die Atemwegseosinophilie als auch die Atemwegshyperreagibilität unter Bedingungen des experimentellen Asthma reduziert [Drouin SM 2002].

In diesem Modell als auch in einem anderen tierexperimentellen Ansatz, in dem die Komplementaktivierung und damit die Anaphylatoxinfreisetzung über ein Crry-Immunglobulin-Konstrukt (Crry = complement receptor 1-related protein/gene y) gehemmt wurde, konnten zudem Beeinträchtigungen der Th-2 Effektorfunktion mit der Wirkung von Anaphylatoxinen in Zusammenhang gebracht werden [Taube C 2003].

Auf der anderen Seite konnte an C5-defizienten Mäusen eine erhöhte Empfänglichkeit für die Ausbildung einer AHR festgestellt werden. Dieser Effekt wird im Zusammenhang mit einer Beeinflussung des Th1/Th2-Gleichgewichts in der Sensibilisierungsphase gesehen. Das Anaphylatoxin C5a könnte für diesen protektiven Effekt eine Schlüsselrolle spielen, da es in das Gleichgewicht zwischen Th1 und Th2 Zytokinen eingreifen kann. Ein starker Hinweis dafür ist, dass die Blockade des C5aR auf humanen Monozyten dazu führt, dass diese Zellen in Reaktion auf IFN- γ und Stimulation mit *Staphylococcus aureus* cowain strain (SAC) kein IL-12 mehr freisetzen [Karp CL 2000]. Tatsächlich zeigen peritoneale Makrophagen von C5 defizienten Mäusen, im Vergleich mit C5 kompetenten Tieren eine signifikant verminderte IL-12 Freisetzung nach IFN- γ und SAC Stimulation.

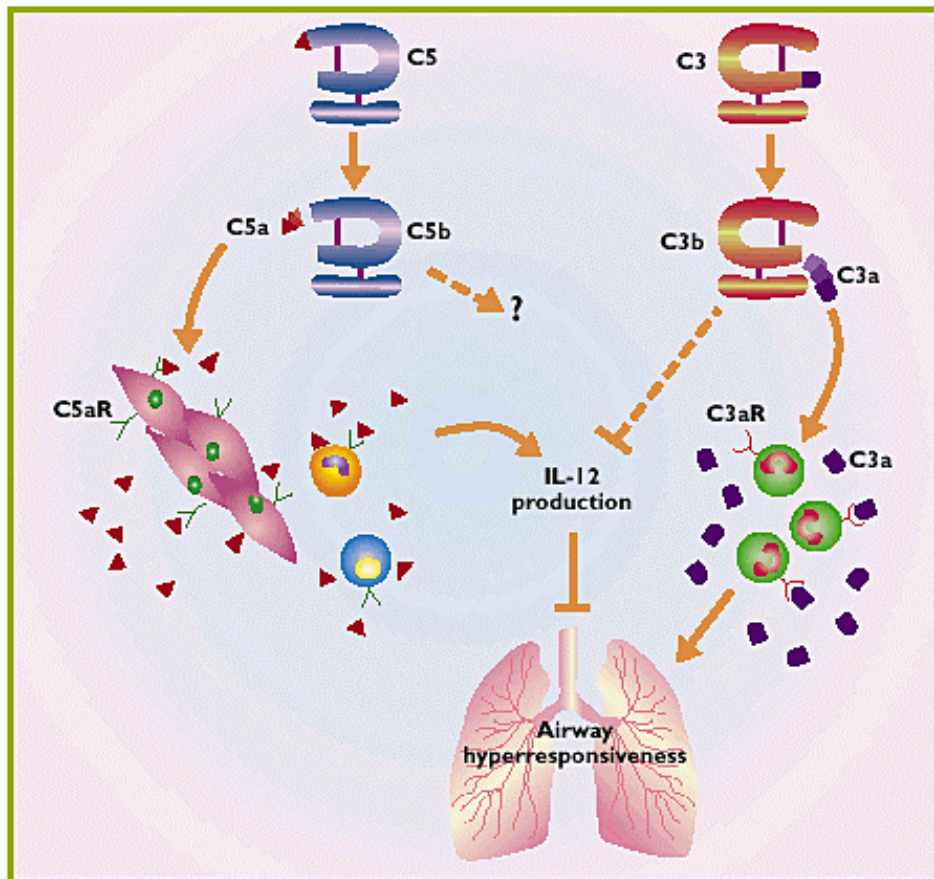


Abb. 7: Mögliche Beteiligung von C3a und C5a an der AHR. Aus: P. Henson Nat.Immunol, 1: 190 (2000).

Diese Befunde belegen, dass die Anaphylatoxine bei der Ausbildung des allergischen Asthmas eine größere Rolle spielen könnten, als bisher angenommen wurde. Durch die Beeinflussung des Zytokinmilieus könnte den Anaphylatoxinen bei der Pathogenese des allergischen Asthmas eine immunmodulatorische Funktion zukommen und so eine Verbindung zwischen dem angeborenen mit dem erworbenen Immunsystems herstellen. Vor allem aber die Funktionen der Anaphylatoxine, die sie auf die Effektorzellen des Asthma bronchiale wie eosinophile Granulozyten, Mastzellen aber auch Lymphozyten und glatte Muskelzellen ausüben sind im Hinblick auf neue Behandlungsstrategien eine interessante und viel versprechende Zielstruktur.

3.12. Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung des Einflusses der Anaphylatoxine im Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung und Atemwegshyperreagibilität. Für die Bearbeitung der Fragestellung waren zuvor geeignete methodische Grundlagen zu etablieren, sodass sich das Konzept in die folgenden Unterpunkte gliederte.

1. Etablierung der Lungenfunktionsmessung an der Maus.
2. Etablierung eines geeigneten Mausmodells, das die wesentlichen Charakteristika des Asthma bronchiale wie Atemwegshyperreagibilität und Atemwegseosinophilie gut widerspiegelt.
3. Charakterisierung der Bedeutung der Anaphylatoxine in der Ausbildung eines asthmatischen Phänotyps im Mausmodell

4. Material und Methoden

4.1. Hersteller/Vertreiberverzeichnis

Abbot GmbH & Co KG	Wiesbaden, D
Acros	Geel, B
Amersham	Braunschweig, D
Ansell GmbH	München, D
Avant Immunotherapeutics, INC.	Needham, USA
Avnet Applied Computing GmbH (EIZO)	Nettetal, D
Bayer Vital GmbH & Co. KG	Leverkusen, D
BD Biosciences	Heidelberg, D
BeckmanCoulter	München, D
Becton Dickinson	Heidelberg, D
Berthold	Wildbad, D
Biometra	Göttingen, D
Biomol	Hamburg, D
BioProducts	Rockland, USA
Biorad	München, D
Bios International Corporation	Butler, USA
Biosource	Camarillo, USA
BioTrend	Köln, D
BioWhittaker	Verviers, B
Biozol	Eching, D
BIOzym	Hess. Oldendorf, D
Boehringer	Mannheim, D
Braun	Melsungen, D
CalBiochem (Merck Biosciences)	Schwalbach, D
Cambrex	New Jersey, USA
Charles River	Sulzfeld, D
Chassot	Bern, CH
Cherry GmbH	Auerbach, D
Corning	Wiesbaden, D
CorningCostar	Bodenheim, D

Coulter-Immunotech-Diagnostics	Krefeld, D
DakoCytomation GmbH	Hamburg, D
Dianova	Hamburg, D
DPC Biermann	Bad Nauheim, D
Dräger Medizintechnik	Lübeck, D
Dynatech	Deisenhof, D
EMD Biosciences	San Diego, USA
Endogen	über Biozol
Entellan (Eindeckelmedium)	Merck
Eppendorf	Berlin, D
Eppendorf	Hamburg, D
Eurim-Pharm Arzneimittel GmbH	Piding, D
Falcon	über BD Biosciences
GATC Biotech	Koblenz, D
GFL	Würzburg, D
Gibco	Eggenstein-Leopoldhafen, D
Greer Laboratories, INC	Lenoir, USA
Greiner	Nürtingen, D
Heinen & Löwenstein GmbH,	Bad Ems, D
Heraeus	Hanau, D
Heraeus	Osterode, D
Hugo Sachs Elektronik	March, D
Integra Bioscience	Chur, CH
IMTM GmbH	Magdeburg
Innogenetics	Helden, D
Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.	West Grove, USA
Kendro	Langenselbold, D
Kodak	Rochester, USA
Labsystems	Vantaa, SF
Leitz	Wetzler, D
Logitech GmbH	Germering, D
Menzel (Apogent)	Braunschweig, D
Merck	Darmstadt, D

Merckle GmbH	Blaubeuren, D
Merial	Hallbergmoos, D
Meyer Instruments, Inc. (Leica)	Houston, USA
Millipore	Billerica, USA
Miltenyi Biotec	Bergisch-Gladbach, D
Molecular Probes	Leiden, NL
MWG-Biotech AG	Ebersberg, D
NUNC	Wiesbaden, D
NCD	Hoofddorp, NL
Orpegen	Heidelberg, D
Packard	Dreieich, D
Packard	Meriden, USA
PARI GmbH	Starnberg, D
Perbio Science	Bonn, D
PerkinElmer Life Sciences GmbH	Rodgau – Jügesheim, D
Pharmacia Biotech	Uppsala, S
Pharmingen	über Becton Dickinson
Phoenix Peptide	Belmont, USA
Pierce	über Perbio Science
Promega	Madison, USA
Qiagen	Hilden, D
R & D	Wiesbaden-Nordenstadt, D
Ratiopharm	über Merckle GmbH
Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, D
roeko	Langenau, D
Rhone Merieux GmbH	Laupheim, D
Roth	Karlsruhe, D
Skura Finetek Europe B.V.	Zoeterwoude, NL
Sartorius	Göttingen, D
Scanbur	Karlsunde, DK
Schäfer Verfahrenstechnik	Langen, D
Schärfe Systems GmbH	Reutlingen, D
Serva	Heidelberg, D

Shandon GmbH	Frankfurt a. M., D
Sharp	München, D
Sigma	München, D
S.M.I. Ag	Hünningen, B
Sonics & Materials INC.	Danbury, USA
Strathmann Biotec	Hamburg, D
Terumo	Leuven, B
Unomedical	Lynge, DK
Validyne Engineering Corp.	Northridge, USA
Vector Laboratories	Burlingame, USA
Wilke/Witzel	Hamburg, D
Zeiss	Jena, D

4.2. Material

4.2.1. Chemikalien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller/Vertreiber</u>
Acetyl- β -Methylcholinchlorid	Sigma
Agarose	BioProducts
Aqua dest (aus Reinst- Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q)	Millipore
APAAP Komplex	DakoCytomation GmbH
Aspergillus Extrakt	Greer Laboratories, INC
β -Mercaptoethanol	Gibco
Anti-Maus-C5a Rezeptor Antikörper Ratte IgG2a (f. Histo)	J. Zwirner
Chlorwasserstoffsäure (HCl)	Roth
Cobra Venom Faktor	Innogenetics
N ² -[(2,2-Diphenylethoxy)acetyl]-L-arginin (SB290157) [095]	EMD Biosciences
Eosin Y Lösung mit Phloxin	Sigma
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA) 0,5M Lösung	Cambrex
Essigsäure 99%	Roth
Fibronektin Inhibitor	CalBiochem

Fötales Kälberserum	Sigma
Freund'sches Adjuvans	Sigma
FITC-Streptavidin	Coulter-Immunotech
Gaze	S.M.I. Ag
Halothan	Eurim-Pharm Arzneimittel GmbH
ImjectAlum: Aluminiumhydroxid und Magnesiumhydroxid	Pierce
Anti-Ratte-IgG (H+L) Antikörper Kaninchen Biotinyliert (mausabsorbiert) VC-Ba-4001-MC05	Vector Laboratories
Anti- Kaninchen – Fab2 Antikörper Schwein - FITC	Coulter-Immunotech
Anti-Ratte-Fab-Fragment Ziege FITC-konjugiert	Molecular Probes
Isopropanol (2-Propanol)	Roth
Isotyp Ratte IgG2a	Jackson Immunoresearch
Ketaminhydrochlorid 10%-ig (Narketan)	Chassot
Komplement, Maus. lyophilisiert C201	BioTrend
Maus Serumalbumin A3559-5MG	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Methanol	Roth
Natriumcarbonat (NaCO ₃)	Merck
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck
Natriumhydroxid	Merck
OCT Tissue-Tek	Skura Finetek Europe B.V.
Ovalbumin Grade V und VI	Sigma
Paraffin-Öl	Roth
Penicillin / Streptomycin	Sigma
Pentobarbital-Natrim (Narcoren 1,6 g/L)	Rhone Merieux GmbH
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Cambrex
Propofol (Prpofol Lipuro) 2-%ige Emulsion	Braun
Desoxyoligonukleotid-Primer	MWG-Biotech AG
PBGD-Primer	
C3aR-Primer	
C5aR- Primer	
Random-Primer	Roche
Ribonuklease Inhibitor RNasin N2511	Promega
RPMI1640	Cambrex
Substrat Reagenz (für ELISA)	R&D Systems
sCR1 (TP10) löslicher Komplement Rezeptor 1(sCD35)	Avant Immunotherapeutics, INC.
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth

WasserG (gasfreies Wasser)

Roth

Xylol

Sigma

Xylazinhydrochlorid 2%-ig (Rompun)

Bayer Vital GmbH & Co. KG

Ziegenserum, normal

BD Biosciences

Zymosan

Sigma

4.2.2. Kits

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller/Vertreiber</u>
ELISA Maus; DuoSet Development Systems	R&D Systems
Eotaxin-2 (CCL24, MPIF-2) DY404	
IFNg DY485	
IL-4 DY404	
IL-5 DY405	
IL-6 DY410	
IL-13 DY413	
ELISA Maus OptEIA Set Maus IgE 2655KI	BD Biosciences
RIA C3a desarg ¹²⁵ IRPA 518	Biotrak (BD Pharmingen)
C5a desarg ¹²⁵ IRPA 520	
Omniscrypt RT Kit	Qiagen
Nucleo Spin RNA II	Machery-Nagel
LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I	Roche

4.2.3. Geräte

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller/Vertreiber</u>
Analysenwaage	Sartorius
Bio-Fotometer	Eppendorf
Body (Headout) zur Messung der Lungenfunktion, Eigenbau	MHH Werkstätten
Bodyplethysmograph (für wache Maus)	MHH Werkstätten
Bodyplethysmograph (für intubierte Maus)	Hugo Sachs Elektronik
Bronchy Typ II (Aerosolgenerierungssystem), Eigenbau	FhG, ITEM
Aerosolkammer für inhalative Allergenprovokation, Eigenbau	FhG, ITEM
Doppelrotameter	Dräger Medizintechnik
Digitalkamera	Kodak
Druckaufnehmer (DP45-14)	Validyne
Durchflussfotometer, Eigenbau	FhG, ITEM
Dry Cal DC-2	Bios International Corp.
Elektrophoresekammer	Serva
ELISA-Reader	Dynatech
Gamma Counter Wizard	PerkinElmer Life Sciences GmbH

Hem3.4 Mess- und Auswertungssoftware (Lungenfunktion)	Notocord
Kühlzentrifuge	Kendro
Kryostat CM 1850	Leica (Meyer Instruments, Inc.)
LightCycler	Roche
Magnehelic	Dräger Medizintechnik
Marple Kaskaden Impaktor	Schäfer Verfahrenstechnik
Mikroskop	Zeiss
Mikrowelle	Sharp
Oxyanga	Heinen & Löwenstein GmbH
Pari Verneblungssystem LC Star	Pari
Pipetten	Labsystems
Pneumotachographen (PTM 378/1.2)	Hugo Sachs Elektronik
Scantainer	Scanbur LTD
Spannungsgenerator für Elektrophorese	BioRad
Sicherheitswerkbank	Integra
Sicherheitswerkbank	Kendro
Thermomixer	Eppendorf
Ultraschallhomogenisator	Sonics & Materials INC.
UV-Lampe	Fisherbrand
Vapor 2000 M35054 (Halothanverdampfer)	Dräger Medizintechnik
Verstärker CFBA Typ 677	Hugo Sachs Elektronik
Zentrifugen	Kendro
Zentrifuge für 1,5 mL Reaktionsgefäße	Eppendorf
Zytozentrifuge	Shandon GmbH
Zentrifugalanalysator	Roche

4.2.4. Verbrauchsmaterial

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller/Vertreiber</u>
Combitips (2,5 mL, 5 mL, 10 mL)	Eppendorf
Drei-Wege-Hahn	UNOPlast
Handschuhe Latex	Ansell GmbH
Kanülen	Braun
Latex „Dental Dam“	roeko
LightCycler Kapillaren	Roche
Multitube Lagerungsboxen	Greiner

Objekträger	Menzel
Pipettenspitzen safe-seal	BIOzym
Polypropylenröhrchen (5 mL, 14 mL, 50 mL)	Becton Dickinson
Reaktionsgefäße (1,5 mL, 2 mL)	Eppendorf
Spritzen (1 mL, 5 mL)	Braun
Venenverweilkanüle	Abbot GmbH

4.3. Puffer, Medien und Lösungen

4.3.1. Puffer

PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung wurde gebrauchsfertig von BioWhittaker bezogen. pH : 7,3-7,7; Osmolality : 271-287 mOsm/kg
RLT-Lysis-Puffer	Der RLT-Lysis-Puffer ist Bestandteil des Kits von Machery und Nagel zur RNA- Isolierung. Vor Gebrauch ist er mit 10 µL β-Mercaptoethanol pro mL Puffer versetzt worden.
TAE-Puffer	40 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan 2 mM Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA) 5,7 % Essigsäure (99%-ig) ad 1L Bidest pH; 8,5.
TBS-Puffer	0,05 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) 0,9% NaCl pH: 7,6
DNase-Mix	Der DNase-Puffer und die DNase wurden dem Nucleospin Kit von Machery und Nagel entnommen. 10µL DNase wurden mit 90µL DNase-Puffer versetzt.
Blockpuffer	1% Bovines Serum Albumin (BSA) 5% Succrose in PBS mit 0,05% NaN ₃

Waschpuffer	PBS+0,05% Tween Es wurden 2 l PBS mit 1 ml Tween gemischt.
Karbonatpuffer	0,1M Na ₂ CO ₃ (10,59 g auf 1 l Aqua dest.) und 0,1M NaHCO ₃ (8,4 g auf 1 l Aqua dest) wurden im Verhältnis 1 : 1 gemischt und ein pH-Wert von 9,5 eingestellt.
Hämolysepuffer	8,29 g NH ₄ Cl 0,037g Na ₂ EDTA 0,839 g NaHCO ₃ ad 1L Aqua dest, pH auf 7,3 eingestellt

4.3.2. Medien

RPMI + 10% FCS + P/S	90 % v/v RPMI1640 10% v/v hitzeinaktiviertes (30 min, 54°C), fötale Kälberserum (FCS) 100 u/ml Penicillin 100 mg/ml Streptomycin
----------------------	--

4.3.3. Lösungen

0,9 % NaCl-Lösung	0,9 % w/v NaCl in Aqua bidest
Giemsa-Lösung	0,4 % (w/v) modifiziertes Giemsa in gepuffertem Methanol (pH 6,8) Die Giemsa-Lösung wurde von Sigma bezogen. Vor Gebrauch wurde sie je nach Protokoll mit Aqua dest verdünnt und anschließend gefiltert.
May-Grünwald-Lösung	0,25 % (w/v) May-Grünwald in Methanol Die May-Grünwald-Lösung wurde gebrauchsfertig von Sigma bezogen. Vor Gebrauch wurde sie sterilfiltriert.
Mayer's Hämtoxylin-Lösung	0,1 % (w/v) wurde Hämtoxylin-Lösung gebrauchsfertig von Sigma bezogen

Eosin Y alkoholische Lösung	Enthält Phoxin; wurde gebrauchsfertig als 0,1 %-ige Lösung von Sigma bezogen.
TMB One	Die Lösung enthält 3,3', 5,5' Tetramethylbenzidin und (Farbsubstrat für ELISA) stabilisiertes H ₂ O ₂ und wurde von Biotrend bezogen
Stoppreagenz	Zum Abstoppen der Farbreaktion wurde 2N H ₂ SO ₄ verwendet.

4.4. Medikamente und pharmakologische Agenzien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller/Vertreiber</u>
N2-[(2,2-Diphenylethoxy)acetyl]-L-arginin (SB290157) [Ames RS 2001]	EMD Biosciences
Anti-Maus-C5a Rezeptor Antikörper (Ratte IgG2b) [Shushakova N 2002, Soruri A 2003]	J. Zwirner
Halothan	Eurim-Pharm Arzneimittel GmbH
Ketamin (Ketaminhydrochlorid 10%-ig ;Narketan)	Chassot
Narcoren (Pentobarbital-Natrium, 1,6 g/L)	Merial
Prpofol (Prpofol Lipuro) 2-%ige Emulsion)	Braun
Rompun (Xylazinhydrochlorid 2%-ige Lösung)	Bayer Vital GmbH & Co. KG
sCR1 (TP10) löslicher Komplement Rezeptor 1(sCD35)	Avant Immunotherapeutics, INC.

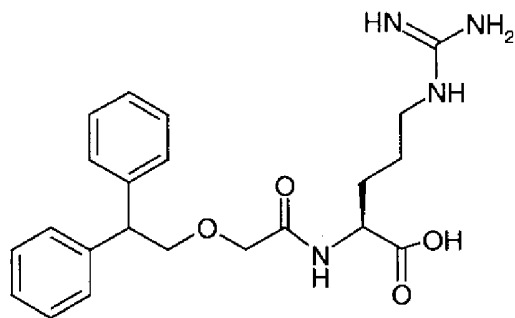


Abb. 8: Strukturformel des C3aR Antagonisten SB290157

4.5. Allergene

Ovalbumin(OVA) Grad V und VI

Sigma

Aspergillus fumigatus Extrakt

Greer Laboratories, INC

Erwerb	Nov. .2001	Aug. 2002	Dez. 2002	
Rohmaterial. Lot.:	My3A-RD1	My3A-RD4	My3A-RD5	
Produkt Lot.:	XMP3-A1	XMP3-A2	XMP3-A3	
Trockengewicht pro Vial	52,07	65,95	40,17	mg/Vial
Proteingehalt pro Vial	9,61	22,56	8,11	mg/Vial
Proteinanteil	0,185	0,342	0,202	
Proteinverhältnis zu XMP3-A1		1,853	1,094	
Verwendung (Kapitelnummer)	4.3.1. – 4.3.3	4.3.4.	4.3.5.	

Die verwendeten Allergenchargen unterschieden sich in ihrem Proteingehalt. Um vergleichbare Allergendosen zu applizieren, wurden die verabreichten Extraktmengen auf den Proteingehalt der Ursprungscharge angeglichen.

4.6. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten weibliche CBA/JNCrj, C57BL/6NCrI und BALB/cNCrI Mäuse. Bei Lieferung waren sie 8 Wochen alt und wogen durchschnittlich 19 g. Alle Tiere wurden von Charles River, Sulzfeld bezogen.

4.7. Behandlungen

Die Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz vom 25.05.98, geändert am 12.04.2001 durchgeführt. Die Versuchstiere wurden unter einem regulären 12 Stunden Tag/Nacht-Zyklus bei einer Temperatur von $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ und konstanter Luftfeuchtigkeit gehalten. Steriles Futter und Wasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Nach ca. einer Woche wurden die Tiere ihrem Gewicht entsprechend randomisiert und entsprechend in Gruppen eingeteilt.

4.7.1. Behandlungsprotokolle

Die verwendeten Behandlungsprotokolle für die Induktion der allergischen Atemwegsentzündung und Atemwegshyperreagibilität unterschieden sich im Detail und sind im Ergebnisteil den entsprechenden Experimenten angefügt.

Gemein sind allen Protokollen eine bis mehrere Sensibilisierungen, eine bis drei Allergenprovokation in bestimmten Zeitabständen und ggf. einer pharmakologischen Behandlung, die generell jeweils 2 Stunden vor jeder Allergenprovokation durchgeführt wurde. I.d.R. 24h bzw. 48h nach der letzten Allergenprovokation wurde die Lungenfunktion unter Methacholinprovokation gemessen. 1h bis 2h danach wurden durch eine Überdosis Narcoren getötet, eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt und die Organe entnommen.

4.7.2. Sensibilisierungen

OVA Modell

Die Sensibilisierung erfolgte mit OVA Grad VI, das an Aluminiumhydroxid als Adjuvans absorbiert wurde. Als Aluminiumhydroxid-Quelle wurde ImjectAlum (Pierce endogen) verwendet. 0,2 ml wurden i.p. appliziert mit einer Dosis von 10 µg OVA zusammen mit 1mg Aluminiumhydroxid pro Tier. Die Tiere der Negativkontrolle erhielten ImjectAlum mit 0,9%iger NaCl-Lösung zu einer Applikationsdosis von 1mg Aluminiumhydroxid verdünnt.

Aspergillus Modell

Für die Sensibilisierung wurde eine Emulsion aus in Saline gelöstem Aspergillus Extrakt und Freund'schen Adjuvans im Verhältnis 2 : 1 hergestellt. Jeweils 0,1 mL wurden s.c. und i.p. appliziert in einer Gesamtdosis von 1,85 µg Protein pro Tier. Die Konsistenz des Allergengemisches und die subkutane Platzierung sorgen für einen Depoteffekt, der das Allergen in einem lang anhaltenden kontinuierlichen Prozess im Organismus freisetzt. Eine Wiederholung der Sensibilisierung war daher in diesem System nicht erforderlich.

4.7.3. Inhalative Allergenprovokation (Challenge)

Die Erzeugung des Ovalbumin- und Aspergillus-aerosols erfolgte mit dem Pari Master Aerosolgenerierungssystem. Die Aerosole wurden aus einer definierten Lösung mit einer Druckluft von mit 20L/min erzeugt und über ein halboffenes Durchflusssystem mit 2L/min verdünnt. Die Mäuse wurden in Gruppen von 3 bis 12 Tieren gleichzeitig in einer Expositionskammer mit einer konstanten Konzentration des Allergenaerosols unter definierten Durchflussbedingungen von 22 L/min provoziert. Die Bestimmung der

Allergenkonzentration in der Inhalationsluft erfolgte während der Provokation gravimetrisch. Zur Kalkulation der inhalierten Allergendosis wurde ein mittleres Atemminutenvolumen der Mäuse von 35 mL/min zu Grunde gelegt.

Zur Erzielung einer Atemwegsdeposition von ca. 8 μ g wurde in dem OVA Modell 12 min lang mit einer 1%-igen OVA-Lösung provoziert. Im Aspergillus Modell erfolgte die Exposition mit einer der Charge angepassten Allergenlösung, die zu einer Proteindeposition von 1,5 μ g pro Tier führte. Die Expositionsdauer war ebenfalls 12 min. Als Lösungsmittel der Allergene für die Aerosolgenerierung wurde physiologische Kochsalzlösung verwendet.

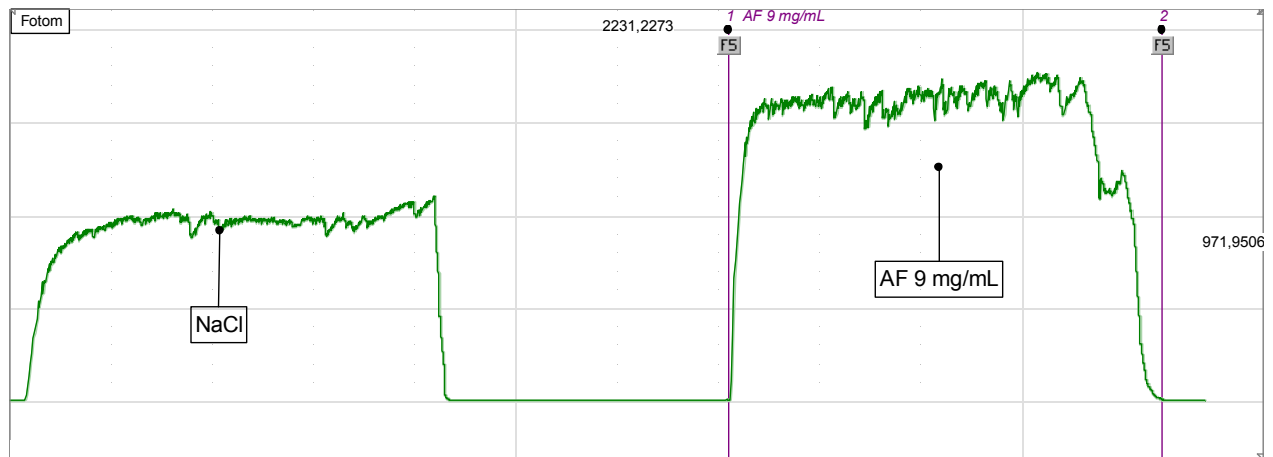


Abb. 9: Fotometersignal der Exposition mit NaCl- und Aspergillus Extrakt-Aerosolen.

4.8. Parameter für die Phänotypisierung des allergischen Asthma

Das Asthma bronchiale ist in der Ausprägung seiner klinischen Symptomatik sehr heterogen. Das primäre diagnostische Merkmal ist eine Atemwegshyperreagibilität, die bei 70% aller Asthmatiker mit einer Atopie assoziiert ist. Dieser auch als bronchiale Überempfindlichkeit bezeichneter Phänotyp lässt sich durch einen Bronchoprovokationstest mit Metacholin diagnostizieren. Ursache für die Ausbildung einer Atemwegshyperreagibilität ist nach heutigem Wissenstand die chronische allergische Entzündung der Atemwege, charakterisiert durch eine Th2 vermittelte Eosinophilie. Als primäre Parameter für die Modellvalidierung und Beurteilung des Therapieerfolges werden daher die AHR und die allergische Entzündung der Lunge gewählt.

Die primären Readouts im Ergebnissteil „Modell-Etablierung“ sind daher auf die AHR und Lungeneosinophilie fokussiert. Im spezifischen Teil „Einfluss der Anaphylatoxine auf die Ausbildung eines asthmatischen Phänotyps“ werden zudem spezielle Charakteristika der allergischen Entzündung untersucht wie Zytokinprofil und Genexpression.

4.9. Lungenfunktionsmessung

4.9.1. Lungenfunktionsmessung im Headout System.

Zur Bestimmung der Atemwegsreagibilität wurde die Lungenfunktion der Tiere im Headout System 24h nach der letzten Allergenprovokation bodyplethysmographisch unter Verwendung des Mess-Auswertesystems Hem 3.4 der Firma Notocord gemessen. Die Provokationsstufen wurden ausgehend von Methacholinlösungen in den Konzentrationen von 2.5 bis 40 mg/mL erzeugt. Die Konzentrationsbestimmungen der Inhalationsluft erfolgten während der Methacholinprovokation mit Hilfe eines Reinluftmantel-Aerosolphotometers. Dieses Photometer wurde zuvor gravimetrisch kalibriert. Unter Verrechnung des Minutenvolumens der Tiere kann damit die aufgenommene Menge des Aerosols während der Verneblungsphase über eine Eichgerade für jedes Tier individuell kalkuliert werden. Die Expositionszeit der einzelnen vernebelten Methacholinkonzentrationen bzw. der Lösungsmittelkontrolle (physiologische NaCl-Lösung) betrug jeweils 90 Sekunden. Der Zeitraum zwischen den einzelnen Verneblungsstufen betrug mindestens 3 min., oder bis zum deutlichen Abklingen der lungenphysiologischen Reaktion auf den Methacholinreiz. Als Parameter für eine Bronchokonstriktion wurde die EF50 (Expiratorischer Fluss bei halbmaximalem Expirationsvolumen [Glaab T 2001] benutzt. Beim Erreichen eines Abfalls der EF50 um mindestens 50% vom Basalwert wurde der Provokationstest beendet.

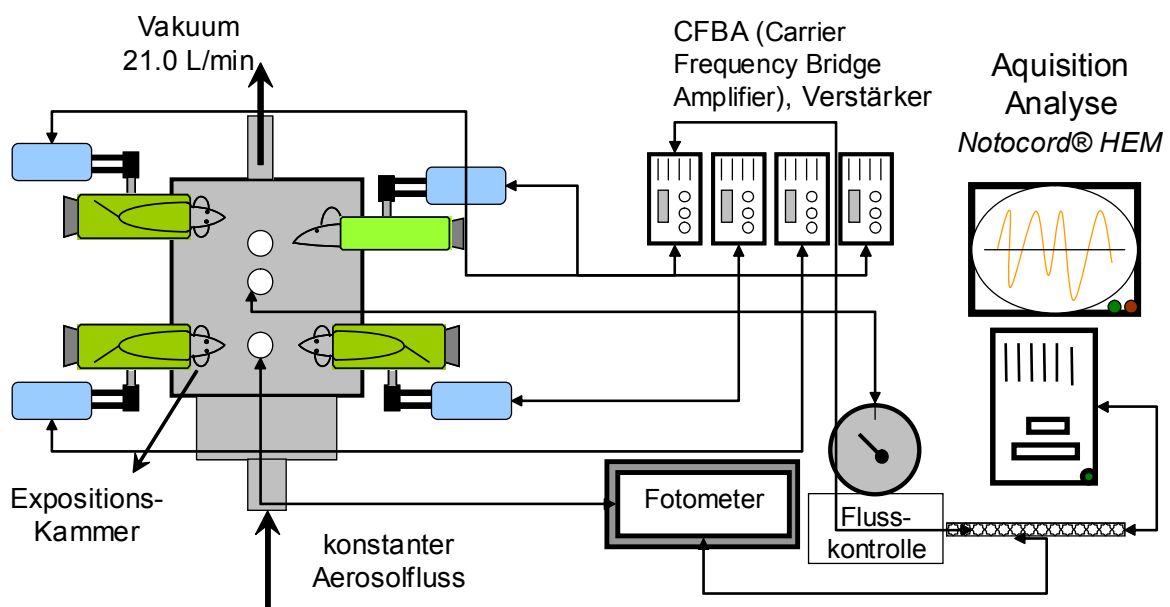


Abb. 10: Übersichtszeichnung des Headout Systems

Dargestellt ist die Aerosolkammer mit vier Plethysmographen und Druckaufnehmern, deren Signal im CFBA verstärkt wird. Diese Daten werden zusammen mit den Daten der Photometermessung über ein computergestütztes System analysiert. Die Konstanz des Aerosolflusses wurde mit einem Flussmessgerät (DryCal) überprüft.

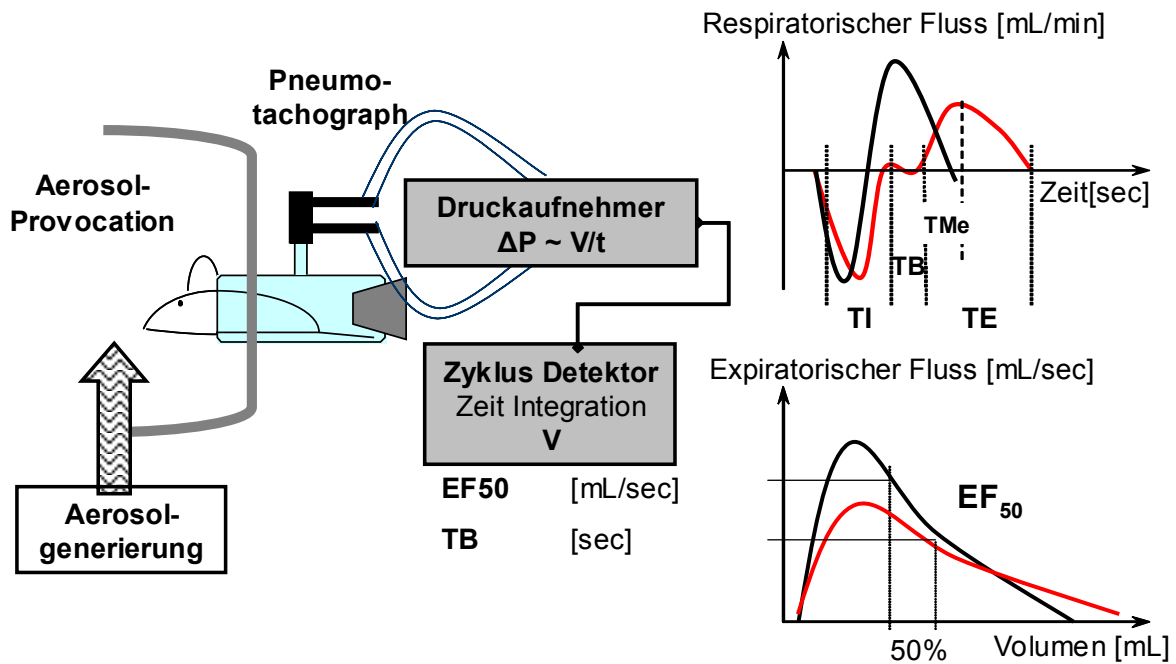


Abb. 11: Messprinzip des Headout Systems

Die durch die Respiration erzeugten Druckunterschiede im Plethysmographen werden über einen Pneumotachographen (Differenzdruckwandler) mittels eines Druckaufnehmers erfasst. Das Signal des Differenzdruckwandlers ist der Atemstromstärke proportional.

$$\mathbf{AZV} = \frac{\Delta P \times e}{t} \quad \text{AZV} = \text{Atemzeitvolumen (V}_T\text{)}, \Delta P = \text{Druckdifferenz, } e = \text{Eichkonstante,}$$

t = Zeit. Ein nachgeschalteter Zyklus Detektor liefert durch die Integration der Atemstromstärke (Atemfluss) über die Zeit das Atemzugvolumen und die Atemfrequenz (f). Die gleichzeitige Messung von Atemstromstärke und Volumen ermöglicht die Aufzeichnung von Volumen-Zeit- und Fluss-Volumen-Kurven.

Aus den Flussdiagrammen lassen sich mit einer geeigneten Analyse-Software Lungenfunktionsgrößen wie Midexpiratorischer Fluss (EF50), Time of Brake (TB) oder Expirations- und Inspirationszeiten berechnen. Unter pathophysiologischen Bedingungen ergeben sich charakteristische Veränderung der Atemsignale (dargestellt durch rote Kurven, vgl. Abb. 11). Die Ausatmung ist verlängert und abgeschwächt und es kommt zur Ausbildung einer Time of Brake.

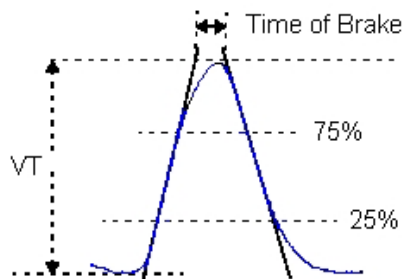


Abb. 12: Berechnung der Time of Brake.

Die Time of Brake wird als Zeit-Differenz, die zwischen den Schnittpunkten des maximalen Atemzugvolumens (V_T) mit den Regressionsgeraden, die die 25%- und 75%-Perzentile auf den Schenkeln der Volumenkurve durchlaufen berechnet. Physiologisch ist sie ein Parameter für eine veränderte neuronale Reaktion auf sensorische Reize.

Geräteeinstellungen der Lungenfunktionsmessung an der wachen Maus

Allergische Frühreaktion (EAR)

Aerosole:	Aspergillus Extrakt bzw. OVA; Referenzsubstanz: NaCl-Lsg.
Dauer der Exposition	12 min
Aerosolgenerierung	Pari Master, Druckluft 20 L/min
Verdünnungsluft	2 L/min
Aerosolfluss	22 L/min
Lösungskonzentration:	AF bzw. OVA in NaCl (1- 2%), je nach Charge
Fluss am Fotometer:	0,29 L/min

Methacholinprovokation (Atemwegsreagibilität)

Aerosole:	Methacholin; Refferenzsubstanz: NaCl-Lsg.
Lösungskonzentration/Stufen:	MCh in NaCl-Lsg. (2,5 bis 40 mg/mL)
Dauer der Exposition	90 sec
Aerosolgenerierung	Pari Master, Druckluft 20 L/min
Verdünnungsluft	2 L/min
Aerosolfluss	22 L/min
Fluss am Fotometer:	0,29 l/min

4.9.2. Lungenfunktionsmessung an der intubierten Maus

Aerosolgenerierung

Im Gegensatz zum Headout System erfolgte die Aerosolexposition bei intubierten Mäusen mit trockenen Aerosolen über ein Dosiskontrollsystem. Die Aerosole wurden über eine Zweistoffmikrozerstäuberdüse generiert, dessen Zuführung der Substanzlösung und Dispersionsluft über einen Bronchy Typ III reguliert wurde. In einer nachfolgenden Mischkammer wurde das Aerosol-Luftgemisch getrocknet, nachfolgend Narkosegas und Sauerstoff zugesetzt und dem Tier über ein halboffenes Unterdrucksystem unter konstantem Durchflussbedingungen als Atemluft zugeführt.

Die Aerosolkonzentration wurde über computergesteuerte Massflowcontroller (MFC) durch Regulation der Verdünnungsluft dem Minutenvolumen des Tieres angepasst, um eine definierte Dosis in einer vorgegebenen Zeit zu applizieren. Für die Methacholinprovokationen wurden Dosisstufen von 0,1 bis 0,5 μg verwendet.

Die Expositionszeit wurde jeweils auf 60 sec gesetzt und das Aerosol ausgehend von einer 2% Methacholinlösung in WasserG generiert.

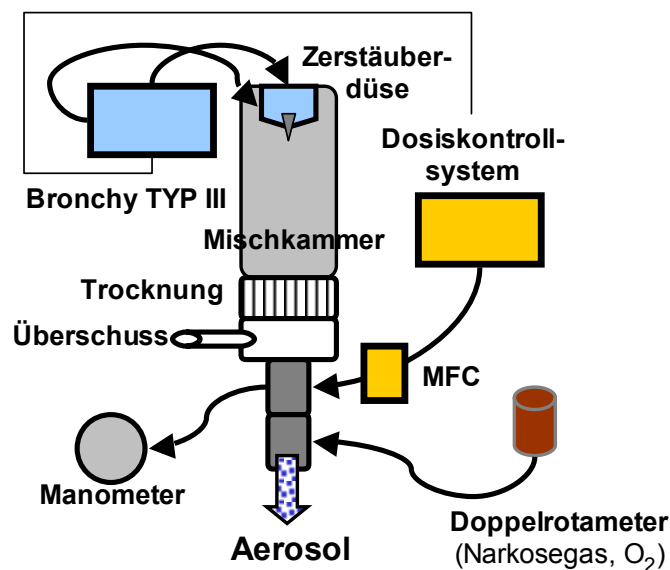


Abb. 13: Geräteaufbau der Aerosolgenerierung und Dosiskontrolle für die intubierte Maus. (Näheres siehe Text)

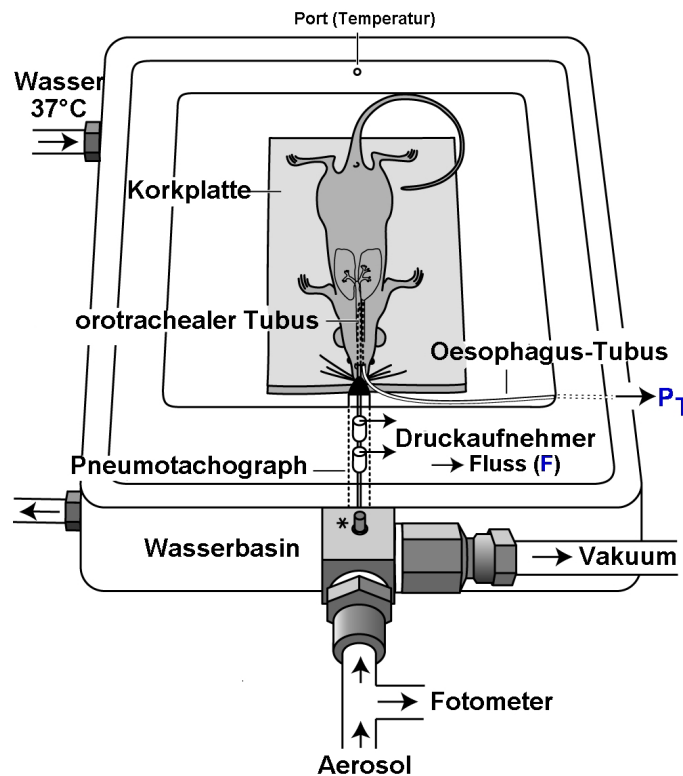


Abb. 14: Bodyplethysmograph für die intubierte Maus.

Das narkotisierte Tier ist stabil auf einer Korkplatte gebettet, die innerhalb Plethysmographen liegt, der zur Erwärmung mit einem Wasserkreislauf durchzogene wird. Über einen orotracheal platzierten Tubus atmet die Maus spontan Luft aus einem konstanten Durchfluss von 1 L/min, die mit Aerosol, Narkosegas und Sauerstoff angereichert werden kann.

Die Aerosolkonzentration am Tier wird über ein Fotometer kontrolliert. Über den Trachealtubus wird das Atemsignal abgeleitet und der Transpulmonale Druck über einen Oesophaguskatheter gemessen.

Lungenfunktionsparamter Resistance (R_L) und dynamische Compliance (C_{dyn})

Bei der intubierten Maus werden Atemfluss und -frequenz direkt über die Druckdifferenzen am Trachealtubus abgeleitet. Zusätzlich wird über einen Oesophaguskatheter der transpulmonale Druck (P_{TP}) gemessen. Der transpulmonale Druck ergibt sich aus der Differenz zwischen Alveolardruck und Intrapleuraldruck ($P_A - P_{pl}$). Der intrapleurale Druck wird indirekt mit einer Ösophagus-Ballonsonde gemessen, da die Druckverhältnisse im unteren Drittel des Ösophagus die intrapleuralen Druckverhältnisse recht genau widerspiegeln; der Alveolardruck entspricht dem Umgebungsdruck.

Während der Atmung sind sowohl elastische als auch visköse Atemungswiderstände zu überwinden. Die Elastischen Widerstände werden primär durch die elastischen Fasern der Lunge bestimmt und folgen bei langsamer Atmung dem Hook'schen Gesetz.

Darüber hinaus wirkt die Oberflächenspannung der Alveolen der Atmung entgegen, diese ist aber maßgeblich durch Surfactant-Proteine um das 10-fache reduziert und damit vernachlässigbar. Die viskösen Atemungswiderstände werden vom Strömungswiderstand und den nicht-elastischen Gewebswiderständen (Deformation) von Lunge und Thorax bestimmt. Trägheitswiderstände sind vernachlässigbar klein. Der Atemwegswiderstand wirkt der Atemwegsströmung entgegen, die überwiegend laminar ist. Der Strömungs-/Atemwegswiderstand ist bei laminarer Strömung abhängig von dem Radius (r) und der Länge (l) der leitenden Atemwege, sowie von der Luftviskosität (η).

Nach dem Hagen-Poiseuille'schen Gesetz ist der Atemwegswiderstand oder die Resistance (R) umgekehrt proportional der vierten Potenz des Radius, es gilt:

$R = \frac{\eta \cdot l \cdot 8}{r^4 \cdot \pi} = \frac{\Delta P}{\dot{V}}$ Die Resistance wird normalerweise von Trachea und großen Bronchien bestimmt, da die Gesamtoberfläche mit zunehmender Verzweigung stark zunimmt. Nach der Isovolumetrischen Methode werden bei einem definierten Abschnitt der Volumenkurve, i.d.R. 50% des Atemzugvolumens (V_T), die Lungenresistance (RL) aus dem Quotienten von Transpulmolardruck-Differenz (ΔP_{TP}) und Atemfluss-Differenz (ΔF) berechnet.

$R_{AW} = \frac{\Delta P_{TP}}{\Delta F} \left[\frac{cmH_2O \times sec}{L} \right]$ Da auch die Trachealkanüle einen Strömungswiderstand besitzt wurde dessen berechneter Wert als Kanülenwiderstand von 0,63 (cmH₂O×sec)/L von den Resistancewerten abgezogen.

Als Maß für die elastische Dehnbarkeit der Lunge (Volumendehnbarkeit) verwendet man die sog. Compliance. Die Compliance der Lungen ergibt sich aus der Volumenänderung der Lunge, die durch eine bestimmte Änderung des transpulmonalen Drucks bewirkt wird und ist als reziproker Wert des Dehnungswiderstandes definiert ist. $C_{dyn} = \Delta V / \Delta P_{TP}$ [mL/cmH₂O] Die Compliance wird messtechnisch als dynamische Compliance (C_{dyn}) berechnet. Nach isovolumetrischer Methode errechnet sich ihr Wert durch die Beziehung:

$$C_{dyn} = \frac{2V_{ref}}{P_1 + P_2 - R(F_1 + F_2)} \text{ [mL/cmH}_2\text{O]}$$

V_{ref} ist gleich dem Volumen auf einer festgelegten Perzentile der Volumenkurve, die den Oesophagusdrücken P1 und P2 zugeordnet sind.

Ist die Perzentile %0% von VT max, ist $2V_{ref} = V_T$.

Geräteeinstellungen und Narkosen Lungenfunktionsmessung an der intubierten Maus**Allergische Frühreaktion (EAR)**

Aerosole:	Aspergillus Extrakt bzw. OVA; Referenzsubstanz: WasserG
Dauer der Exposition	10 min
Narkose:	35mg/kg Pentobarbital + 0.8% Halothan + 30% O ₂
Aerosolgenerierung/Düse:	Bronchy Typ III; Düse DLS, maximaler Fluss bei 4 bar Überdruck: 3,0 L/min
Bronchy:	2.0(Z) + 0 (V) L/min; Pumpe ca. 50-100 Hz; Konzentrations- regulierung erfolgte über Änderung der Pumpendrehzahl und
Z: Zerstäuberluft	MFC-Verdünnungsluft
V: Verdünnungsluft	MFC-Verdünnungsluft
Lösungskonzentration:	AF bzw. OVA in WasserG (1- 2%), je nach Charge
Dosis-Programm:	137,6 (19.06.03)
Temp. der Mischkammer:	40°C
Fluss am Oxyanga-Monitor:	0,18 L/min
Rotameterfluss O ₂ :	0,3 L/min = 30 % O ₂
Rotameterfluss P-Luft:	0,2 L/min wg. Halothan 0,8%
Fluss am Fotometer:	0,29 L/min
Vakuum-Überschuss:	5 Pa
Endaerosolfluss am Tier:	0,98 L/min

Methacholinprovokation (Atemwegsreagibilität)

Aerosole:	Methacholin
Stufen:	0,1, 0,2, 0,3, 0,4, und 0,5 µg
Dauer der Exposition	60 sec pro Stufe
Narkose:	2% Propofol (1:3) (65 mg/kg) + 2,5% Halothan + 40% O ₂
Vernebler/Düse:	Bronchy Typ III; Düse DLS, maximaler Fluss bei 4 bar Überdruck: 5,0 L/min
Bronchy:	4.0(Z) + 6.0 (V) L/min, L/min;
Z: Zerstäuberluft	Konzentrations-Regelung erfolgte über Änderung der
V: Verdünnungsluft	Pumpendrehzahl und MFC-Luft
Lösungskonzentration:	5% in WasserG,
Dosis-Programm:	137,6 (19.06.03)
Temp. in d. Mischkammer:	50°C
Fluss am Oxyanga-Monitor:	0,18 L/min
Rotameterfluss O ₂ :	0,4 L/min = 40 % O ₂
Rotameterfluss P-Luft:	0,2 L/min durch Halothan 2,5%
Fluss am Fotometer:	0,29 L/min
Vakuum-Überschuss:	5 - 10Pa
Endaerosolfluss am Tier:	0.98 L/min

4.9.3. Auswertung

Aus den Messdaten der EF50 bzw. Resistance oder Compliance wurden für jedes Tier Dosiswirkungskurven erstellt, die sich auf die kumulative individuelle Methacholindosis beziehen. Aus diesen Dosis-Wirkungskurven wurden ED100 oder ED150 Werte für die dosisabhängige Zunahme von Resistance bzw. Compliance oder entsprechend ED50 Werte für die dosisabhängige Abnahme der EF50 bei wachen Mäusen für jedes Tier individuell ermittelt.

4.10. Gewinnung des Probenmaterials

Ein bis zwei Stunden nach der Lungenfunktionsmessung wurden die Versuchstiere mit einer Überdosis Pentobarbital-Natrium (Narcoren 1:5, 0,25 - ,030 ml pro Tier [10 µl pro g KGW]) durch intraperitoneale Injektion eingeschläfert.

4.10.1. Blut

In 1 mL Spritzen wurden 50 µL EDTA 0,5 M vorgelegt und Blut über die Vena cava inferior entnommen. 50 µL Blut wurden mit 10 mL Hämolysepuffer versetzt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Blutzellen bei 1200 rpm 10 min. lang zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 0,5 mL RPMI + 10% FCS resuspendiert. Die Leukozytenzellzahl in der Suspension wurde in der Neubauerzählkammer bestimmt. Bis zur unten beschriebenen Anfertigung von Zytospots wurden die Zellen auf Eis gestellt. Vom restlichen Blut wurde das Plasma durch Zentrifugation (10 min., 1200 rpm) für optionale Untersuchungen gewonnen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Für optionale molekularbiologische Untersuchungen wurde das Zellpellet mit 500µL Lysispuffer versetzt und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

4.10.2. Bronchoalveolarlavage (BAL)

Der Brustkorb wurde eröffnet und die Trachea freigelegt. Über einen Einschnitt im oberen Abschnitt der Trachea wurde eine 18G Venenverweilkanüle eingeführt. Mit zweimal 0,8 mL eisgekühlter 0,9%-iger NaCl-Lösung wurde die Lunge daraufhin lavagiert. Die Lavage wurde 10 min. bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -20°C weggefroren. Das Zellpellet wurde mit 500µL Hämolysepuffer versetzt, 10 min bei RT inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen und erneut bei 120 rpm 10 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurden in 0,5 mL RPMI + 10% FCS + P/S resuspendiert.

Die Zellzahlen wurden in der Neubauerzählkammer bestimmt und die Zellen bis zur Anfertigung von Zytospots auf Eis gehalten.

4.10.3. Lunge

Die beiden unteren rechten Lungenlappen wurden sorgsam herauspräpariert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Über dem oberen rechten Lungenlappen wurde der Bronchus mittels einer Bulldock-Klemme verschlossen und der linke Lungenflügel mit ca. 0,5 mL 1:4 in Saline verdünntem OCT gefüllt, der rechte Hauptbronchus mit Gaze zugebunden und die Lunge in purem OCT eingebettet, schockgefroren und für spätere histologische Analysen bei -70°C gelagert.

4.11. Analysen an der BAL

4.11.1. Mikroskopische Zelldifferenzierung nach Pappenheimfärbung

Prinzip

Bestimmte Zellkompartimente besitzen einen dominierenden Gehalt an sauren oder basischen Molekülen. Saure Bestandteile der Zelle mit negativer elektrischer Ladung, wie die DNA der Kerne und die RNA der Nukleoli und des Zytoplasmas, sind basophil und färben sich mit basischen Farbstoffen wie Giemsa in wässriger Lösung bläulich. Viele zytoplasmatische Proteine sind dagegen azidophil und färben sich mit dem sauren Farbstoff May-Grünwald rot an. Zytoplasma- und Kernverhältnisse sowie charakteristische Granula der Zellen sind auf diese Weise mikroskopisch charakterisierbar und repräsentieren die klassischen morphologischen Merkmale für hämatologische Differenzierungen

Durchführung

1×10^5 Zellen aus der BAL bzw. dem Blut wurden durch Zentrifugation (500 rpm, 5 min.) auf einem Objektträger fixiert und luftgetrocknet. Die getrockneten Zytospots wurden 3 min. lang in May-Grünwald-Lösung gefärbt und anschließend mit Wasser gründlich gespült. Danach wurde für 10 min. mit Giemsa-Lösung gefärbt und überschüssige Lösung mit Aqua dest. abgespült. Unter 630facher Vergrößerung wurden jeweils 500 Zellen lichtmikroskopisch in Monozyten/Makrophagen, neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten und Lymphozyten differenziert.

4.11.2. Bestimmung des Gehaltes an Eotaxin-2, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 in der BAL mittels ELISA

Prinzip

Der ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) nutzt die Bindungsspezifität von Antikörpern zum quantitativen Nachweis eines Antigens in einer Probe. Hierzu wird ein antigenspezifischer Antikörper (der sogenannte capture antibody, CAB) im Überschuss unspezifisch an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte gebunden. Das in der Probe enthaltene Antigen wird spezifisch gebunden und kann mit einem zweiten, Biotin-gekoppelten Antikörper, dem sogenannten Detektionsantikörper, markiert werden. Die Antikörperbindung wird beim ELISA mit Hilfe einer Farbreaktion nachgewiesen, indem dem Ansatz Streptavidin-gekoppelte Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) zugesetzt wird. Das Streptavidin bindet an das Biotin der Antigen-Antikörper-Komplexe. Nach Zugabe von H_2O_2 wird TMB als Farbsubstrat durch die HRP umgesetzt. Es entsteht eine quantitative Umsetzung des Substrates zu einem löslichen Farbstoff. Nach Abstoppen der Reaktion durch Denaturierung des Enzyms mit z.B. Schwefelsäure, kann photometrisch über die optischen Dichte (OD) bei 450 nm bestimmt werden. Ein quantitativer Nachweis des Antigens in der Probe erfolgt durch Abgleich mit einer Standardreihe.

Durchführung

Der quantitative Nachweis der löslichen Proteine erfolgte unter Verwendung der entsprechenden ELISA Duo Sets von R&D. Die Durchführung erfolgte nach Anweisung des Hersteller/Vertreibers. Der capture antibody wurde 1:180 verdünnt und je 100 μ L in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte pipettiert. Hiernach wurde über Nacht in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte viermal mit 0,05%igem Tween in PBS gewaschen und durch Ausschlagen der Platte getrocknet.

300 μ L Block Puffer wurden in jede Vertiefung pipettiert, um unspezifische Bindungen abzublocken, und eine Stunde inkubiert. Es folgte erneutes viermaliges Waschen. Jeweils 100 μ L der zu untersuchenden Probe wurden in Doppelbestimmungen in die Vertiefungen pipettiert. Zeitgleich wurde eine Verdünnungsreihe des Antigenstandards auf die Platte aufgebracht. Anschließend wurde für 2 Stunden in der feuchten Kammer inkubiert. Die Probe beziehungsweise der Standard wurden durch achtmaliges Waschen mit Tween in PBS aus den Vertiefungen entfernt, so dass nur spezifisch an den CAB gebundenes Antigen zurückblieb. Der Detektionsantikörper wurde 1:180 verdünnt und 100 μ L in jede Vertiefung gegeben, wo er 2 Stunden inkubiert. Es folgte erneutes viermaliges Waschen mit Tween/PBS. Die streptavidin-gekoppelte Meerrettichperoxidase wurde 1:200 verdünnt und 100 μ L 20 min. im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem viermaligem Waschen wurde TMB in

die Vertiefungen pipettiert. Die Farbreaktion fand im Dunkeln statt, nach ca. 10 min. wurde sie durch Zugabe von 50 μL 2N H_2SO_4 abgestoppt und die ODs im ELISA-Reader photometrisch vermessen.

4.11.3 Bestimmung der Konzentrationen von C3a desarg und C5a desarg mittel Radio-Immunoassay (RIA)

4.11.3.1. Messung des Gehaltes an C3a desarg und C5a desarg in der BAL

Prinzip

Analog zum ELISA beruht das Prinzip des Radioimmun Assays auf der Spezifität eines Antikörpers zu einem bestimmten Protein. Anders als beim ELISA funktioniert der Nachweis nicht über eine quantitativ gekoppelte Farbreaktion, sondern über einen spezifischen Antigen-Antikörperkomplex, der als Präzipitat vom Reaktionsansatz isoliert wird und dessen radioaktive Aktivität als Maß für den Gehalt des Zielproteins gemessen werden kann. Das Messsystem beruht auf einer kompetitiven Verdrängung eines in einer definierten Menge eingesetzten radioaktiv markierten Zielproteins (tracer) durch das epitopidentische Protein der Probe. Die Fällung (Präzipitatbildung) erfolgt dann mit einem sekundären Antikörper der gegen den ersten gerichtet ist. Die Menge des Zielproteins ist damit umgekehrt proportional zur Radioaktivität des Präzipitats. Die Konzentration des unmarkierten Zielproteins wird dann durch Interpolation mit einer Standardreihe berechnet.

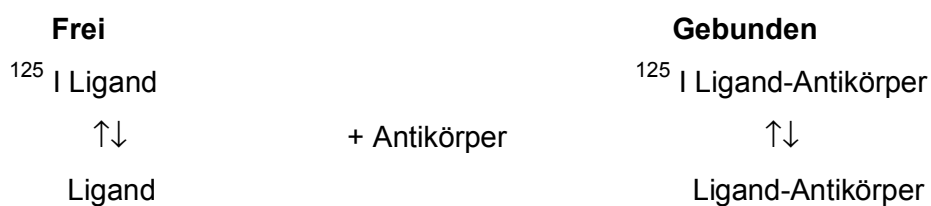


Abb. 15: Schema der kompetitiven Bindung eines Liganden (Zielprotein) an einen spezifischen Antikörper in Wechselwirkung mit dem entsprechenden radioaktiv markiertem Liganden, in diesem Fall markiert mit dem Isotop Jod 125.

Durchführung

Der RIA wurde entsprechend dem Protokoll des Herstellers/Vertreibers durchgeführt.

4.11.3.2. Überprüfung des RIA's für humanes C3a desarg und C5a desarg auf Kreuzreaktivität zu den entsprechenden murinen Proteinen

Prinzip

Für die quantitative Bestimmung der Anaphylatoxine in biologischen Proben steht bis heute für die Maus kein spezifisches Testsystem zur Verfügung. Es existiert jedoch eine spezifischer RIA für die homologen humanen Proteine. Auf Grund der Sequenzhomologie der Anaphylatoxinproteine zwischen Mensch und Maus ist eine Kreuzreaktivität der RIA's nicht unwahrscheinlich (siehe Tabelle X.). Das heißt, die in dem Kit verwendeten spezifischen Antikörper binden eventuell die gleichen oder ähnliche Epitope mit gleicher oder immerhin ausreichender Affinität.

Um eine Kreuzreaktion zu überprüfen wurden daher Verdrängungsexperimente für die Bindung des Antikörpers an das Protein aus dem humanem Standard des Kits gegenüber dem kompetitiven murinen Protein aus dem Probenmaterial durchgeführt.

	C3a	C5a	C3aR	C5aR	C5L2
homo sapiens/ mus musculus	67,9%	64,4%	64,3%	66,8%	61,0%
homo sapiens	P01024	P01031	NP_004045	NP_001727	NP_795886
mus musculus	P01027	P06684	NP_033909	NP_031603	BAC35303

Tabelle. 5: Aminosäuresequenz-Identitäten in Prozent der Anaphylatoxine und ihrer Rezeptoren zwischen Mensch und Maus. Die Quellen entnommen aus der NCBI Proteindatenbank sind angegeben. Die Sequenzvergleiche wurden durch paarweisen Sequenzvergleich über eine online Software aus dem FASTA Sequenz Analyse Programm durchgeführt (http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html).

Durchführung

Die Proben wurden entsprechend dem Protokoll des Kits vorbehandelt. Für die Durchführung wurden Proben benutzt, die zuvor ein vermeintlich positives Signal gaben. Die murine Probe wurde dann mit einem Standard aus dem Kit in ähnlicher Größenordnung nach unten

aufgeführtem Schema verdünnt, bzw. seine Verdünnungsreihe mit der reziproken Verdünnungsreihe des Standards aufgestockt (Tabelle 6).

Als Referenz wurde eine identische Verdrängungsreihe mit einer humanen Probe durchgeführt. Als humane Quelle der Anaphylatoxine wurde humane BAL oder humanes Serum verwendet.

Verdünnungsstufe	1	2	3	4	5	6	7
Standard	1	0,8	0,6	0,5	0,4	0,2	0
Probe	0	0,2	0,4	0,5	0,6	0,8	1

Tabelle 6: Verdünnungsschema für die Verdrängungsexperimente von Probe gegen Standard.

Für die Quantifizierung der Ansätze wurde im Folgenden nach dem Protokoll des Kits verfahren. Für die Beurteilung einer kreuzeraktiven Bindung wurden die gemessenen Konzentrationen aus den Verdrängungsreihen mit denen aus entsprechenden Verdünnungsreihen des Standards verglichen.

4.12. Analysen am Blut

4.12.1. Bestimmung der Gesamt-IgE Konzentration im Plasma mittels ELISA

Für Bestimmung der IgE Konzentration wurde der OptEIA Kit von BD Biosciences verwendet. Capture und Detektionsantikörper wurden je 1 : 200 verdünnt eingesetzt.

Für die Durchführung des Test's war eine Vorverdünnung der Proben von 1 : 200 mit Kochsalzlösung erforderlich.

Zum Prinzip und der Durchführung des ELISA's siehe Kapitel 4.10.2.

4.13. Analysen an der Lunge

4.13.1 Quantitative Bestimmung des RNA-Gehalts der Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR in Halblungenlysaten.

4.13.1.1. RNA-Isolierung mit dem Nucleo Spin RNA II-Kit von Machery-Nagel

Prinzip

In einem stark denaturierendem Lysis-Puffer, der Guanidin-Isothiocyanat (GITC) und β -Mercaptoethanol enthält, wird biologisches Probenmaterial homogenisiert. Das Homogenisat wird mit Ethanol konditioniert und auf eine Säule gegeben. Die Säule enthält eine Membran, die zum Hauptbestandteil aus einem Silikat-Gel besteht, an die RNA-Moleküle einer Mindestgröße von 200 Basen effektiv binden. In mehreren Zentrifugationsschritten werden Kontaminationen gewaschen und die RNA anschließend mit Aqua dest eluiert. Der RNA-Gehalt des Eluats wird photometrisch bestimmt. Eine OD von 1,0 resultierend aus der Messung bei 260 nm entspricht dabei einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/mL}$.

Durchführung

Die RNA-Isolierung wurde nach dem Protokoll des Kits durchgeführt. Die Probenvorbereitung wurde wie nachfolgend angeführt variiert. Um eine Verunreinigung der isolierten RNA durch DNA zu minimieren, wurde die Probe wie unten beschrieben einem DNA-Verdau unterzogen.

4.13.1.2. RNA-Isolierung aus Lungenlysat

100 ml Lungenlysate wurden mit 400 ml RLT-Puffer und 500 μL Ethanol 70% versetzt und mittels Ultraschall homogenisiert. Die vollständige Lyse des Gewebes ist bei dieser RNA-Isolierungstechnik, die auf der Trennung über die Passage durch eine Mikromembran basiert, der limitierende Faktor für die RNA-Ausbeute. Die Flüssigkeit wurde in zwei Schritten auf die Membransäule gegeben. Die weiteren Isolierungsschritte wurden nach dem Protokoll des Kits durchgeführt.

4.13.1.3. DNA-Verdau

70 µL Eluat wurden mit 95 µL DNase-Mix versetzt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µL RLT-Puffer und 350 µL Ethanol 70% zugegeben und die RAN über eine neue Säule isoliert. Die RNA-Isolierung wurde nach Anweisung des Hersteller/Vertreibers wiederholt.

4.13.1.4. cDNA-Synthese aus RNA

Prinzip

Die genetische Information der Retroviren ist in RNA festgelegt. Für ihre Vermehrung durch die Wirtszelle ist eine Umwandlung in die entsprechende DNA erforderlich. Retroviren benutzen dafür das Enzym RNA-abhängige Reverse Transkriptase. Mit klonierten und aufgereinigten Reversen Transkriptasen lassen sich isolierte RNA-Abschnitte unter den katalytischen Bedingungen des Enzyms und nach Zugabe eines Random-Primers, Roche, in cDNA umschreiben. Die gewonnene cDNA kann anschließend für PCR-Amplifikationen eingesetzt werden. Die verwendete Omniscript Reverse Transkriptase ist ein rekombinantes, heterodimeres Enzym, das in *E. coli* exprimiert wird und die folgenden Aktivitäten aufweist: RNA-abhängige DNA-Polymerase -, RNA:DNA-Hybridabhängige Exoribonuklease - (RNase H) und eine DNA-abhängige DNA-Polymerase -Aktivität.

Durchführung

0,1 µg der aus der Lunge gewonnenen RNA wurde mit Omniscript, Qiagen, nach Anleitung des Kits in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

4.13.1.5. Quantitative Realtime-PCR

Prinzip

"Beginning with a single molecule of the genetic material DNA, the PCR can generate 100 billion similar molecules in an afternoon." In diesem Auszug aus Scientific American beschreibt Kary Mullis seine 1983 entwickelte Methode zur Amplifikation von DNA, für die er 1993 mit dem Nobel Preis für Chemie ausgezeichnet wurde. Die Methode basiert auf der Eigenschaft der DNA-Polymerase aus thermophilen Bakterium, z.B. *Thermophilus aquaticus* auch bei hohen Temperaturen nicht inaktiviert zu werden. Für die Amplifikation wird die DNA auf 95°C erhitzt und dabei in Einzelstränge überführt. Beim kontrollierten Abkühlen auf z.B. 68°C lagern sich komplementäre DNA-Fragmente wieder zusammen, und auch die der Reaktion zugesetzten spezifischen Startsequenzen (primer) binden an die Ursprungs-DNA. Die Elongation dieser Startsequenzen durch der Probe beigesezte

Desoxynukleosidtriphosphate erfolgt bei 72°C durch die Polymerase. Der Zyklus aus Denaturierung, Startsequenzanlagerung und Elongation wird wiederholt, und die spezifische DNA-Sequenz kontinuierlich vermehrt. Zwischen die Doppelstränge der so synthetisierten DNA lagert sich der Fluoreszenzfarbstoff ein, so dass fortlaufend nach jeder Hybridisierung der aktuelle Produkt-DNA-Gehalt in der Probe gemessen werden kann.

Jede PCR-Reaktion weist einen exponentiellen Verlauf auf, der meist nur sehr kurz ist.

Für die Quantifizierung des PCR-Produktes in der klassischen PCR ist es wichtig, die Reaktion vor dem Erreichen der Plateau-Phase zu beenden, was häufig zu Schwierigkeiten führt. Bei der Quantifizierung mit dem LightCycler™-System ist dagegen der Zeitpunkt entscheidend, wann das Fluoreszenz-Signal aus dem Hintergrund-Rauschen hervortritt. Bei einer halblogarithmischen Darstellung kann dann der Beginn der exponentiellen Phase sehr leicht an der Linearität der Kurve erkannt werden. Im Auswerteprogramm wird durch die „fit point“ Analyse, der Hintergrund durch die Verschiebung einer horizontalen Linie, der sog. „noise band“, festgelegt. Aus der Interpolation einer Geraden, die über dem Hintergrund liegen, werden dann die Schnittpunkte mit der „noise band“ als sog. crossing points errechnet. Da das Signal umso früher aus dem Hintergrund-Rauschen hervortritt, je mehr template-DNA in der Probe enthalten ist, kann der crossing point für eine erste Abschätzung der DNA-Menge herangezogen werden. Um genaue relative Quantifizierungen durchzuführen, werden Eichgeraden aus Verdünnungsreihen der Target- und des Referenz-Produktes generiert. Proben aus diesen Eichreihen laufen als Qualitätskontrolle in jeder PCR mit. Mit dem Programm RelQuant werden aus den crossing points der Amplifikationen durch Abgleich mit den Eichreihen, der Target und dem housekeeping- Referenz das normalisierte Verhältnis an Referenz- und Target-DNA in der Probe berechnet. Als housekeeping-gene wurde die Porphobilinogendeaminase (PBGD) gewählt. Sie ist ein Schlüsselenzym bei der Synthese von Tetrapyrrolen wie Häm und Chlorophyll, ubiquitär und unreguliert.

Zusätzlich liefen die entsprechenden RNA-Proben in angeglicherer Konzentration zu den umgeschriebenen cDNA-Produkten als Kontrolle für eine Verunreinigung durch genomische DNA mit. Dies wurde erforderlich, da für die Anaphylatoxin Rezeptoren keine intronüberspannenden Primer generiert werden konnten, und trotz verbessertem DNA-Verdau z.T. Amplifikate aus genomischen Anteilen auftauchten. Diese Signale aus genomischen Verunreinigungen wurden toleriert, sofern sie unter 0,5% des mRNA Signals lagen.

Durchführung

Die PCR wurde mit dem LightCycler, Roche, in LightCycler Capillaries, Roche, durchgeführt. Hierbei wurde das LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I –Kit, Roche, nach Anleitung verwendet.

Temperaturzyklen der PCR

- 1.) Hot Start: Schmelzen der DNA 95°C 10 min.
- 2.) Amplifikation 45 Zyklen:
 - Denaturierung 94°C 1 sec.
 - Primer-Hybridisierung 68°C 10 sec.
 - Polymerisierung 72°C 9 sec.
- 3.) Erstellen der Schmelzkurve 60°-95°C

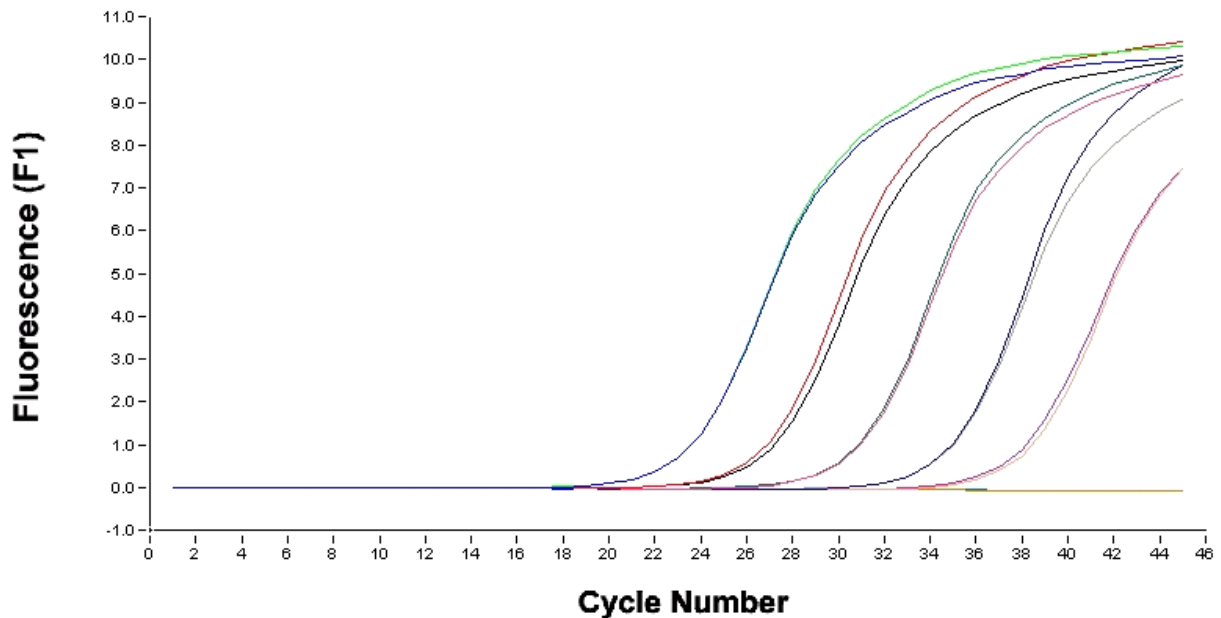


Abb. 16: Fluoreszenz-Signale einer Standardreihe für PBGD im Doppelansatz. Die Signale repräsentieren Verdünnungen des PBGD-Produktes von 10^{-7} bis 10^{-11} und Wasser.

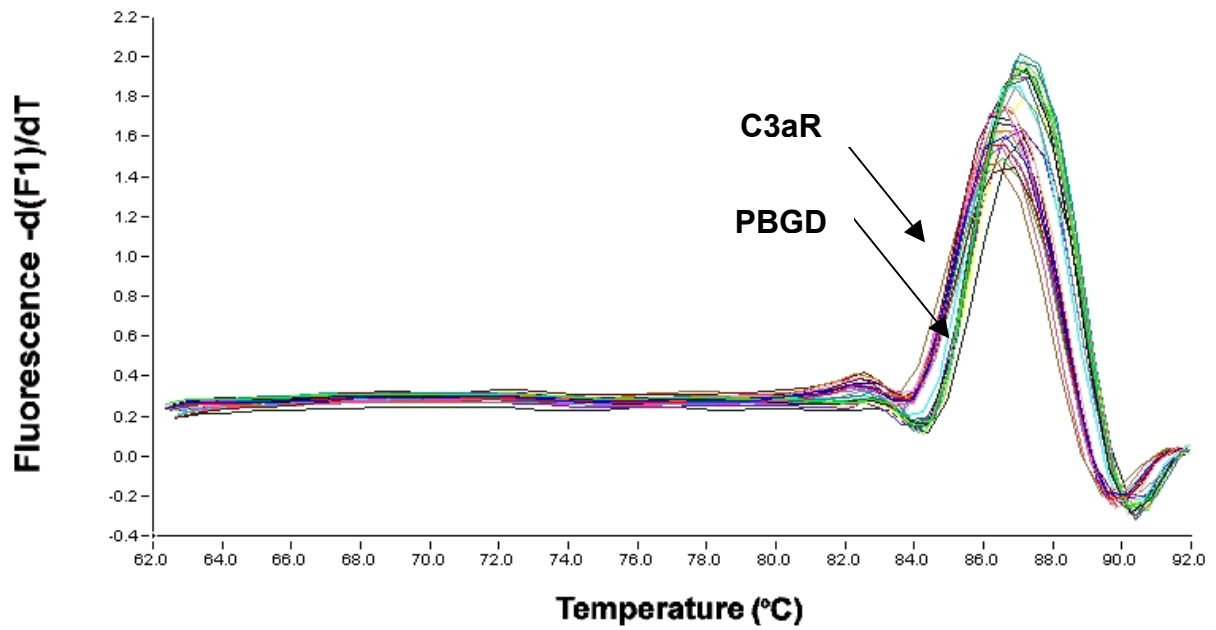


Abb. 17: Schmelzkurven der PCR-Produkte PBGD und C3aR.

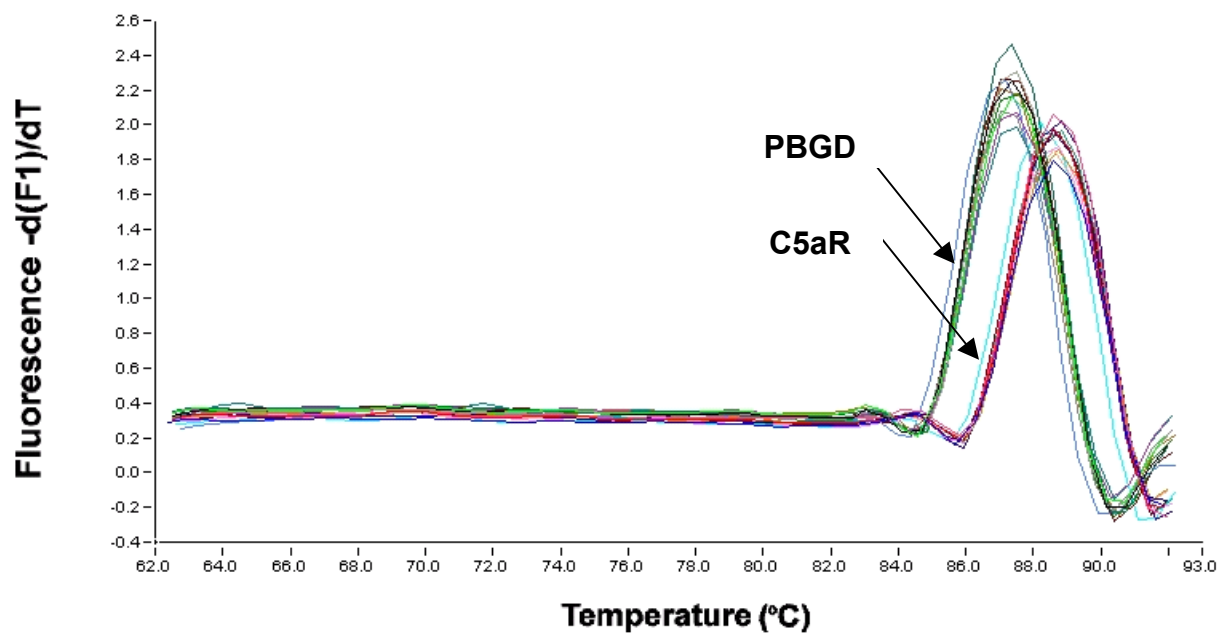


Abb. 18: Schmelzkurven der PCR-Produkte PBGD und C5aR.

4.13.1.6. Elektrophorese im Agarosegel

Prinzip

Mit Hilfe der Elektrophorese lassen sich Proteine und andere Makromoleküle wie RNA und DNA nach ihren Größen- und Ladungsverhältnissen auftrennen. Möglich wird diese Trennung durch das Wanderverhalten von Molekülen mit einer Nettoladung im elektrischen Feld. Die Wanderungsgeschwindigkeit v des Moleküls im elektrischen Feld hängt von der elektrischen Feldstärke E , der Nettoladung des Moleküls z und dem Reibungskoeffizienten f ab. Der elektrischen Kraft Ez , die das geladene Molekül zur entgegengesetzt geladenen Elektrode treibt, wirkt die Reibungskraft fn entgegen, die zwischen dem wandernden Molekül und dem Medium entsteht. Der Reibungskoeffizient f hängt sowohl von der Masse und Gestalt des wandernden Moleküls als auch von der Viskosität η des Mediums ab. Für eine Kugel mit dem Radius r gilt: $f = 6 \pi \eta r$. Die Maschenweite kann bei Agarosegelen durch die Konzentration der eingesetzten Agarose reguliert werden. Die Darstellung der aufgetrennten DNA-Fragmente kann mit Ethidiumbromid erfolgen. Ethidiumbromid besitzt eine ähnliche Struktur wie zwei gepaarte Basen und kann daher mit dem DNA-Gerüst interagieren. Unter UV-Licht fluoresziert das Ethidiumbromid und macht noch Banden sichtbar die weniger als 50ng DNA enthalten.

Durchführung

1,5%ige Agarose in TAE wurde aufgekocht. Nach leichtem Abkühlen wurden 0,1 ‰ (2 mg/ml) Ethidiumbromid zugegeben. Das ca. 5 mm hoch gegossene Gel wurde nach dem Erstarren mit 1×TAE überschichtet und jeweils 10 µl der PCR-Produkte, die zuvor mit 1,5 µL Probenpuffer vermischt wurden, aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 90 mA. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

4.13.1.7. Primersequenzen und Amplifikate

Enthielt die DNA-Sequenz mehrere Introns, wurden intronüberspannende Primer designt. Dies war jedoch nur für PBGD möglich. Die Eigenkomplementarität der Primer und Primerpaare sollte möglichst gering sein. Repetitive Sequenzen und Palindrome wurden weitestgehend vermieden. Der Gehalt an Guanin und Cytosin sollte bei beiden Primern eines Paares möglichst gleich sein und zwischen 40 und 70% liegen. Die Amplifikatgröße sollte bei Verwendung des LightCyclers ungefähr bei 200 bp liegen. Die Größe ist durch die Polymerase-Aktivität und die von ihr zur Synthese benötigten Zeit begrenzt.

Die Primer wurden von der Firma MWG, Ebersberg, synthetisiert.

Target	sense	antisense	Produktgröße
	5' - 3'	5' - 3'	
PBGD	tcttgacactagtgagtgtgttg	cagttgtgggtcatcttctgg	224 bp
C3aR	tggcgtaaagatgaagacga	caggaagacactggcaaaca	193 bp
C5aR	ctcaccattccatcctcgt	accacagccatcaccacttt	248 bp

Tabelle 7: Verwendete Primersequenzen für die PBGD- und Anaphylatoxin Rezeptor-DNA Amplifikationen, sowie ihre Produktgröße in Basenpaaren (bp).

Die Amplifikatgröße wurde mittels der Gelelektrophorese überprüft; und die Amplifikationsprodukte durch die Firma GATC Biotech, Koblenz, sequenziert und die Produktsequenz überprüft. Alle Produkte konnten sowohl elektrophoretisch als auch durch Sequenzabgleich verifiziert werden. Die Sequenzvergleiche wurden durch paarweisen Sequenzvergleich über eine online Software aus dem FASTA Sequenz Analyse Programm durchgeführt (http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html).

PBGD Score = 331 bits (167) Expect = 5e-89 Identities = 170/171 (99%)
 C3aR Score = 165 bits (83) Expect = 5e-39 Identities = 86/87 (98%)
 C5aR Score = 377 bits (190) Expect = e-103 Identities = 190/190 (100%)

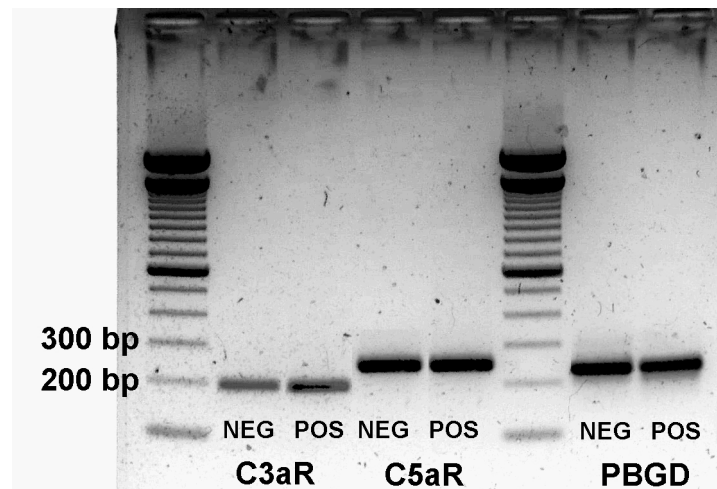


Abb. 19: Elektrophoretische „Auftrennung“ der PCR-Produkte für C3aR, C5aR und PBGD jeweils aus Halblungenlysaten allergen-unbehandelter (NEG) und allergenbehandelter (POS) BALB/c Mäuse. Die Größe der Produkte ist durch die DNA-Leitern gekennzeichnet.

4.13.2. Histologische Untersuchungen an Kryoschnitten der Mauslunge

4.13.2.1. Herstellung von Kryoschnitten der Mauslunge

Von den in OCT eingebetteten und konservierten Lungen wurden mit einem Kryostaten ca. 8 µm dicke Gewebsschnitte hergestellt. Die Schnitte wurden auf Objektträgern fixiert, in -20°C kaltem Aceton entwässert und entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

4.13.2.3. Giemsa-Färbung von Lungenschnitten zum Nachweis von Eosinophilen Granulozyten

Prinzip

Für die Darstellung von eosinophilen Granulozyten in Geweben wie der Lunge kann die Giemsa-Färbung angewandt werden. Binde- und Muskelgewebe färben sich nach dieser Methode schwachrosa, während sich Zellkerne blau färben. Das Zytoplasma der eosinophilen Granulozyten färbt sich auf Grund des basischen Charakters der Granula tiefrot, und eine Differenzierung ist bereits bei relativ geringer Vergrößerung möglich.

Färbeprotokoll

1. Wässern der Schnitte in Aqua dest
2. Färbung in frisch angesetzter 20%-iger Giemsa-Lösung bei Raumtemperatur für 1 Stunde 45 min
3. Differenzierung in 100% Methanol ca. 1 min
4. Weiterdifferenzierung und Entfärbung in 96%igem Ethanol (+ 4-5 Tropfen Eisessig auf 100ml Ethanol) unter mikroskopischer Kontrolle (ca. 0,5 Minuten),
5. Entwässerung über 2-Propanol (5 min)
6. Entwässerung über Xylol (5 min)
7. Eindeckeln mit Entellan

4.13.2.4. Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung von Lungenschnitten zur Charakterisierung struktureller Veränderungen des Lungengewebes

Prinzip

Die HE-Färbung ist eine sukzessive Lackfärbung mit einem Kernfarbstoff und einem sauren Zytoplasmafarbstoff (Eosin). Hämatoxylin ist ein (bei niedrigem pH) positiv geladener Farbstoff. Er färbt daher negativ geladene ("basophile") Strukturen blau, z.B. die DNA des Kernchromatins, die RNA des rauhen endoplasmatischen Retikulums, die sauren Glykosaminoglykane des hyalinen Knorpels. Hämatoxylin in der Zubereitung als Eisenlack ist Eisenhämatoxylin (nach Weigert oder nach Heidenhain), in der Zubereitung als Aluminiumlack ist es Hämalan. Eosin ist ein negativ geladener Farbstoff, der zur Gegenfärbung dient. Er färbt alle übrigen Strukturen in verschiedenen Rot-Tönen ("Azidophilie"). Mittels der HE-Färbung werden Zellkerne blauviolett, Zytoplasma und kollagene Fasern rot gefärbt, während Elastische Fasern ungefärbt bis blassrosa erscheinen.

Färbeprotokoll

1. Xylol 5-10Minuten
2. Xylol 5-10 Minuten
3. 99% Ethanol 0,5 – 1 Minute
4. 90% Ethanol 0,5 – 1 Minute
5. 70% Ethanol 0,5 – 1 Minute
6. Aqua dest. 0,5 – 1 Minute
7. Hämalan (Mayer's Hämatoxilinlösung) 6 Minuten
8. Aqua dest. 1 Minute
9. HCl-Alkohol (1mL HCl 37% (12M)+ 199 mL Ethanol 99,9%)
10. bläuen unter langsam fließenden Leitungswasser 10 Minuten
11. 80% Ethanol 15 sek.
12. 96% Ethanol 15 sek.
13. Eosin/Phoxin 20 sek.
14. 90% Ethanol (Differenzierung) 20 sek.
15. 96% Ethanol 20 sek.
16. 99 % Ethanol 30 sek.
17. 99 % Ethanol 30 sek.
18. 99 % Ethanol 30 sek.
19. Xylol 0,5 – 1 Minute (Rotihistol als Ersatz)
20. Xylol 0,5 – 1 Minute (Rotihistol als Ersatz)
21. eindecken mit Entellan

4.13.2.5. Immunhistologischer Nachweis von C5aR in Kryoschnitten der Mauslunge

Prinzip

Durch spezifische Antikörper lassen sich Zielproteine in Gewebsschnitten detektieren und über eine entsprechende Kopplung über eine fixierte Farbreaktion (APAAP fastRed), eine direkte bzw. indirekte Fluorochrom-Verknüpfung, durch partikuläres Material (z.B. Goldpartikel) oder mit radioaktiven Isotopen mikroskopisch sichtbar machen.

Wesentliche Voraussetzungen für die Aussagekraft der Methode sind die Spezifität der verwendeten Antikörper und die Stabilität der nachzuweisenden antigenen Determinanten.

Durchführung

Die immunhistochemische Färbung wurde mit verschiedenen Ansätzen durchgeführt, die sich in der Kopplung des 1. spezifischen C5aR-Antikörpers an die enzymatische Farbreaktion (APAAP) bzw. des Fluorochroms (FITC) unterscheiden. Die Ansätze sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

1	Ratte-IgG2b- Anti-Maus-C5aR	Kaninchen-IgG- Anti-Ratte-IgG- Biotin	AP- Streptavidin
2	” ”	” ”	FITC- Streptavidin
3	” ”	” ”	Schwein-Fab2 Anti-Kaninchen-IgG- FITC
4	” ”	Ziege Fab2 Anti-Ratte-IgG- FITC	

Tabelle 8: Schema der Konstruktion von Antigen-Antikörper-Komplexen an den C5aR zum immunhistochemischen Nachweis über FITC bzw. APAAP.

Färbeprotokolle

1. Entwässern der Kryoschnitte

- 3x 10 min Xylol
- 5 min 98 % Isopropanol
- 5 min 96 % Isopropanol
- 5 min 90 % Isopropanol
- 5 min 80 % Isopropanol
- 5 min 70 % Isopropanol
- 5 min Aqua dest
- 3 min PBS
- Flüssigkeit absaugen und Umrandung mit einem Fettstift

2. Blocken

- 1 h Ziegennormalserum 1 : 20 in TBS (Blockpuffer)
- absaugen
- 5 min TBS

3. Bindung des Primärantikörpers

- Inkubationszeiten siehe Tabelle
- absaugen
- in Aqua dest spülen
- 3x 5 min TBS

4. Bindung des Sekundärantikörpers bzw. Biotin-Streptavidin

- Inkubationszeiten siehe Tabelle
- absaugen
- in Aqua dest spülen
- 3x 5 min TBS

5. Bindung des Tertiärantikörpers

- Inkubationszeiten siehe Tabelle
- absaugen
- in Aqua dest spülen
- 3x 5 min TBS

5b. Bildung des Farbkomplexes mit FastRed, Dako Envision (gegebenenfalls)

- Farbsubstrat 10 – 20 min unter optischer Kontrolle
- in Aqua dest spülen
- 3x 5 min TBS

6. Gegenfärbung mit Hämatoxylin

- 5 min Hämatoxylin nach Mayer (gegebenenfalls)
- 15 min fließendes Leitungswasser

7. Eindeckeln

	Typ	Konzentration	Inkubationszeit	Puffer
Primärantikörper	Ratte-IgG2a- Anti-Maus-C5aR	1 µg/mL 10 µg/mL	0,5 h 1 h	Block-Puffer
Sekundärantikörper	Kaninchen-IgG- Anti-Ratte-IgG- Biotin	10 µg/mL	40 min	Block-Puffer
Tertiärbindung AP	AP- Streptavidin	1 : 200	nach optischer Kontrolle	Block-Puffer
Tertiärbindung FITC	FITC- Streptavidin	1 : 10	2 h	Block-Puffer
Tertiärantikörper FITC	Schwein-Fab2 Anti-Kaninchen-IgG- FITC	1 : 10	1,5 h	Block-Puffer
Sekundärantikörper FITC	Ziege Fab2 Anti-Ratte-IgG- FITC	1 : 20 1 : 100	1 h	Block-Puffer

Tabelle 9: Inkubationszeiten und Verdünnungen der einzelnen Antikörperbindungen bzw. der Biotin-Streptavidin-Bindung.

4.14. Statistische Methoden

Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte und die Standardabweichung als +SEM (positiver Standardfehler des Mittelwertes) angegeben. Die Daten wurden auf Normalverteilung geprüft und eine Varianzanalyse (One-Way-Anova) mittels des Bartletts Verfahrens durchgeführt.

Bei Intergruppenvergleichen wurde der parametrische einseitige T-Test zum paarweisen Vergleich mit der jeweiligen Kontrollgruppe angewandt. Bei signifikanten Varianz-Differenzen wurde der T-Test unter Anwendung der Welch-Korrektur durchgeführt. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

Signifikante Unterschiede zur Positivkontrolle sind generell mit Rauten gekennzeichnet ($p \leq 0,05$ #; $p \leq 0,01$ ##; $p \leq 0,005$ ###). Bei Vergleichen von Behandlungsgruppen mit einer anderen Gruppe als der Positivkontrolle sind die Kennzeichnungen dem Text der Abbildungen zu entnehmen.

5. Ergebnisse

5.1 Parameter für die Phänotypisierung des allergischen Asthma

Die primären Parameter im Ergebnissteil der Modell-Etablierung sind auf die AHR und Lungeneosinophilie fokussiert. Im spezifischen Teil des Einflusses der Anaphylatoxine auf die Ausbildung eines asthmatischen Phänotyps werden zudem spezielle Charakteristika der allergischen Entzündung untersucht wie Zytokinprofil und Genexpression.

5.2. Etablierung der Lungenfunktionsmessung an der Maus

In der Humandiagnostik wird als Lungenfunktionsparameter die FEV1 (Forced Expiratory Volume) eingesetzt, dessen Abfall im Provokationstests als Maß für eine Bronchokonstriktion dient. An Versuchstieren ist die Messung von forcierten Atemmanövern nur indirekt und unter großem technischem Aufwand möglich.

Im Gegensatz zur humanen Routinediagnostik sind an Versuchstieren Lungenfunktionsmessungen möglich, die z.T. spezifischere Messgrößen zugänglich machen. So lassen sich an wachen Tieren mit Hilfe der Headout Bodyplethysmographie sämtliche flussabhängigen Lungenfunktionsparameter messen, wobei der Midexpiratoische Fluss (EF50) als Marker für eine Bronchokonstriktion validiert ist. Unter Narkose lassen sich Versuchstiere orotracheal intubieren und durch Verwendung eines Oesophaguskatheters zusätzlich intrathorakale Druckdifferenzen messen, wodurch die Lungenfunktionsparameter dynamische Resistance und Compliance zugänglich werden.

Beide Messsysteme waren bereits für die Ratte im Fraunhofer ITEM etabliert, und wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit zusammen mit der Abteilung Atemwegspharmakologie und Lungenfunktion für die Maus adaptiert.

5.2.1. Lungenfunktionsmessung

Die Lungenfunktionsmessung ist eine der zentralen Methoden in der Asthmaforschung. Sie dient zur Bestimmung der Atemwegsreagibilität. In der Regel wird zur Bestimmung der Atemwegsreagibilität die Bronchokonstriktion als Reaktion auf unspezifische Agenzien wie Methacholin gemessen. Bei Mensch und Tier mit einem asthmatischen Phänotyp zeichnet sich diese Reaktion durch eine Hyperreagibilität auf den inhalierten Bronchokonstriktor aus.

5.2.2. Quasi-nicht-invasive Lungenfunktionsmessung orotracheal intubierter Mäuse

5.2.2.1. Methacholinprovozierte Atemwegsreaktivität an intubierten Mäusen

Für die Quasi-nicht-invasive Lungenfunktionsmessung lassen sich die Parameter Resistance und dynamische Compliance bestimmen. Die Resistance beschreibt den Atemwegswiderstand, der primär durch die oberen Atemwege Trachea und primäre Bronchien bestimmt wird und gilt als Maß für die bronchokonstriktorische Reaktion. Die Compliance hingegen beschreibt die Reaktion in den terminalen Atemwegen und ist Ausdruck für die Volumendehnbarkeit von Lunge und Thorax.

Die Methacholinprovokation bewirkt sowohl eine Verringerung der Resistance als auch der dynamischen Compliance. Die EF50 als rein flussabhängiger Größe korreliert sehr gut mit den Veränderungen in der Resistance und wird als Parameter für eine Bronchokonstriktion in der Headout Bodyplethysmographie an wachen Mäusen verwendet.

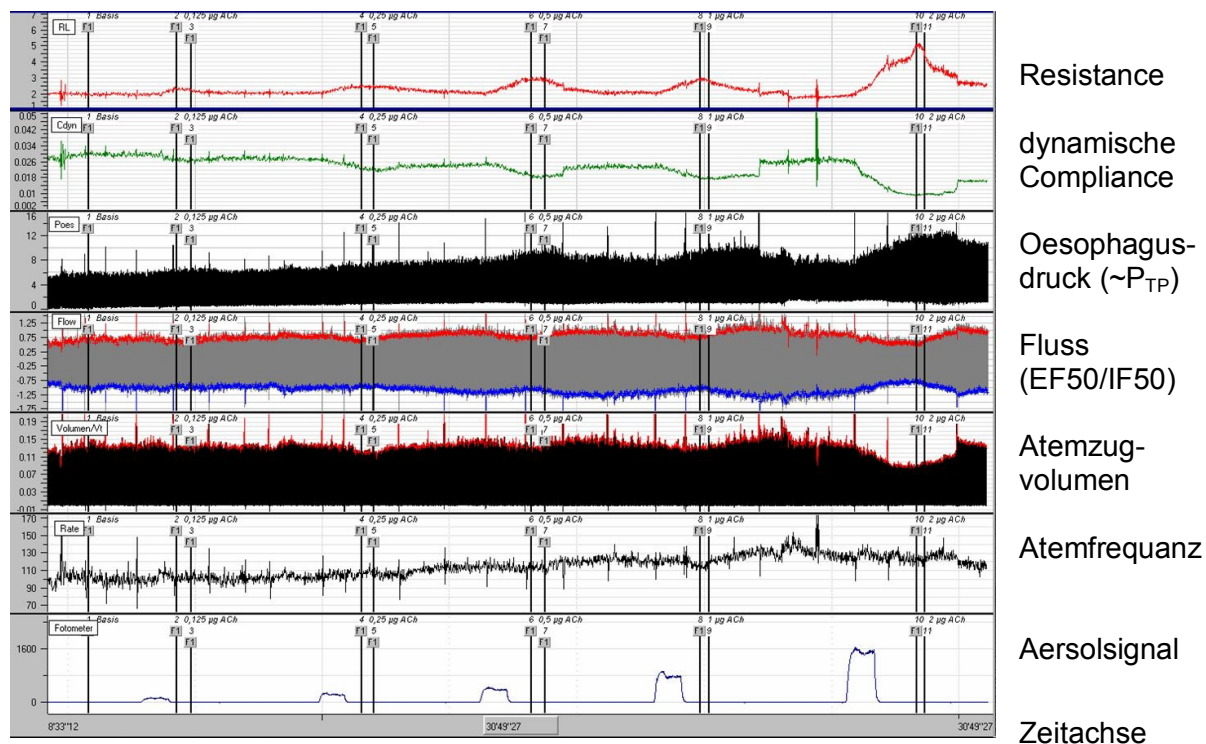


Abb. 20: Signale einer Lungenfunktionsmessung an einer spontan atmenden, orotracheal intubierten BALB/c Maus unter Fentanyl/Etomidate-Narkose (0,052mg/kg / 20,83 mg/kg), dargestellt mit dem Notocord® Hem3.4 System. Die Signale sind zusammengeschoben und bilden den kompletten Messverlauf von ca. 0,5 h ab.

Die Reaktion der Maus auf steigende inhalierte Methacholindosen (0,125 bis 2 µg] zeigt sich in den Parametern Resistance, dynamische Compliance, Oesophagusdruck ($\sim P_{TP}$), Atemfluss, EF50 und Atemzugvolumen. Das Ansteigen der Atemfrequenz ist bedingt durch die allmählich nachlassende Wirkung der Narkose.

5.2.2.2. Allergische Frühreaktion an intubierten Mäusen

Als charakteristische lungenphysiologische Reaktion tritt bei einer inhalativen Allergenexposition beim Asthmatiker eine so genannte allergische Frühreaktion (EAR) auf. Diese wird beim Menschen durch eine Änderung im Atemstoß (FEV₁ : forced expiratory volume) repräsentiert.

Die EAR setzt unmittelbar nach Allergenkontakt ein und wird durch Mastzellen initiiert, die über die Stimulierung hochaffiner IgE-Rezeptoren durch das Antigen, u.a. Autozoide (Histamin, PDG₂ und LTC₄) freisetzen, die zu einer Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur bewirken. Eine ähnliche Reaktion auf eine inhalative Allergenprovokation lässt sich auch in der Maus über die Parameter der Bronchokonstriktion (Resistance und EF50) messen. Allgemein ist diese Reaktion allerdings bei der Maus sehr viel schwächer ausgeprägt und innerhalb einer Behandlungsgruppe großen Streuungen unterworfen. Der Mechanismus der allergeninduzierten lungenphysiologischen Reaktion ist bei Maus nicht geklärt. Sie scheint Mastzell-, IgE- als auch Histamin-unabhängig zu sein.

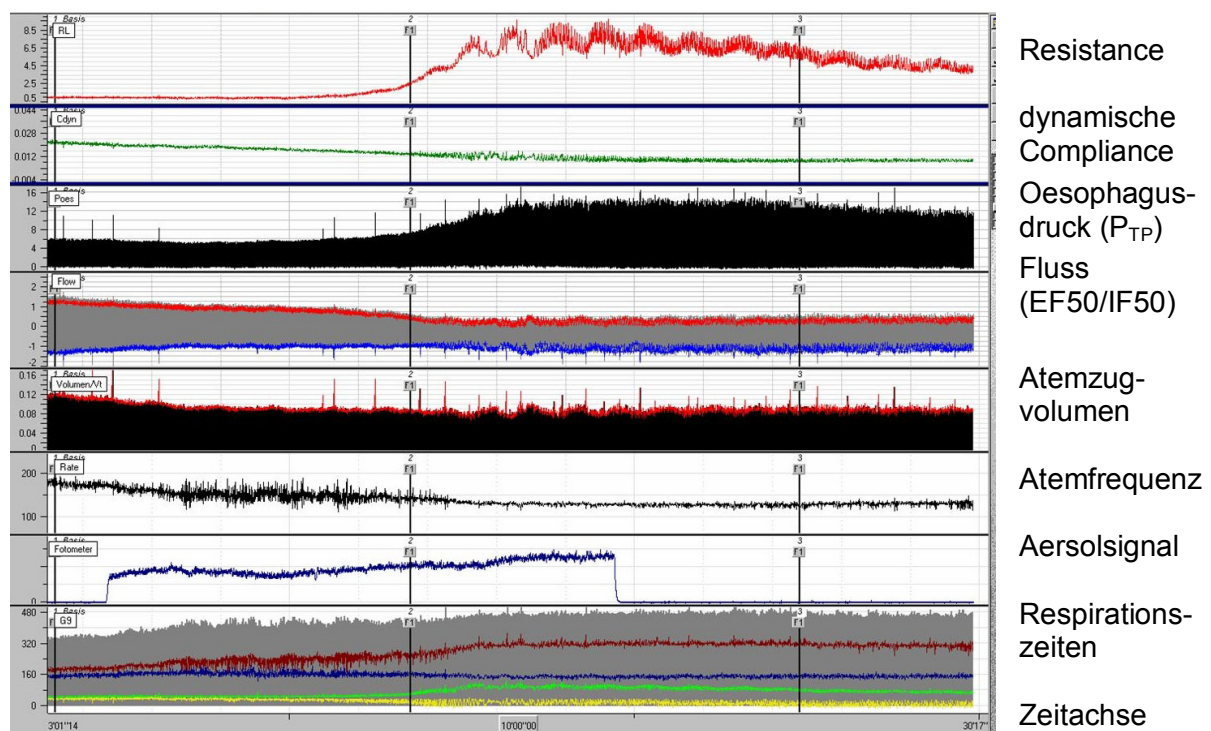


Abb. 21: Allergische lungenphysiologische Frühreaktion einer BALB/c Maus auf inhalative Allergenprovokation mit Aspergillus Extrakt, gemessen mit dem System für die intubierte Maus. Nach Ca. 5 min nach Expositionsbeginn kommt es zu einer anhaltenden Erhöhung der Lungenresistance und einer gleichzeitigen Verringerung der Compliance und der EF50. Die Reaktion flacht zum Ende der Messung ca. 15 min nach Expositionsende wieder ab.

5.2.3. Headout Bodyplethysmographie an wachen Mäusen

Die Headout Bodyplethysmographie hat gegenüber der quasi-nicht-invasiven Methode verschiedene Vor- und Nachteile. Die Vorteile sind

- 1.) dass man mehrere Tiere gleichzeitig messen kann, was einen höheren Durchsatz erlaubt und außerdem auftretende Varianzen im Messsystem aber auch Effekte über tageszeitliche Aktivitätsunterschiede der Mäuse über die Gruppen ausgeglichen werden können;
- 2.) dass sich die Lungenfunktion an wachen und von einer Narkose unbeeinflussten Mäusen messen lässt;
- 3.) dass die Tiere v.a. durch die narkosefreie Messung einer geringeren Belastung ausgesetzt sind.

Die Nachteile sind

- 1.) dass der wache Zustand der Mäuse eine höhere Anfälligkeit gegenüber individuellen Reaktion auf den Messprozedur an sich ausübt;
- 2.) dass sich nur flussabhängige Größen messen lassen und kein Zugriff auf die „golden Standards“ der Lungenfunktion wie Resistance und dynamische Compliance besteht.

Es stellte sich heraus, dass sich gerade die Narkoseprozedur bei der intubierten Maus sehr ungünstig auf das Modellsystem auswirkt, wenn vor den jeweiligen Messungen spezielle Behandlungen und Applikationen erfolgten. Da diese Behandlungen für die Bearbeitung der Fragestellung nötig waren, wurde das Headout System für den speziellen Teil dieser Arbeit gewählt.

5.2.3.1. Methacholinprovozierte Atemwegsreaktivität an wachen Mäusen

Für die Bestimmung der Atemwegsreagibilität an wachen Mäusen werden diese analog zum intubierten System mit steigenden Methacholindosen provoziert. Die Reaktion wird über den Midexpiratorischen Fluss (EF50) als Parameter für eine Bronchokonstriktion bodyplethysmographisch gemessen. Steigende Aerosolkonzentration werden über das modifizierte Pari-Master System durch Aerolisierung von Methacholinlösungen in steigenden Konzentration erzeugt. Über ein gravimetrisch kalibriertes Fotometersignal lässt sich die Aerosolkonzentration bestimmen und die jeweilige inhalierte Dosis über das Minutenvolumen des Tieres errechnen. Aus der Beziehung aus dem Abfall der EF50 und der inhalierten Methacholindosis ergeben sich charakteristische Dosiswirkungskurven.

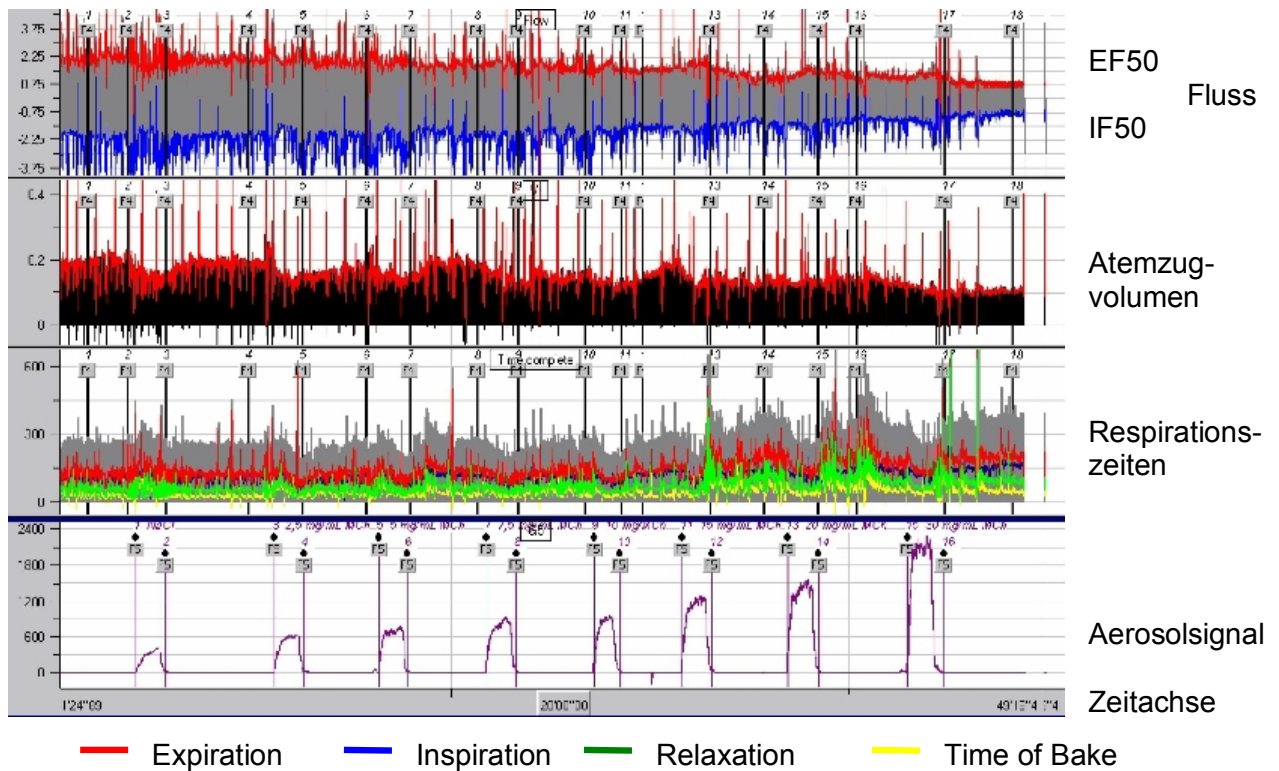


Abb. 22: Signale einer Lungenfunktionsmessung gemessen mit der Headout Bodyplethysmographie an einer wachen CBA/J Maus. Die Signale sind zusammengeschieben und bilden den kompletten Messverlauf von ca. 0,5 h ab. Die Reaktion der Maus auf steigende aerolisierte Methacholinkonzentrationen (17,5 bis 40 mg/mL) zeigt sich in den Parametern Atemfluss mit EF50 , Atemzugvolumen und den Respirationszeiten.

Die durch die Methacholinprovokation hervorgerufene bronchokonstriktorische Reaktion führt neben einer generellen Einschränkung des Atemvolumens zu einer charakteristischen Veränderung des Atemmusters. Insbesondere die Expirationsphase ist verlängert und es kommt zur Ausbildung einer Time of Brake zwischen Inspiration und Expiration.

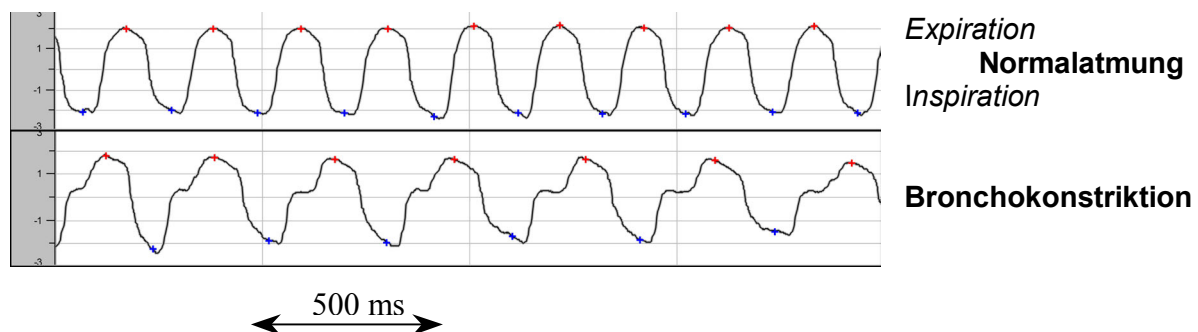


Abb. 23: Atemmuster einer BALB/c Maus unter Normalbedingungen und nach Methacholinprovokation, dargestellt als Atemflusskurven. Unter Normalbedingungen zeigen die Atemstromstärken einen gleichmäßigen sinoiden Verlauf, während unter bronchokonstriktorischen Bedingungen die Atemstromstärke v.a. in der Expirationsphase ihr

ursprüngliches Maximum nicht mehr erreicht und bis zum Wendepunkt in die Inspirationsphase langsamer abnimmt. Darüber hinaus bildet sich eine Time of Brake zwischen Inspirations- und Expirationsphase heraus.

5.2.3.2. Allergische Frühreaktion auf inhalative Allergenprovokation an wachen Mäusen

Analog zum intubierten System lässt sich auch an wachen Mäusen eine allergische Frühreaktion auf Allergenprovokation allein über flussabhängige Lungenfunktionsparameter wie der EF50 messen. Die messbare Reaktion zeichnet sich allerdings durch eine noch Größere Variabilität als bei der intubierten Methode aus. Selbst stark allergenisierte Tiere mit einer ausgeprägten Lungeneosinophilie und Atemwegshyperreagibilität zeigen z.T. gar keine messbare Lungenfunktionsreaktion auf inhalative Allergenprovokation.

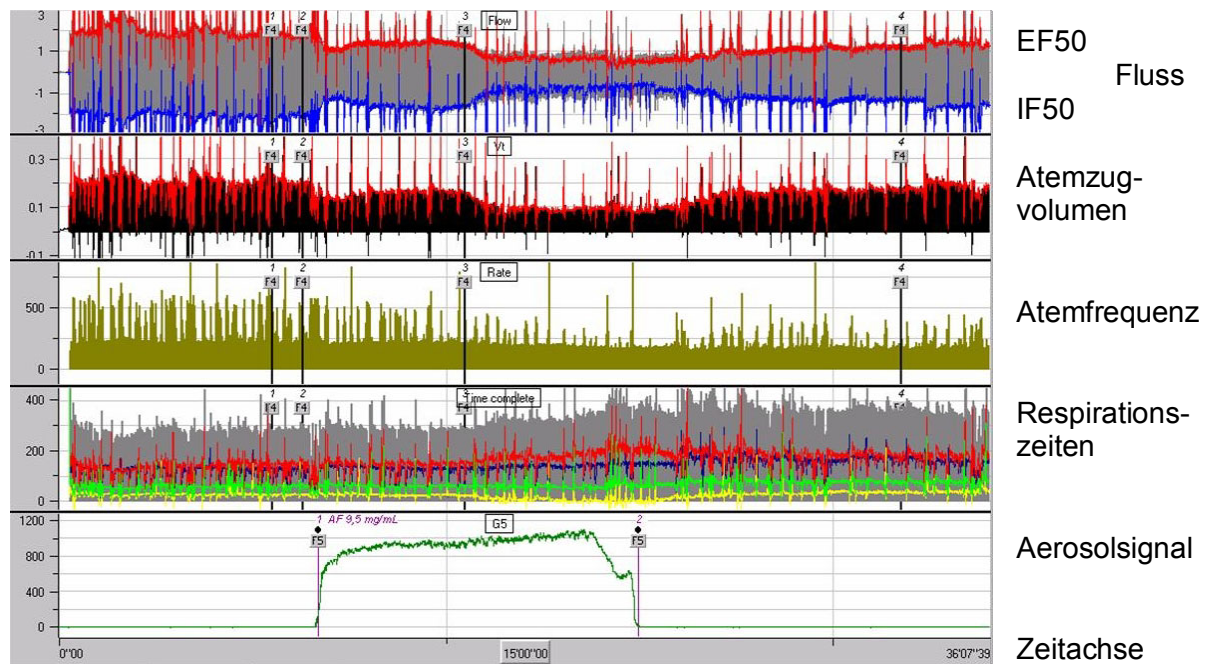


Abb. 24: Allergische lungenphysiologische Frühreaktion einer BALB/c Maus auf inhalative Allergenprovokation von Aspergillus Extrakt, gemessen im Headout system. Ca. 5 min nach Expositionsbeginn kommt es zu einer anhaltenden Reduktion des Atemflusses und der EF50. Zum Maximum der Reaktion zeigt sich auch eine deutliche Verlängerung der Expirationszeit. Die Lungenfunktion normalisiert wieder zum Ende der Messung, ca. 10 min nach Expositionsende. Die Tiere zeigen zudem eine kurzzeitige individuell ausgeprägte Reaktion auf die Verneblung an sich, atmen dann aber normal weiter.

Die durch inhalative Allergenprovokation hervorgerufene Frühreaktion führt ebenso wie die Methacholinprovokation zu einer Bronchokonstriktion und Flusslimitierung.

Der Wirkmechanismus ist aber nicht über muskarine Rezeptoren vermittelt, sondern über Histamin- (H1-3) – bei der Maus über Serotonin (5-HTR) - und Leukotrienrezeptoren (Cysteinyl-Leukotrien-1-Rezeptor). Die unterschiedliche lungenphysiologische Reaktion auf Allergen im Vergleich zu Methacholin spiegelt sich z.T. im veränderten Atemmuster wieder.

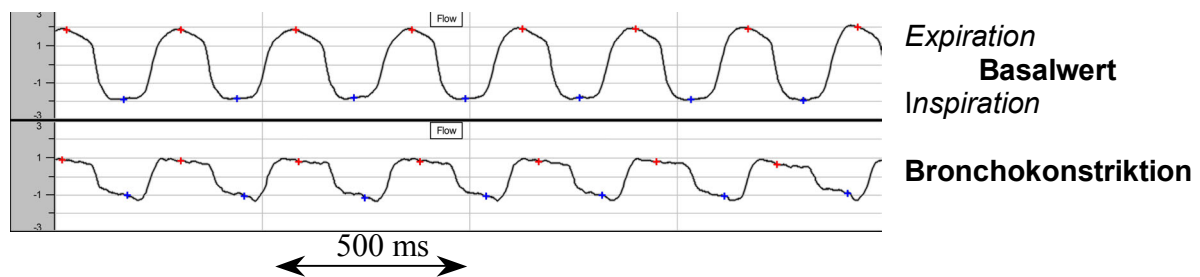


Abb. 25: Atemmuster einer BALB/c Maus vor und ca. 20 min (Maximum der Reaktion) nach inhalativer Allergenprovokation, dargestellt als Atemflussskurven. Im Vergleich zum Basalwert flachen die Atemflusssignale im Verlauf der Frühreaktion sehr stark ab. Die Atemstromstärken bilden keinen klaren Scheitelpunkt mehr aus und formen stattdessen ein langes Plateau konstanter Größe. (vgl. Abb. 24.)

5.2.4. Aerosolcharakterisierung

5.2.4.1. Aerosolgröße

Der Durchmesser der inhalieren Aerosole bestimmt maßgeblich die Deposition der aerosolisierten Substanzen in der Lunge der Versuchstiere. Zur Kalkulation des Depositionsfaktors wurden die mit dem Pari-Master bzw. Bronchy Typ II generierten Aerosole unter Versuchsbedingungen entsprechend ihrer Größenverteilung mit einem Marple Kaskaden-Impaktor charakterisiert.

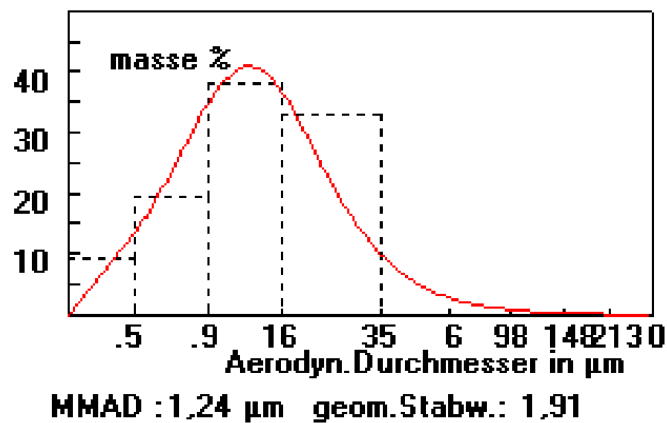


Abb. 26: Massenverteilung eines mit dem Pari-Master erzeugten OVA-Aerosols. Die Abszisse beschreibt die Klassengrenzen der sondierten Aerosole in µm (0,25 bis 21,3 µm). Aus der Verteilung errechnet sich der Median des Mittleren Aersoldurchmessers (MMAD).

Für die eingesetzten Aerosole (OVA, Aspergillus Extrakt und Methacholin) ergaben sich für beide Aerosolgenerierungs-Systeme MMAD's von 1 bis 2 µm. Nach Analysen von Raabe et al mit radioaktiv markierten Aerosolen errechnete sich damit eine Lungendeposition von ca. 15%. Dieser Faktor wurde in allen entsprechenden Dosiskalkulation verwendet.

5.2.4.2. Fotometrische Gravimetrie für Methacholin

Für die Methacholin -Provokation zur Bestimmung der Atemwegsreaktivität wurden die Versuchstiere mit steigenden Konzentrationen des Methacholin-Aerosols exponiert. Zur Bestimmung der jeweiligen Aerosolkonzentration wurde das System zuvor gravimetrisch über ein Aerosolphotometer kalibriert

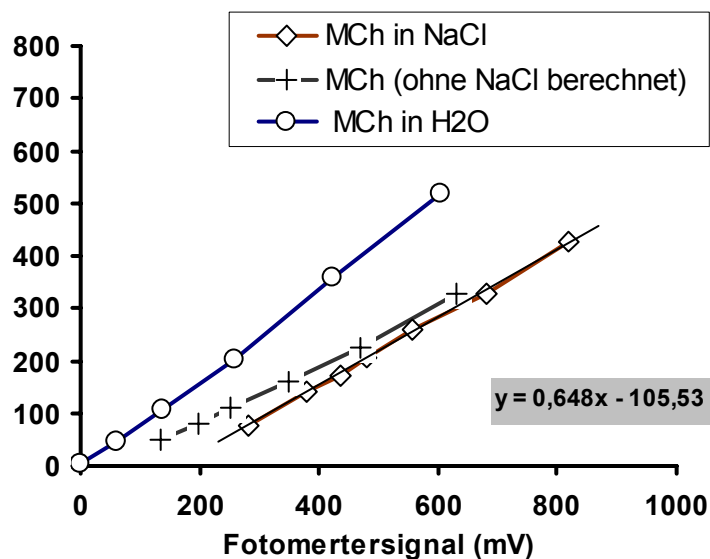


Abb. 27: Beziehungen zwischen Aerosolkonzentration der aerolisierten Substanz und Photometerextinktion für Methacholin gelöst in Wasser und Kochsalzlösung.

Die mit dem Pari-Master generierten feuchten Aerosole wurden ausgehend von in NaCl gelösten Methacholin-Lösungen erzeugt, um eine hypotone Reaktion der Versuchstiere zu vermeiden. Das fotometrische Aerosolsignal wird maßgeblich von der Lösungskonzentration der aerolisierten Flüssigkeit bestimmt, aber auch von optischen Eigenschaften der Substanz selber. Eine homogene wässrige Lösung erzeugt eine direkt proportionale Konzentrationsabhängigkeit zum Fotometersignal, während sich in Kochsalzlösung, bedingt durch den NaCl-Anteil der Ordinatenabschnitt aus dem Nullpunkt verschiebt. Zusätzlich beeinflusst das NaCl aber auch die Steigung der Geraden, sodass eine Korrektur der Eichgeraden nicht ohne weiteres möglich ist. Um den reinen Methacholin-Anteil fotometrisch zu erfassen, wurde die NaCl-Masse daher nachträglich von der errechneten, inhalierten Aerosoldosis subtrahiert.

5.3. Mausmodelle für das allergische Asthma

Die in der Asthmaforschung zum Einsatz kommenden Mausmodelle unterscheiden sich in Bezug auf den verwendeten Mausstamm und der Art sowie dem Applikationsprotokoll des Allergens. Zur Induktion einer allergischen Entzündung der Atemwege werden die Versuchstiere mit dem Allergen sensibilisiert. Die Applikation erfolgt in der Regel subkutan oder intraperitoneal in Kombination mit einem Adjuvans, einmalig oder in Wiederholung, z.B. nach 7 und 14 Tagen [375, 094, 379, 280, 376]. Auf die Sensibilisierung folgt die inhalative Allergen-Provokation – ein bis zwei Wochen nach der letzten Sensibilisierung (Boosterung). Änderungen in der Lungenfunktion (EAR, LAR, AHR) werden nach einmaliger oder in bestimmten Zeitabständen wiederholter Allergenprovokation gemessen.

Nach erfolgreicher Etablierung der Lungenfunktionsmessung an der Maus, war das nächste Ziel der Arbeit ein Mausmodell zu etablieren, das

1. den Asthmatischen Phänotyp gut widerspiegelt
2. mit so wenig Belastung wie möglich für die Versuchstiere verbunden ist
3. einfach zu handhaben ist und
4. gut pharmakologisch zu beeinflussen ist.

5.3.1. Vergleich von OVA- und Aspergillus Modell

Das Ovalbumin wird standardmäßig in Allergie- und Asthma-Modellen als Allergen eingesetzt. Da OVA ein artifizielles Allergen ist, werden zunehmend Substanzen mit natürlicher Relevanz als Extrakte von Pollen, Schimmelpilzen oder Hausstaubmilbenkot in der Asthmaforschung eingesetzt.

Um die Effizienz von alternativen Asthma-Modellen im Vergleich zum OVA-BALB/c-Modell zu testen, wurde ein standardmäßiges OVA-Modell gegen ein Aspergillus Modell verglichen. Das Aspergillus Modell war für CBA/J-Mäuse beschrieben. An den Mausstammpräferenzen für die beiden Modelle wurde vorerst festgehalten, um die Vergleichbarkeit für die bereits beschriebenen Effekte gewährleisten zu können. Zusätzlich wurde eine Gruppe nach dem Aspergillus-Protokoll mit OVA behandelt, um das Potential der beiden Allergene direkt vergleichen zu können.

Für die Messung der Lungenfunktion wurde die Headout-Bodyplethysmographie eingesetzt. Die Atemwegsreagibilität wurde in diesem Experiment noch als effektive Methacholin-Lösungskonzentration bestimmt, die einem Abfall der EF50 um 50% bewirkt, und nicht als inhalierte effektive Methacholindosis berechnet. Zu diesem Zeitpunkt der Methodenentwicklung war die Berechnung der individuell aufgenommenen Methacholindosis über ein gravimetrisch kalibriertes Fotometersignal noch nicht etabliert. Die Verwendung der für die Aerolisierung eingesetzten Methacholinkonzentrationen als Korrelat für die Provokationsstärke ist aber das übliche Verfahren in diesem Messsystem, wenngleich es ungenauer ist.

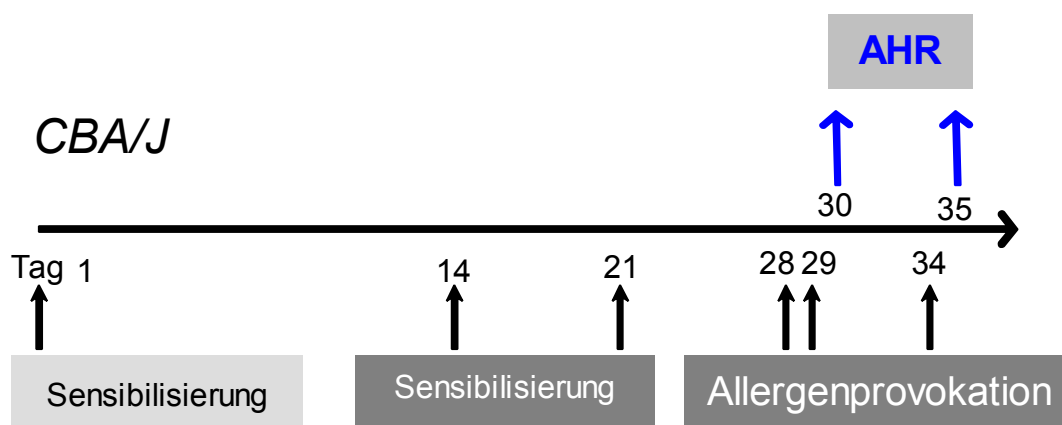


Abb. 28: Behandlungsprotokoll für das OVA-Modell mit drei Sensibilisierungen, bzw. Boosterungen an Tag 1, 14 und 21; insgesamt drei inhalativen Allergenprovokation an Tag 28, 29 und 34 und zwei Messungen der Atemwegsreagibilität an Tag 30 und 35.

Tag	1	14	21	28	29	34
Gruppe	Sensibilisierung i.p.	Sensibilisierungen i.p.		Allergenprovokationen inhalativ		
NEG	OVA/AI	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
POS	OVA/AI	OVA/AI	OVA/AI	OVA	OVA	OVA

Tabelle 10: Übersicht der Versuchsgruppen mit den entsprechenden Behandlungen für das im OVA-Modell

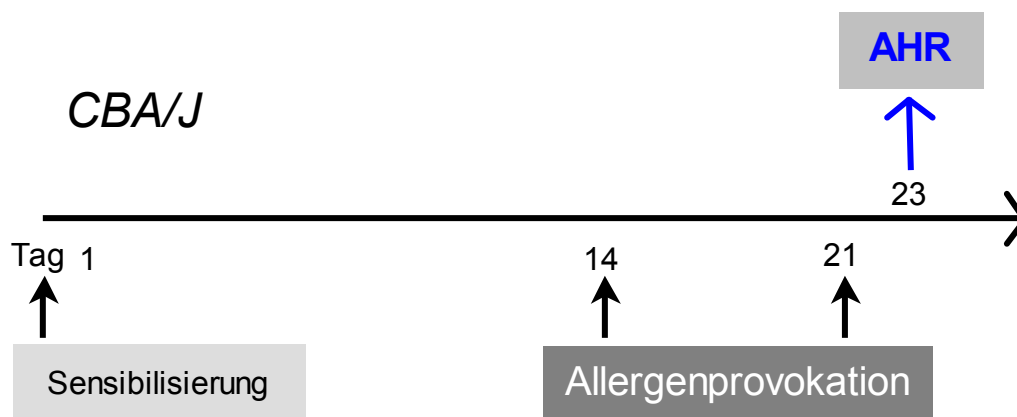


Abb. 29: Behandlungsschema für das Aspergillus-Protokoll mit einer Sensibilisierung an Tag 1, einer intranasalen Allergenprovokation (bzw. Boosterung) an Tag 14 und einer intratrachealen Allergenprovokation an Tag 21. 48h nach der letzten Allergenprovokation wurde die Atemwegsreakibilität auf Methacholin gemessen.

Tag	1	14	21
Gruppe	Sensibilisierung i.p.	Allergenprovokation i.n.	Allergenprovokation i.t.
NEG	AF/IFA	NaCl	NaCl
POS 1	AF/IFA	AF	AF
POS 2	OVA/IFA	OVA	OVA

Tabelle 11: Übersicht der Versuchsgruppen mit den entsprechenden Behandlungen für das Aspergillus Modell.

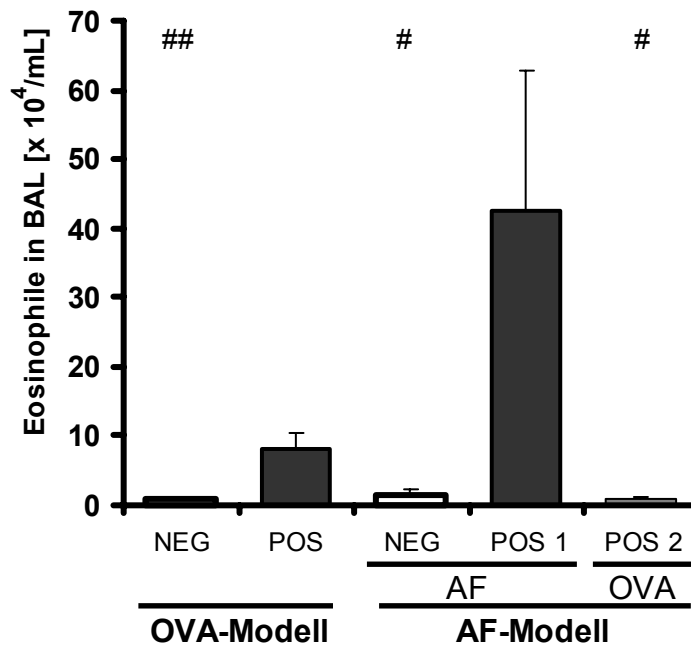


Abb. 30: Anzahl eosinophiler Granulozyten in der BAL pro Lavagevolumen im OVA- und Aspergillus Modell. N = 6 pro Gruppe, # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ versus Positivkontrolle POS im OVA-Modell und POS 1 im Aspergillus Modell.

In beiden Modellen entwickeln die mit dem entsprechenden Allergen behandelten Mäuse eine Lungeneosinophilie. Die Behandlung mit OVA nach dem Aspergillus-Schema mit nur drei Behandlungen reicht hingegen nicht aus, um eine allergische Entzündung zu induzieren. Im Gegensatz dazu zeigen die mit Aspergillus behandelten Mäuse eine deutliche Eosinophilie in diesem Modell, die im Vergleich zum OVA-Modell noch stärker ausgeprägt ist (Abb. 30).

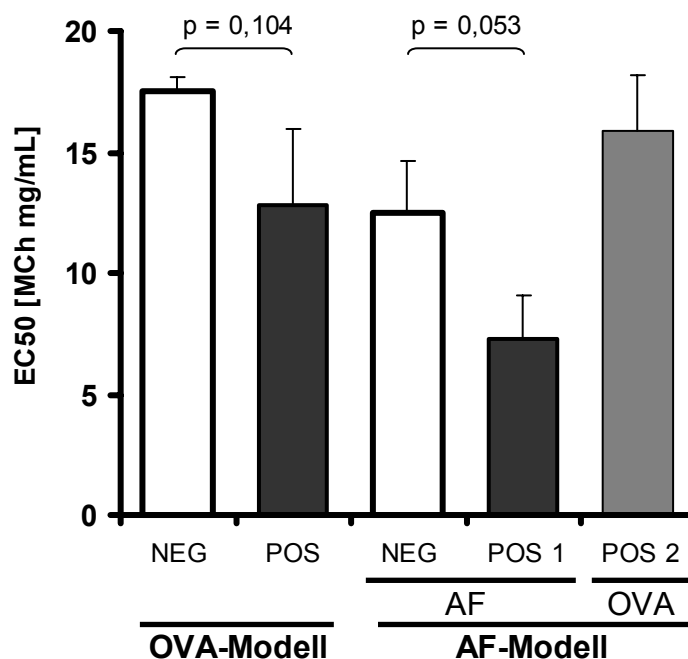


Abb. 31: Atemwegsreakibilität auf inhalative Methacholinprovokation im OVA- und Aspergillus Modell 48h bzw. 24h nach letzter Allergenprovokation, gemessen im Headout-System,

dargestellt als effektive Konzentration aerolisierter Methacholinlösungen, die einen Abfall der EF50 um 50% bewirkt. N = 6 pro Gruppe (Irrtumswahrscheinlichkeiten siehe Diagramm)

Im OVA-Modell zeigen die allergenbehandelten Tiere wieder nur eine tendenzielle Atemwegshyperreagibilität (Abb. 31). Diese ist im Aspergillus Modell entsprechend der stärkeren Eosinophilie sehr viel deutlicher ausgeprägt. Analog weisen die nach dem Aspergillus-Schema mit OVA behandelten Tiere parallel zur ausbleibenden allergischen Entzündung auch keine Atemwegshyperreagibilität auf.

Beim Vergleich der beiden Modelle fällt zudem auf, dass die CBA/J Mäuse im Aspergillus Modell per se eine erhöhte Reagibilität aufweisen als die BALB/c-Mäuse im OVA-Modell, was durch den Mausstamm an sich oder das unterschiedliche Behandlungs-Schema bedingt sein kann (Abb. 31).

Schlussfolgerung: Auf Grund der deutlicheren Ausprägung eines asthmatischen Phänotyps und des einfachen und kurzen Behandlungsprotokolls wurde im Folgenden im Aspergillus Modell gearbeitet.

5.3.2. Inhalative versus intratracheale Allergenprovokation im Aspergillus Modell

Die Wahl der Applikationsform bei der Allergenprovokation wird überwiegend von praktischen Gesichtspunkten beeinflusst. Eine inhalative Allergenexposition reflektiert jedoch am besten die natürliche Situation. Die inhalative Allergenprovokation hat zudem den Vorteil, dass sie schonend, mit geringerer Belastung für die Tiere und ohne Narkose durchgeführt werden kann. Außerdem bleiben die intratracheale und intranasale Route frei für pharmakologische Applikationen. Intratracheale und intranasale Allergenprovokation verbrauchen dafür nur sehr geringe Substanzmengen und eine definierte Allergendosis kann z.T. reproduzierbarer und mit geringerem technischem Aufwand appliziert werden.

Um zu überprüfen ob nach dem Aspergillus-Schema das inhalative Allergenprovokation einen vergleichbaren asthmatischen Phänotyp hervorruft wie die intranasale bzw. Intratracheale Allergenprovokation, wurden C57BL/6 Mäuse dem Protokoll entsprechend behandelt und untersucht. Es wurden Mäuse vom Stamm C57BL/6 verwendet, da für die spezifische Fragestellung dieser Doktorarbeit u.a. die Verwendung von kommerziell erhältlichen C3-Knockout Mäuse angedacht war.

Tag	1	14	21
Gruppe	Sensibilisierung i.p./s.c.	Allergenprovokation	
		i.n.	i.t.
	10 µg	20 µg	20 µg
NEG	AF/IFA	NaCl	NaCl
POS	AF/IFA	AF	AF
	i.p./s.c.	inhalativ	inhalativ
	10 µg	8 µg	8 µg
NEG	AF/IFA	NaCl	NaCl
POS	AF/IFA	AF	AF

Tabelle 12: Übersicht der Versuchsgruppen mit den entsprechenden Behandlungen für den Vergleich der Inhalativen versus der intranasalen/intratrachealen Allergenprovokation in C57BL/6 Mäusen nach Behandlungsprotokoll des Aspergillus Modell (vgl. Abb. 29)).

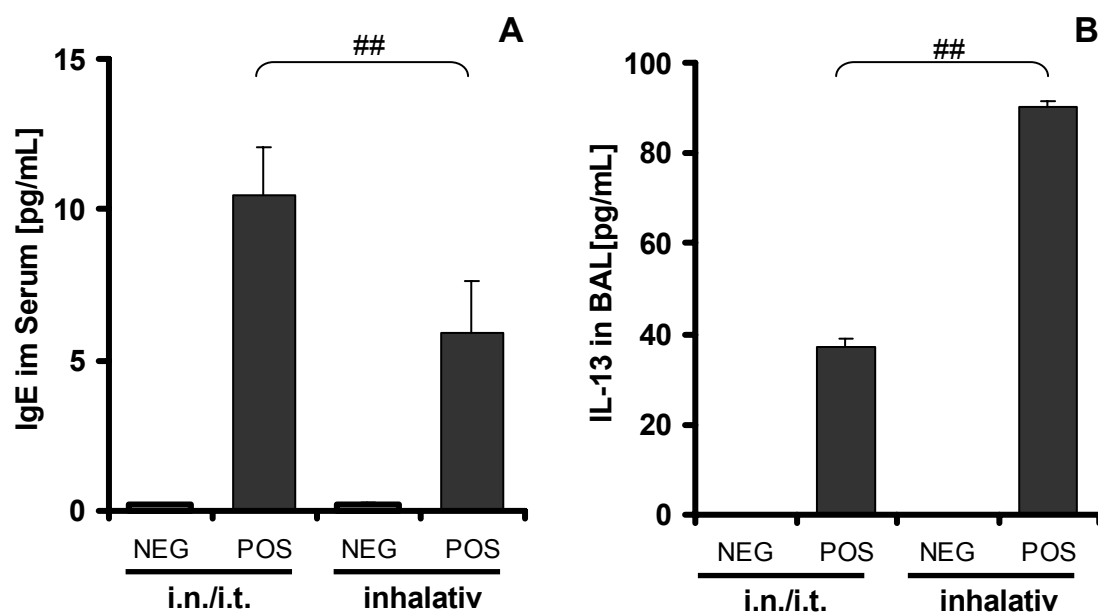


Abb. 32: Konzentrationen verschiedener Mediatoren der allergischen Atemwegs-entzündung im Serum bzw. in der BAL, 48h nach letzter Allergenprovokation. **A:** Gesamt-IgE-Konzentration im Serum. **B:** IL-13-Konzentration in der BAL. N = 8 pro Gruppe, ## $p \leq 0,01$ zwischen den Positivkontrollen.

Die Serum-IgE-Konzentration ist nach beiden Applikationsprotokollen massiv in den allergenbehandelten Tieren erhöht (Abb. 32A). Ebenso lasen sich erhöhte Konzentrationen von IL-13 gegenüber mit Kochsalzlösung behandelten Tieren in der BAL nachweisen (Abb. 32B). Zwischen den beiden Behandlungsprotokollen sind signifikante Unterschiede in den Konzentrationen dieser Mediatoren feststellbar.

Die inhalativ behandelten Tiere bilden weniger IgE. Im Gegensatz dazu ist die IL-13 Konzentration in der BAL gegenüber den intranasal/intratracheal behandelten Tieren erhöht. Andere typische Th2-Zytokine in der BAL wie IL-4 und IL-5 lagen zum Observierungszeitpunkt unterhalb des Detektionslimits.

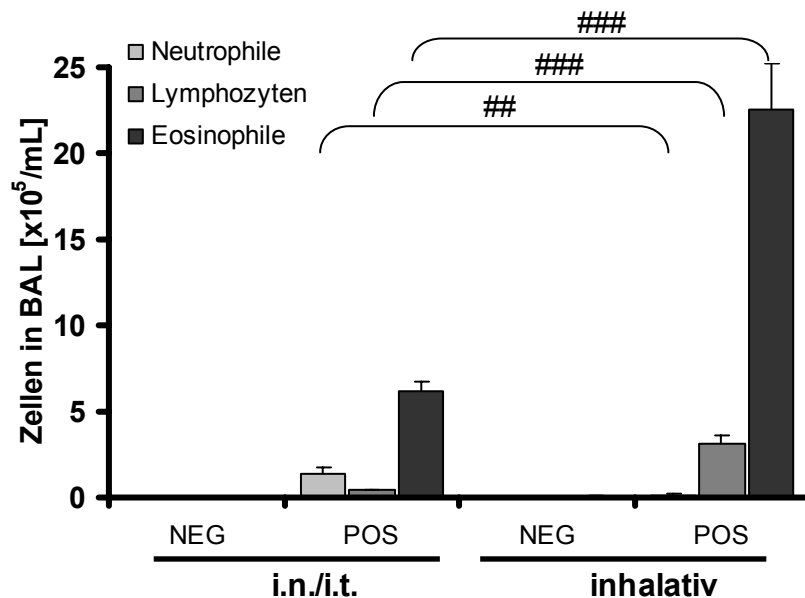


Abb. 33: Differentialzellbild der BAL von C57BL/6 Mäusen ca. 48h nach letzter Allergenprovokation, dargestellt als 10^5 Zellen pro gewonnenes Lavagevolumen in mL. N = 8 pro Gruppe, ## $p \leq 0,01$ ### $p \leq 0,001$ zwischen den Positivkontrollen

Das inhalative Allergenprovokation führt zu einer weitaus stärkeren allergischen Atemwegsentzündung im Vergleich zur intranasalen/intratrachealen Allergenapplikation. Die Zellkonzentrationen von eosinophiler Granulozyten und Lymphozyten sind stark in der BAL erhöht. Demgegenüber sind in der inhalativen Gruppe keine neutrophilen Granulozyten in der BAL vorhanden. Der Anteil neutrophile Granulozyten in der BAL intranasal/intratracheal behandelter Tiere könnte Ausdruck der unspezifischen Reizung der Lunge durch die Applikation sein (Abb. 33).

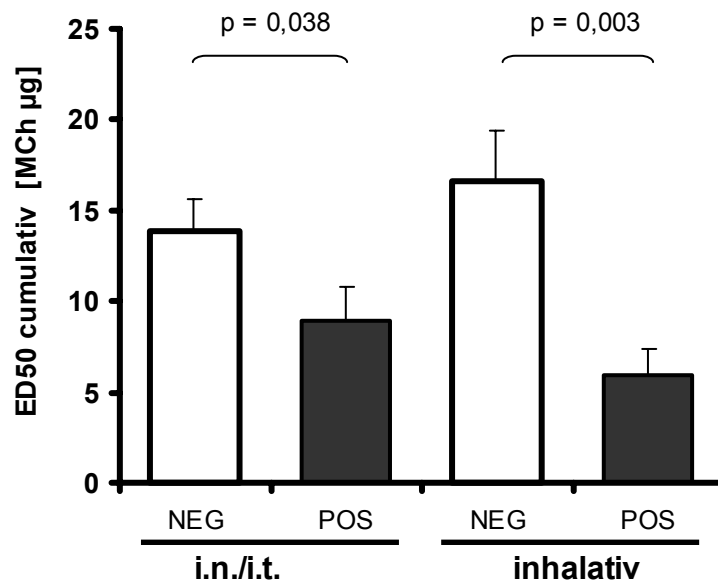


Abb. 34: Atemwegsreagibilität auf inhalative Methacholinprovokation im Aspergillus Modell, gemessen im Headout-System. Dargestellt als effektive kumulative Methacholindosis, die einen Abfall der EF50 um 50% bewirkt. N = 8 pro Gruppe, die Irrtumswahrscheinlichkeiten sind der Abb. zu entnehmen.

Die intranasale/intratracheale sowie die inhalative Allergenprovokation verursachen eine Atemwegshyperreagibilität im Vergleich zu entsprechend mit Kochsalzlösung behandelten Tieren. Diese ist bei inhalativ behandelten Tieren allerdings sehr viel deutlicher ausgeprägt. Darüber hinaus sind die Kontrolltiere der inhalativ behandelten Tiere weniger reagibel als die intranasal/intratracheal behandelten Kontrolltiere (Abb. 34).

Schlussfolgerung: Auf Grund der deutlicher ausgeprägten allergischen Entzündung und Atemwegshyperreagibilität, sowie der belastungsärmeren Applikationform, wurde im Folgenden das Protokoll mit der inhalativen Allergenprovokation gewählt

5.3.3. Vergleich der Zeitpunkte 24h versus 48h nach Allergenprovokation

Auf Grund der schlechten Detektierbarkeit speziell der Th2-Zytokine im vorherigen Experiment, wurden in diesem Experiment die Zeitpunkte 24h gegenüber 48h nach letzter Allergenprovokation auf ihrem Einfluss auf den asthmatischen Phänotyp untersucht.

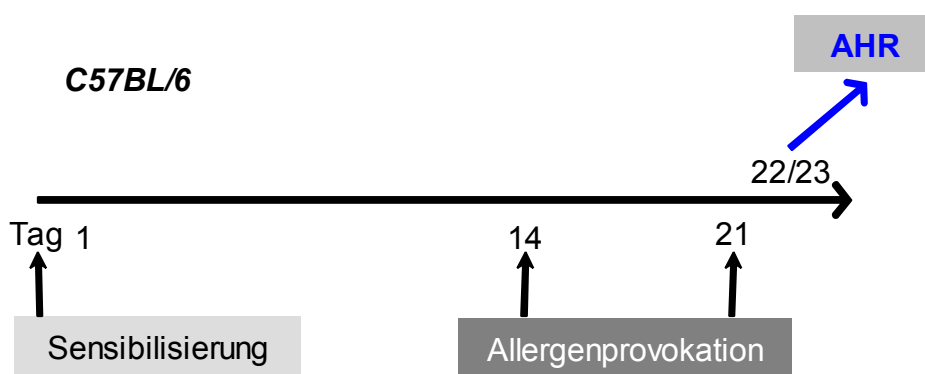


Abb. 35: Behandlungsschema für Vergleich der Zeitpunkte 24h versus 48h im inhalativen Aspergillus Modell an C57BL/6 Mäusen. 24h bzw. 48h nach der letzten Allergenprovokation wurde die Atemwegsreakibilität auf Methacholin gemessen und die Tiere anschließend geopfert.

Tag	1	14	21
Gruppe	Sensibilisierung	Allergenprovokation	
	i.p./s.c.	inhalativ	
NEG	AF/IFA	NaCl	NaCl
24h	AF/IFA	AF	AF
48h	AF/IFA	AF	AF

Tabelle 13: Übersicht der Versuchsgruppen mit den entsprechenden Behandlungen im inhalativen Aspergillus Modell an C57BL/6 Mäusen.

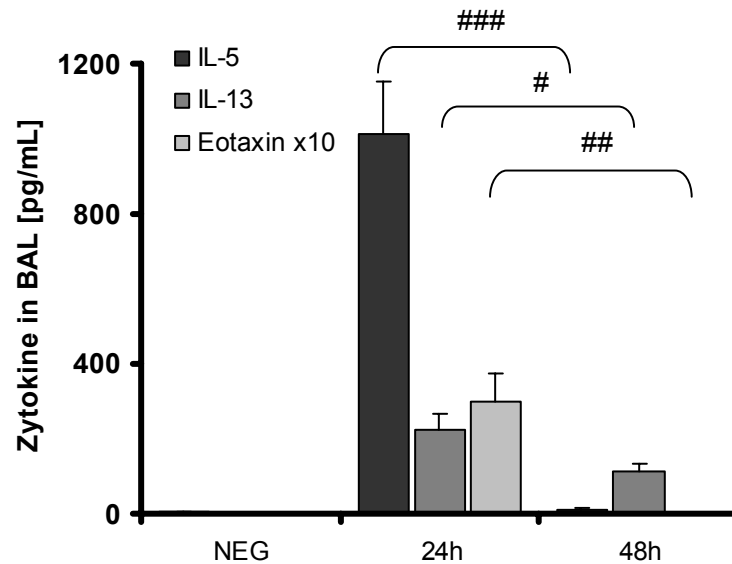


Abb. 36: Zytokinkonzentration in der BAL von C57BL/6 Mäusen 24h und 48h nach letzter Allergenprovokation im Vergleich zu Kontrolltieren zum 48h Zeitpunkt. N = 8 pro Gruppe, Irrtumswahrscheinlichkeiten zwischen dem 24h und 48h Zeitpunkt # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$, ### $p \leq 0,001$.

24h nach Allergenprovokation lassen sich z.T. sehr hohe Zytokinkonzentrationen in der BAL messen. IL-5 und Eotaxin (Werte x 10) sind zum 24h Zeitpunkt in sehr hohen Konzentrationen vorhanden, während sie zum 48h Zeitpunkt kaum noch nachweisbar sind. Auch die IL-13 Konzentration nimmt zum 48h Zeitpunkt deutlich ab. IL-4 und IFN γ lagen sowohl 24h als auch 48h unterhalb der Nachweisgrenzen (Abb. 36).

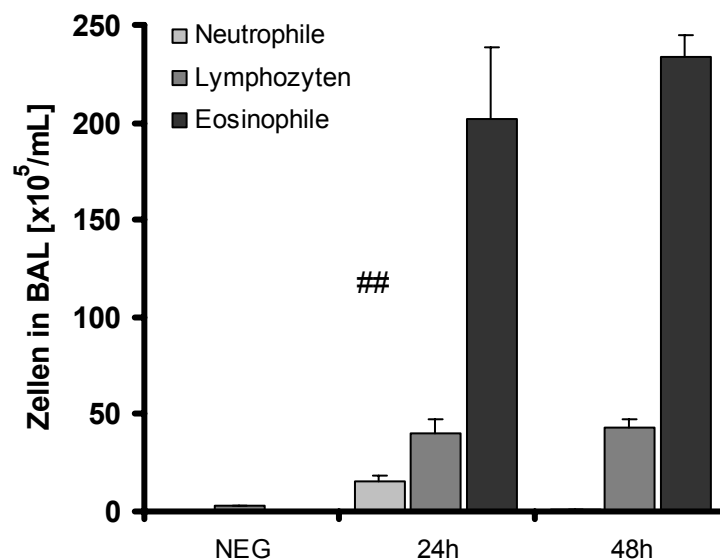


Abb. 37: Differentialzellbild der BAL von C57BL/6 Mäusen 24h bzw. 48h nach letzter Allergenprovokation, dargestellt als 10^5 Zellen pro gewonnenes Lavagevolumen in mL. N = 8 pro Gruppe, ## $p \leq 0,01$ 24h versus 48h.

Alle allergenbehandelten Tiere zeigen eine deutliche allergische Atemwegsentzündung, charakterisiert durch eine massive Einwanderung von eosinophilen Granulozyten in das Lungenlumen und einer deutlichen Präsenz von Lymphozyten, die in den allergenbehandelten gleich ist. Unterschiede ergeben sich in der Anzahl neutrophile Granulozyten, die lediglich in der 24h-Gruppe sichtlich erhöht ist, während in allen anderen Gruppen praktisch keine neutrophile Granulozyten vorhanden sind (Abb. 37).

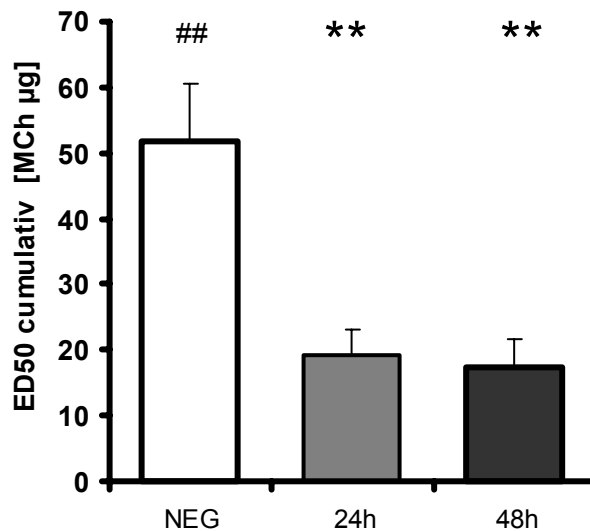


Abb. 38: Atemwegsreagibilität auf inhalative Methacholinprovokation 24h und 48h nach letzter Allergenprovokation im Aspergillus Modell, gemessen im Headout-System. Dargestellt als effektive kumulative Methacholindosis, die einen Abfall der EF50 um 50% bewirkt. N = 8 pro Gruppe, ** $p \leq 0,05$ versus Negativkontrolle, ## $p \leq 0,05$ versus Positivkontrolle.

Analog zur ausgeprägten Lungeneosinophilie weisen die allergenbehandelten Tiere eine Atemwegshyperreagibilität im Vergleich zu den Kontrolltieren auf. Diese ist bereits 24h nach Allergenprovokation ausgeprägt und unverändert zum 48h Zeitpunkt (Abb.38).

Schlussfolgerung: Eine Lungeneosinophilie und Atemwegshyperreagibilität ist bereits 24h nach Allergenprovokation in vergleichbarer Ausprägung zum 48h Zeitpunkt ausgebildet. Auf Grund der besseren Detektierbarkeit von Unterschieden in den Zytokinkonzentrationen der BAL zwischen Allergen- und Allergen-unbehandelten Tieren, wurde im Folgenden der 24h Zeitpunkt für die Lungenfunktionsmessung und anschließender Opferung der Tiere gewählt.

5.3.4. Vergleich der Mausstämme C57BL/5 und BALB/c im Aspergillus- Modell

Verschiedene Mausstämme reagieren in pathophysiologischen Modellen z.T. mit sehr unterschiedlich stark ausgeprägten Phänotypen. Auch die einzelnen Komponenten und Mechanismen, die die Ausbildung eines komplexen Krankheitsbildes bewirken, können in sehr unterschiedlichem Masse beteiligt sein, und viele immunologische Prinzipien zeichnen sich durch eine hohe Redundanz aus.

Die Einflüsse der Anaphylatoxine in Asthma-Maus-Modellen wurden überwiegend auf den BALB/c und S129 Hintergrund beschrieben.

Für eine umfassendere Charakterisierung des Aspergillus Modells mit der Möglichkeit pharmakologische Effekte in unterschiedlichen Mausstämmen innerhalb eines konstanten Versuchstiermodells zu prüfen, wurde das für CBA/J und C57BL/6 bereits etablierte Aspergillus Modell auf den BALB/c-Stamm erweitert.

Die nachfolgenden Darstellungen sind Ergebnisse aus mehreren unabhängigen Experimenten, die mit C57BL/6- und BALB/c-Mäusen im inhalativen Aspergillus Modell durchgeführt wurden.

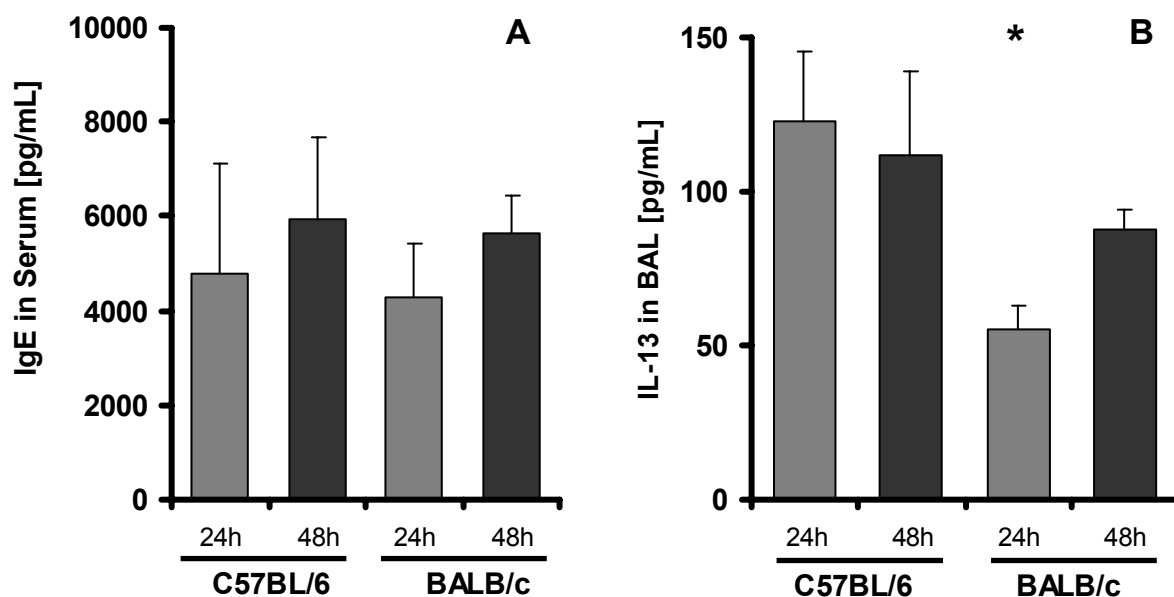


Abb. 39: Lösliche Mediatoren der allergischen Entzündung in Serum und BAL von C57BL/6 und BALB/c Mäusen 24h und 48h nach letzter inhalativer Allergenprovokation im Aspergillus Modell. C57BL/6 N = 6, BALB/c N = 10 pro Gruppe, * $p \leq 0,05$ C57BL/6 versus BALB/c. **A:** IgE-Konzentration im Serum. **B:** IL-13-Konzentration in der BAL.

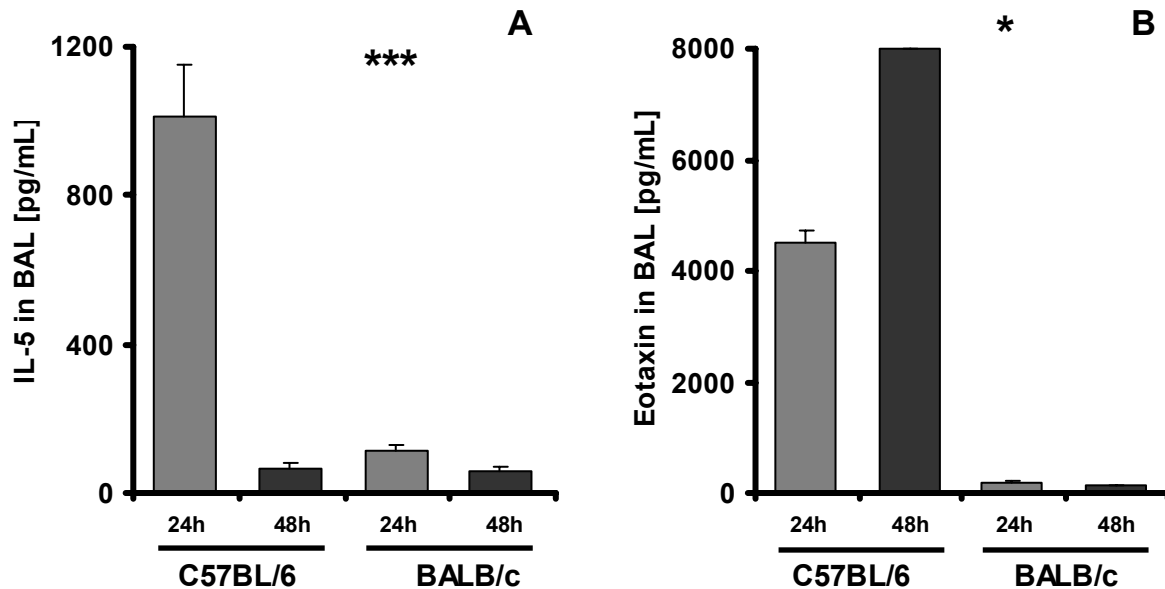


Abb. 40: Lösliche Mediatoren der allergischen Entzündung in Serum und BAL von C57BL/6 und BALB/c Mäusen 24h und 48h nach letzter inhalativer Allergenprovokation im Aspergillus Modell. C57BL/6 N = 6, BALB/c N = 10 pro Gruppe, * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$ C57BL/6 versus BALB/c. **A:** IL-5-Konzentration in der BAL **B:** Eotaxin-2-Konzentration in der BAL. Die Werte für C57BL/6 zum 48h Zeitpunkt lagen außerhalb des oberen Messbereiches von 8000 pg/mL.

Die Serum-IgE-Konzentrationen liegen für C57BL/6 und BALB/c Mäuse für den 24h als auch zum 48h Zeitpunkt jeweils auf gleichem Niveau. Außerdem lässt sich erkennen, dass die Allergenprovokation in beiden Maustämmen gleichsam die IgE-Produktion triggert, da sie zum 48h Zeitpunkt hin zunimmt (Abb. 39A).

Die IL-13-Konzentration in der BAL ist 24h nach Allergenprovokation in C57BL/6 signifikant höher als in BALB/c. In C57BL/6 bleibt sie von 24h bis 48h konstant, während in BALB/c Mäusen die IL-13-Konzentration zum 48h Zeitpunkt ansteigt (Abb. 39B).

Wie im vorherigen Experiment bereits gezeigt, ist IL-5 nur zu frühen Zeitpunkten nach der Initiierung der allergischen Entzündungsreaktion in größeren Mengen nachweisbar. Auch in BALB/c Mäusen fällt die Konzentration deutlich nach 48h ab, und ist identisch mit der in C57BL/6 Mäusen. Zum 24h Zeitpunkt sind die IL-5 Konzentrationen in der BAL von C57BL/6 extrem höher als in BALB/c Mäusen (Abb. 40A).

Die allergische Entzündungsreaktion in C57BL/6 Mäusen zeichnet sich zudem durch sehr hohe Konzentrationen von Eotaxin-2 in der BAL aus, die nach 48h noch zunehmen. In BALB/c Mäusen sind sie vergleichsweise sehr niedrig (Abb. 40B).

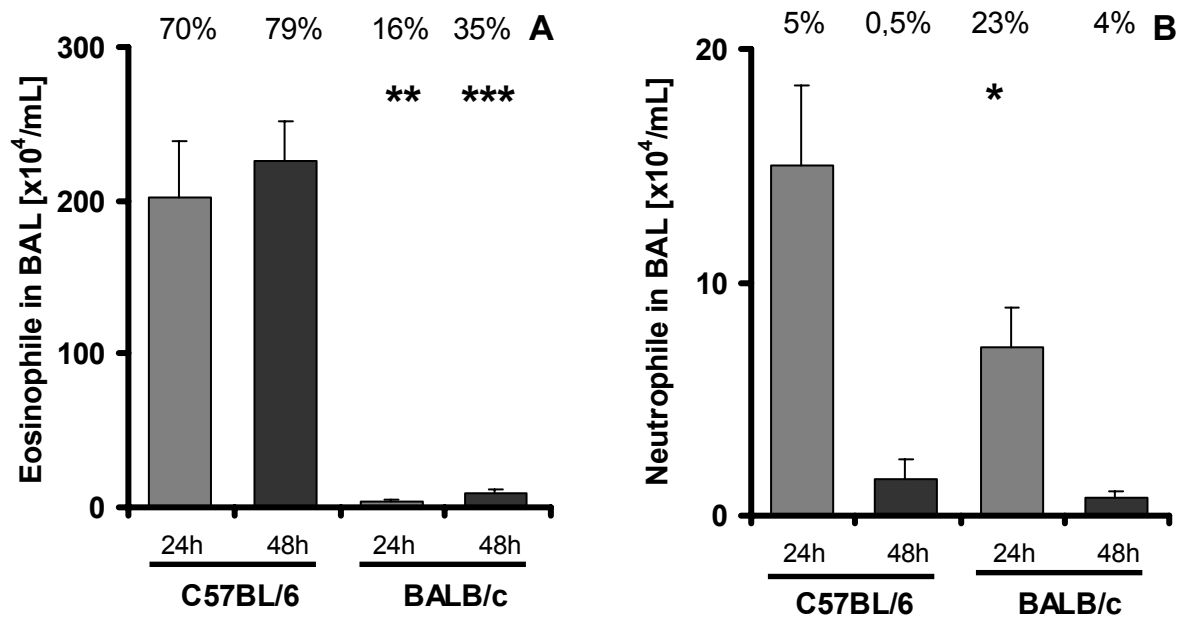


Abb. 41: Leukozyten in der BAL von C57BL/6 und BALB/c Mäusen 24h und 48h nach letzter inhalativer Allergenprovokation im Aspergillus Modell, dargestellt als 10⁴ Zellen pro gewonnenes Lavagevolumen. Zusätzlich ist der prozentuale Anteil des entsprechenden Zelltyps angegeben. C57BL/6 N = 6, BALB/c N = 10 pro Gruppe, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001 C57BL/6 versus BALB/c. **A:** Eosinophile Granulozyten in der BAL.

B: Neutrophile Granulozyten in der BAL.

Entsprechend der hohen Konzentrationen von IL-5 und Eotaxin-2 zeigen C57BL/6 Mäuse eine sehr starke Infiltration von eosinophilen Granulozyten in das Lungenlumens, die zum 48h Zeitpunkt kaum noch weiter ansteigt. In BALB/c Mäusen ist die Eosinophilie absolut sehr viel geringer und scheint sich generell langsamer zu entwickeln. Der prozentuale Anteil der eosinophilen Granulozyten verdoppelt sich noch in BALB/c Mäusen von 24h auf 48h nach Allergenprovokation (Abb. 41A).

Neutrophile Granulozyten findet man in beiden Mausstämmen in der frühen Phase der Entzündung 24h nach Allergenprovokation. Nach 48h sind sie kaum noch messbar. Der relative Anteil der neutrophilen Granulozyten ist in BALB/c Mäusen sehr viel höher. Auf Grund der massiven Zellinvasion in C57BL/6 Mäusen sind die absoluten Zahlen neutrophiler Granulozyten im Vergleich zu BALB/c aber nur gering unterschiedlich (Abb. 41B).

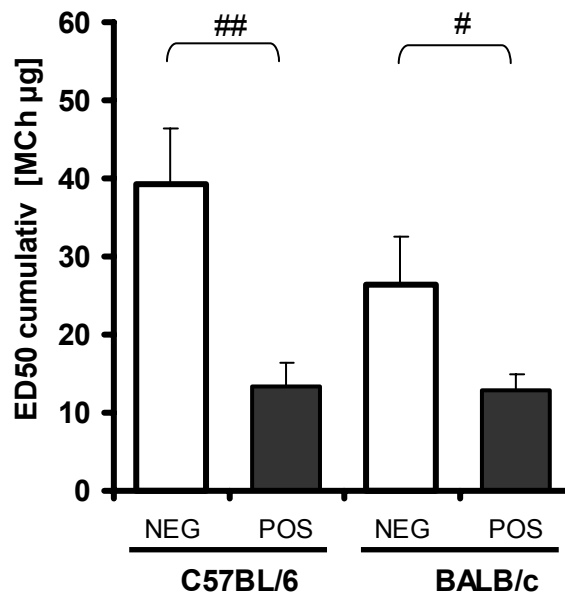


Abb. 42: Atemwegsreagibilität auf inhalative Methacholinprovokation von C57BL/6 und BALB/c Mäusen 48h nach Allergenprovokation, im Aspergillus Modell, gemessen im Headout-System. Dargestellt als effektive kumulative Methacholindosis, die einen Abfall der EF50 um 50% bewirkt. C57BL/6 N = 6, BALB/c N = 10 pro Gruppe, # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ versus Positivkontrolle.

Beide Mausstämme entwickeln nach dem Aspergillus-Protokoll eine Atemwegshyperreagibilität. Diese ist in C57BL/6 Mäusen etwas deutlicher ausgeprägt. Dieser Unterschied wird primär bedingt durch eine leicht erhöhte Reagibilität auf Methacholin der mit Kochsalzlösung behandelten BALB/c Mäuse im Vergleich zu den entsprechenden C57BL/6 Kontrollen (Abb. 42).

Schlussfolgerung: C57BL/6 Mäuse entwickeln eine extrem starke Eosinophilie im Aspergillus Modell mit überschießender Zytokinproduktion und repräsentieren dadurch schlecht den durchschnittlichen asthmatischen Phänotyp beim humanen Asthma bronchiale. BALB/c Mäuse hingegen reagieren im Aspergillus Modell in vergleichbarer Ausprägung mit einer Atemwegseosinophilie, wie man sie auch beim Asthmatiker nach Allergenprovokation beobachtet.

5.3.5. Vergleich zweier unterschiedlicher Formen der Negativkontrolle

In diesem Experiment wurden die zwei möglichen Formen der in Asthma-Modellen Verwendung findenden Negativkontrollen auf eventuelle Unterschiede untersucht. Die Kontrollen unterscheiden sich im dem Zeitpunkt, zudem analog zu den komplett allergenbehandelten Tieren auch die Kontrolltiere einer einmaligen Allergenbehandlung ausgesetzt werden. Die häufigste Form besteht darin die Kontrolltiere mit dem Allergen zu sensibilisieren und alle weiteren Behandlungen mit Vehikel durchzuführen. Bei der alternativen Form werden die Tiere mit Vehikel und i.d.R. zusammen mit dem Adjuvants „Sensibilisiert“ und die letzte Allergenprovokation wird analog zur Positivkontrolle mit dem Allergen durchgeführt. Die letztere Form ist gerade dann sinnvoll, wenn die lungenphysiologische allergische Frühreaktion gemessen wird, insbesondere dann wenn mit komplexen allergenen Extrakten gearbeitet wird, deren zusätzliche Bestandteile, Einfluss auf die Lungenfunktion haben können.

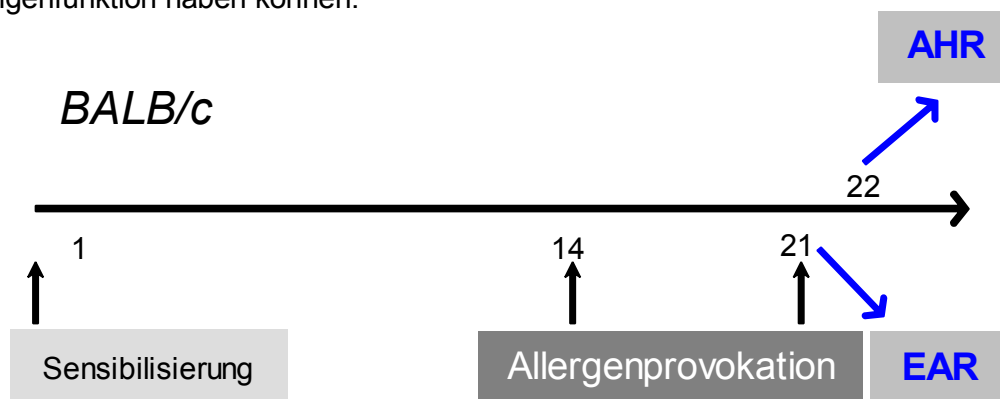


Abb. 43: Behandlungsschema für den Vergleich zweier unterschiedlich generierter Kontrollgruppen im inhalativen Aspergillus Modell an BALB/c Mäusen. Die zweite Allergenprovokation wurde als Lungenfunktionsmessung der allergischen Frühreaktion durchgeführt.

Tag	1	14	21
Gruppe	Sensibilisierung	Allergenprovokation	
	i.p./s.c.	inhalativ	
NEG1	AF/IFA	NaCl	NaCl
NEG2	NaCl	NaCl	AF
POS	AF/IFA	AF	AF

Tabelle 14: Übersicht der Versuchsgruppen mit den entsprechenden Behandlungen für den Vergleich zweier unterschiedlich generierter Kontrollgruppen im inhalativen Aspergillus Modell an BALB/c Mäusen.

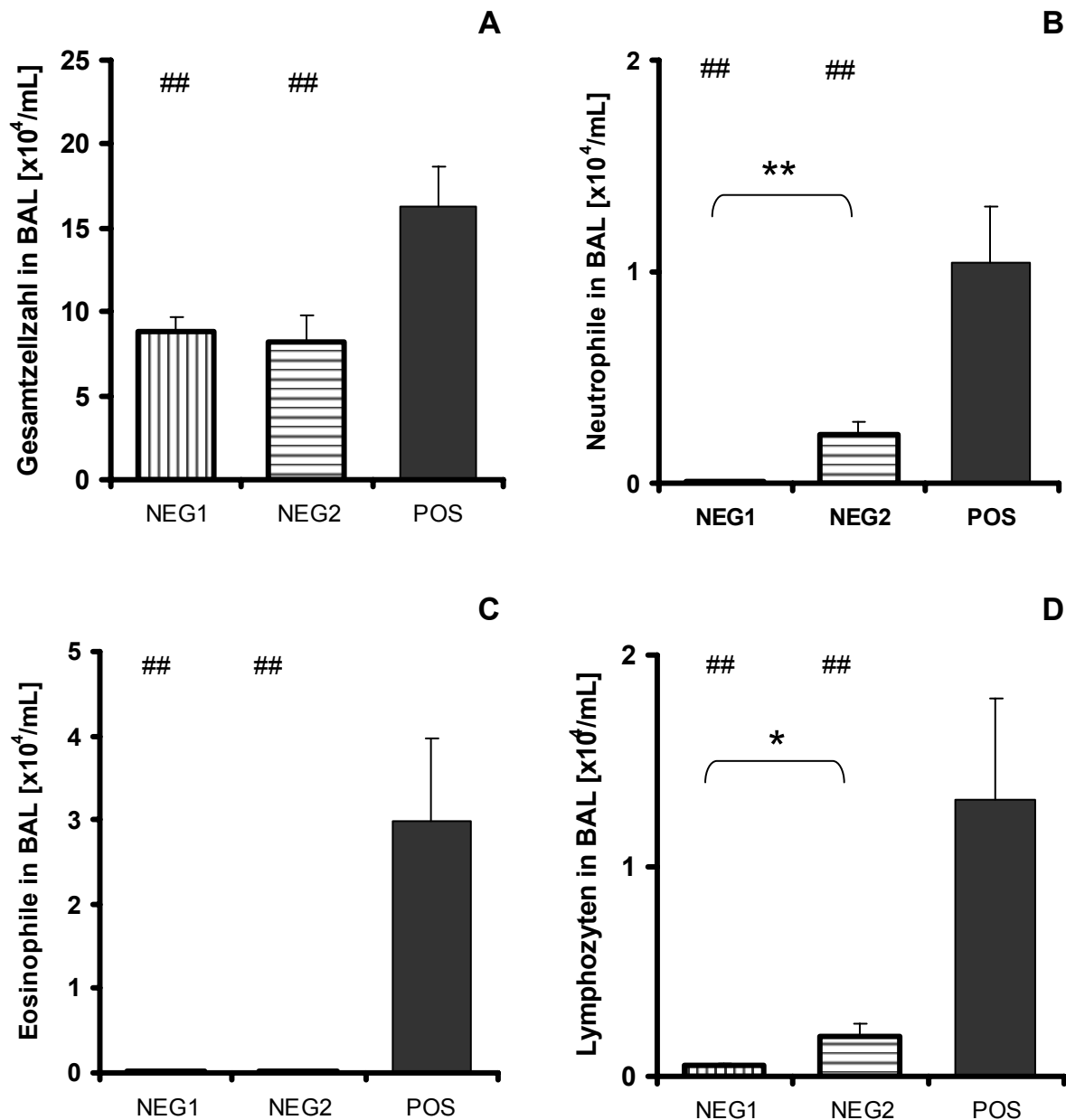


Abb. 44: Differentialzellbild der BAL von BALB/c Mäusen 24h nach letzter inhalativer Allergenprovokation im Aspergillus Modell, dargestellt als 10^4 Zellen pro gewonnenes Lavagevolumen. N = 12 pro Gruppe, ## $p \leq 0,01$ versus Positivkontrolle, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ NEG 1 (AF sensibilisiert) versus NEG 2 (AF inhalativ provoziert). **A:** Gesamt-Leukozytenzahl in der BAL. **B:** Neutrophile Granulozyten in der BAL. **C:** Eosinophile Granulozyten in der BAL. **D:** Lymphozyten in der BAL.

Die Gesamtleukozytenzahl ist in den allergenbehandelten Tieren gegenüber den Kontrollgruppen erhöht (Abb. 44A). Neutrophile Granulozyten sind in der BAL der mit Kochsalzlösung inhalativ provozierten Kontrollgruppe praktisch nicht vorhanden, während die allergenbehandelte Positivgruppe eine deutliche Einwanderung von Neutrophile

Granulozyten in das Lungenlumen zeigt (Abb. 44B). Auch die einmalige inhalative Allergenprovokation führt in den Kontrolltieren zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl neutrophiler Granulozyten in der BAL gegenüber den entsprechend mit Kochsalzlösung behandelten Tieren (Abb. 44B).

Beide Kontrollgruppen weisen keine eosinophilen Granulozyten in der BAL auf, während die allergenbehandelten Tiere eine Atemwegseosinophilie entwickeln (Abb. 44C).

Die Atemwegseosinophilie der allergenbehandelten Tiere ist begleitet von einem Anstieg der Lymphozytenzahl in der BAL. In den mit Kochsalzlösung inhalativ provozierten Kontrolltieren sind wenige Lymphozyten in der BAL vorhanden. Die einmalige inhalative Allergenprovokation führt hingegen zu einem signifikanten Anstieg der Lymphozytenzahl in der BAL, bleibt aber im Vergleich zu den allergenbehandelten Tieren gering (Abb. 44D).

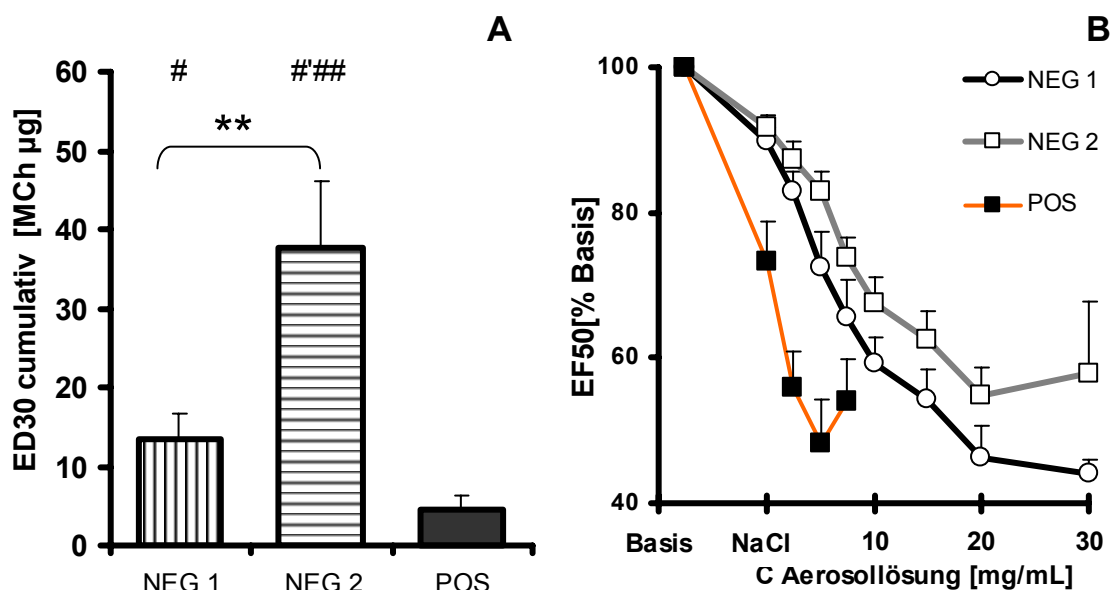


Abb. 45: Atemwegsreagibilität auf inhalative Methacholinprovokation von BALB/c Mäusen 24h nach Allergenprovokation im Aspergillus Modell, gemessen im Headout-System.. N = 12 pro Gruppe, # $p \leq 0,05$, #### $p \leq 0,001$ versus Positivkontrolle, ** $p \leq 0,01$ NEG 1 (AF sensibilisiert) versus NEG 2 (AF inhalativ provoziert). **A:** Atemwegsreagibilität dargestellt als effektive kumulative Methacholindosis, die einen Abfall der EF50 um 30% bewirkt. **B:** Gemittelte Wirkungskurven der EF50 prozentual zum Basalwert als Reaktion auf Kochsalzlösung und steigenden Methacholinkonzentrationen die zur Aerosolgeneierung eingesetzt wurden.

Für die Darstellung der Atemwegsreagibilität wurde eine ED30 berechnet, da ein 50-%iger Abfall der EF50 durch die Methacholinprovokation bei einigen Tieren nicht erreicht wurde.

Die Tiere der Positivkontrolle zeigen eine starke Atemwegshyperreagibilität im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen.

Die Atemwegsreagibilität auf Methacholin ist zwischen den Kontrolltieren allerdings sehr unterschiedlich ausgeprägt. Die einmalige inhalative Allergenprovokation scheint einen positiven Effekt auf die Lungenfunktion auszuüben; Tiere dieser Kontrollgruppe reagieren sehr viel schwächer auf Methacholin als die mit Kochsalzlösung inhalativ provozierten Kontrolltiere (Abb. 45A). Ein analoges Bild der Atemwegsreagibilität ergibt sich auch beim Vergleich der Wirkungskurven. Die Wirkungskurve der Positivkontrolle verläuft erheblich steiler als die der Negativkontrollen (Abb. 45B).

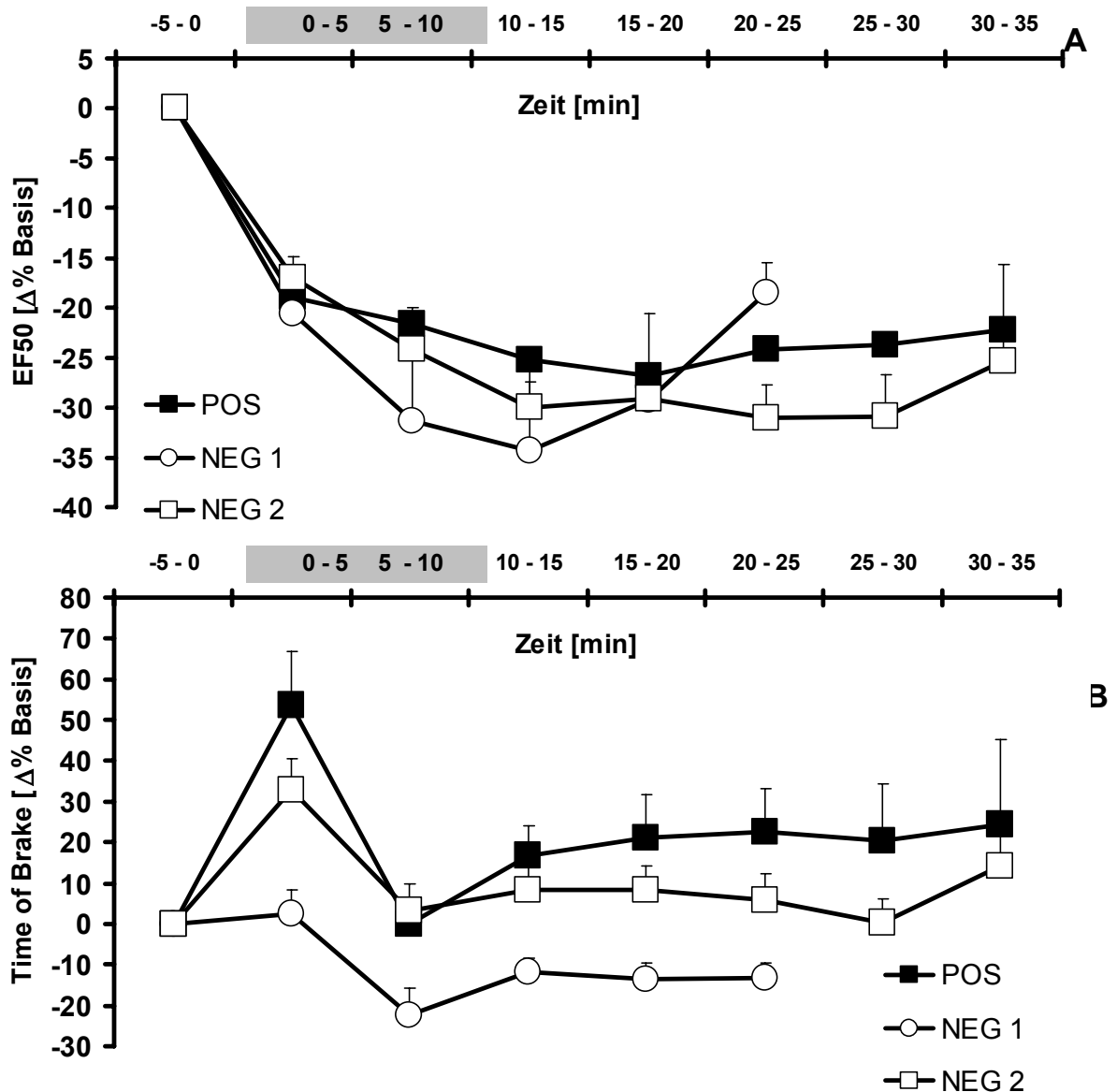


Abb. 46: Reaktion der inhalativen Allergenprovokation auf die Lungenfunktions-Parameter EF50 und Time of Brake von BALB/c Mäusen an Tag 21 des Aspergillus Modells. Dargestellt sind die relativen Änderungen bezogen auf die Basalwerte. Die Datenpunkte sind Mittelwerte von je 12 Tieren aus 5 min Abschnitten, aus denen sich das Maximum bzw., Minimum des Parameters aus Mittlungen von 100 sec. langen Segmenten errechnet.

Die Aerosolexposition ist durch einen grauen Balken in der Zeitachse gekennzeichnet und dauerte 12 min. N = 12 pro Gruppe.

A: Relative Änderung der EF50 im Verlauf der inhalativen Allergenprovokation.

B: Relative Änderung der Time of Brake im Verlauf der inhalativen Allergenprovokation

Alle Tiere reagieren auf die Aerosolexposition mit einem Abfall der EF50, die zum Ende der Messung wieder allmählich in Richtung Basalwert ansteigt. Dieser Anstieg ist bei den Tieren der Positivgruppe am schwächsten ausgeprägt. Die mit Kochsalzlösung provozierten Tiere zeigen eine etwas stärkere Reaktion im Verlauf der Exposition, steigen dann aber wieder steiler in Richtung Basalwert an. Eine allergische Frühreaktion ist im Mittel nicht zu erkennen (Abb. 46A).

Die Ausbildung einer Time of Brake wird in der Lungenfunktion als Maß für eine sensorische Reaktion herangezogen. Alle mit Aspergillus Extrakt-Aerosol provozierten Tiere reagieren direkt auf die Exposition im einem starken Anstieg in der Time of Brake, die Tiere der Positivkontrolle am stärksten. Im weiteren Verlauf der Exposition fällt der Wert auf den Ausgangswert zurück und bleibt dann über den weiteren Verlauf der Messung recht konstant, wobei die Tiere der Positivkontrolle relativ erhöhte Werte beibehalten. Im Gegensatz dazu zeigen die mit Kochsalzlösung exponierten Tiere keine direkte Reaktion auf die Verneblung. Die Time of Brake nimmt sogar im weiteren Verlauf der Exposition ab und pendelt sich danach auf einen Wert zwischen maximaler Reaktion und dem Basalwert ein (Abb. 46B).

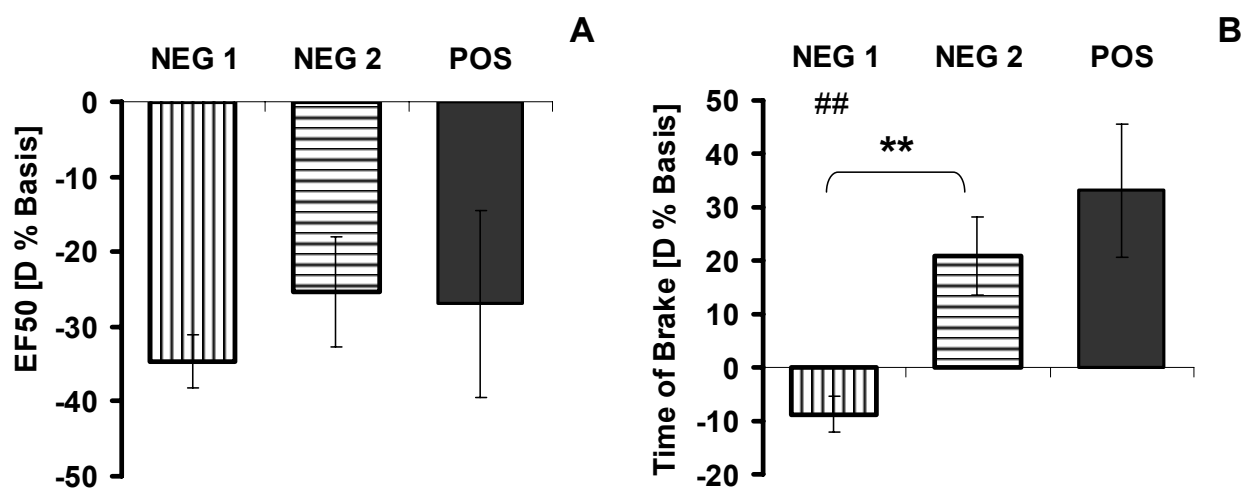


Abb. 47: Reaktion der inhalativen Allergenprovokation auf die Lungenfunktions-Parameter EF50 und Time of Brake, ausgewertet nach der maximalen mittleren Reaktion von Expositionbeginn bis Messende. N = 12 pro Gruppe, ## $p \leq 0,01$ versus Positivkontrolle, ** $p \leq 0,01$ NEG 1 (AF sensibilisiert) versus NEG 2 (AF inhalativ provoziert).

A: Relative maximale Änderung der EF50 auf inhalative Allergenprovokation.

B: Relative maximale Änderung der Time of Brake auf inhalative Allergenprovokation

Analog zu den Verlaufskurven ist nach Auswertung der mittleren maximalen Reaktion kein Unterschied in der relativen EF50-Änderung zwischen den Behandlungsgruppen zu erkennen (Abb. 47A). Für die mittlere maximale Änderung der Time of Brake zeigt sich auch in dieser Darstellung eine gegensätzliche Reaktion zwischen der Exposition mit Allergen und Kochsalzlösung. Die Exposition mit Kochsalzlösung hat keine bis eher positive Auswirkungen auf die Lungenfunktion im Hinblick auf sensorische bedingte Veränderung des Atemmusters. Die Allergenexposition führt in allen Gruppen zu einer Erhöhung der Time of Brake. Diese ist bei den Tieren der Positivkontrolle am stärksten ausgeprägt. Die Unterschiede innerhalb der allergenexponierten Tiere sind allerdings statistisch nicht signifikant (Abb. 47B).

Einfluss der Allergenkonzentration auf die allergische Frühreaktion und Entzündung

Zur Überprüfung eines dosisabhängigen Effekts des Allergens auf Parameter der Lungenfunktion und der allergischen Entzündung wurden die Behandlungsgruppen in eine Niedrig- und eine Hoch- Dosisgruppe geteilt. Je 6 Tiere jeder Gruppe wurden bei der zweiten Allergenprovokation entweder mit einer niedrigen Ausgangslösungs-Konzentration des Allergens (9 mg/mL) oder mit einer hohen (18 mg/mL) inhalativ provoziert.

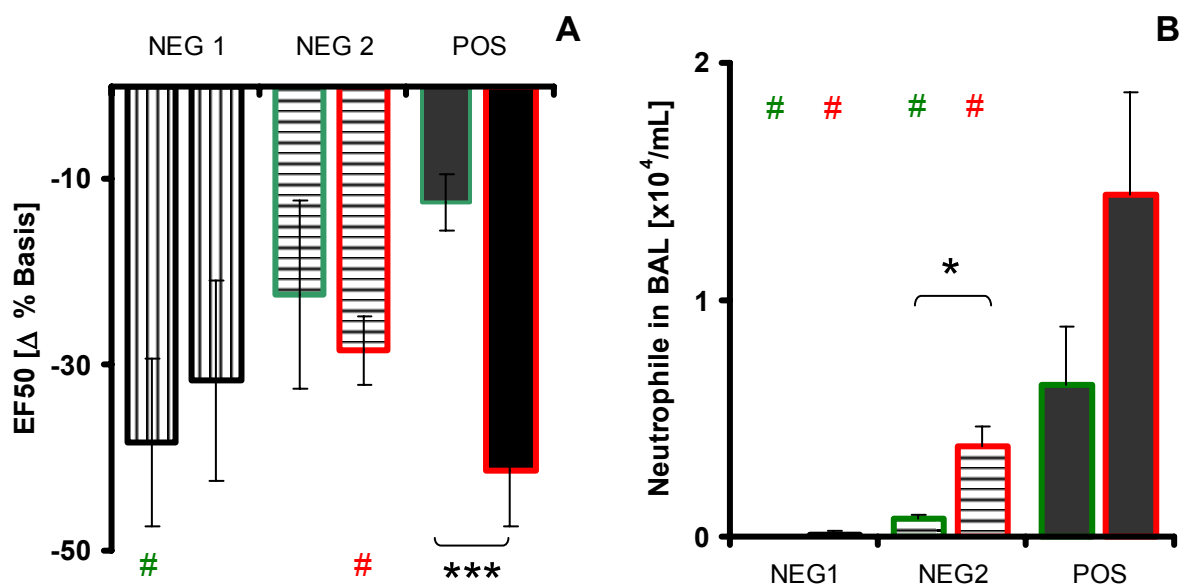


Abb. 48: Einfluss der Aspergillusdosis der zweiten inhalativen Allergenprovokation auf die lungenphysiologische Frühreaktion und Anzahl neutrophiler Granulozyten in der BAL. Grüne Balken = Niedrig-Dosisgruppe (9 mg/mL), rote Balken = Hoch-Dosisgruppe. Die entsprechend farblich markierten Rauten beschreiben die Signifikanzen innerhalb eines Dosiskollektivs bezogen auf die Positivkontrolle # $p \leq 0,05$; die Sternchen beschreiben signifikante Unterschiede zwischen den Allergendosen innerhalb einer Behandlungsgruppe * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$. **A:** Lungenphysiologische Frühreaktion

auf eine inhalative Allergenprovokation einer niedrigen und einer hohen Allergendosis, dargestellt als mittlere maximale relative Änderung der EF50 zum Basalwert.

B: Anzahl neutrophiler Granulozyten in der BAL 24h nach inhalativer Allergenprovokation mit einer niedrigen und einer hohen Allergendosis bzw. Kochsalzlösung.

Die Änderungen in der EF50 als Reaktion auf die inhalative Allergenprovokation sind im Durchschnitt in den Behandlungsgruppen sehr ähnlich und verhalten sich unabhängig von der Allergendosis mit Ausnahme der Positivkontrolle. Die Tiere der Positivkontrolle reagieren extrem unterschiedlich auf die eingesetzten Allergendosen. Die niedrige Allergendosis bewirkt nur einen sehr geringen Abfall der EF50 im Vergleich zu den anderen Gruppen, während die hohe Allergendosis zu einem starken Abfall der EF50 führt, der aber nur geringfügig größer ist als in den anderen Behandlungsgruppen. Bedingt durch diese stark gegensätzliche Reaktion in der Positivgruppe ergibt sich für das Niedrig-Dosis Kollektiv eine signifikante Verringerung gegenüber der Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu ergibt sich ein signifikanter Anstieg der Positivkontrolle gegenüber der Negativkontrolle 2 im Hoch-Dosis Kollektiv (Abb. 48A)

Die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in das Lungenlumen ist in allen inhalativ mit Allergen provozierten Gruppen dosisabhängig erhöht. Dieser Effekt ist in der Positivkontrolle allerdings nur tendenziell erkennbar. In den Kontrolltieren führt die einmalige Allergenprovokation mit der hohen Dosis zu einer deutlichen und signifikanten Verstärkung der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten; und spiegelt somit einen proinflammatorischen Effekt wider (Abb. 48B).

Schlussfolgerung: Die Art der Generierung der Negativkontrolle hat im dargestellten Aspergillus Modell z.T. sehr starken Einfluss auf die untersuchten Endparameter. Nicht-allergische Tiere reagieren lungenphysiologisch anders auf eine inhalative Provokation mit Aspergillus Extrakt als auf Kochsalzlösung. Darüber hinaus provoziert die einmalige inhalative Exposition mit Aspergillus Extrakt eine dosisabhängige Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das Lungenlumen, die durch eine Exposition mit Aerosol generiert aus Kochsalzlösung nicht zu beobachten ist. Auch die Atemwegsreagibilität ist durch eine vorherige Exposition mit Aspergillus Extrakt in nicht-allergischen Tieren verändert. Um die nicht allergengekoppelten Wirkungen des Aspergillus Extraktes in den Aussagen über Unterschiede zwischen Mäusen mit einem asthmatischen Phänotyp und entsprechenden Kontrolltieren vernachlässigen zu können, wurde daher im Folgenden weiterhin eine einmalige inhalative Allergenprovokation zur Generierung der Negativkontrolle verwendet.

5.4. Untersuchung zur Diskriminierung zwischen C3aR- und C5aR-vermittelten Effekten im Aspergillus Modell

In einem Vorexperiment konnte die allergische Atemwegsentzündung im Aspergillus-Mausmodell durch die simultane Blockade der C3aR- und C5aR-vermittelten Funktionen signifikant vermindert werden. - Die Daten sind hier nicht gezeigt, da sich die Aussage im folgenden Experiment in gleicher Form wiederholt. - Unklar blieb, in wie weit dieser Effekt über C3aR- bzw. C5aR –Blockade vermittelt wird, oder die Kombination für die effektive Beeinflussung der pathophysiologischen Phänotyps notwendig ist.

Zur Bearbeitung der Fragestellung wurden BALB/c Mäuse exklusiv mit dem C3aR-Inhibitor oder dem C5aR-Antikörper behandelt. Zusätzlich wurde eine Behandlungsgruppe wieder simultan mit beiden Substanzen behandelt, um als positive Behandlungskontrolle zu dienen und die Reproduzierbarkeit des vorherigen Experiments zu überprüfen. Des Weiteren wurde ein löslicher C1-Rezeptor auf seine Wirkung im Aspergillus Modell getestet, der im Gegensatz zu den anderen Substanzen die Wirkung der Anaphylatoxine nicht über deren Rezeptoren beeinflusst, sondern auf der Ebene der Komplementaktivierung die Freisetzung der Anaphylatoxine inhibiert.

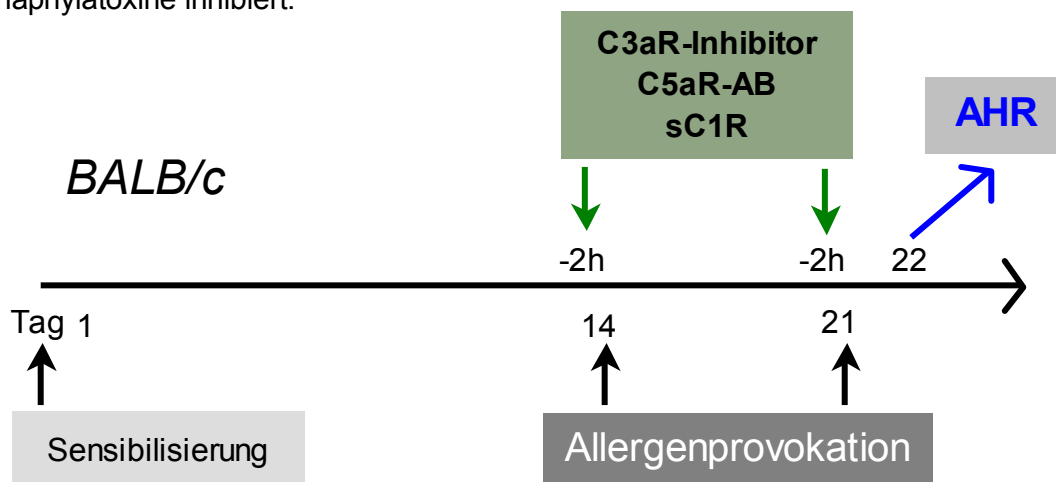


Abb. 49: Behandlungsschema für die Prüfung der C3aR- und C5aR-vermittelten Rezeptorfunktion im inhalativen Aspergillus Modell an BALB/c Mäusen.

Tag	1	14	21	14/21 - 2h	
Gruppe	Sensibilisierung	Allergenprovokation		Behandlung	
	i.p./s.c.	inhalativ		i.n./i.p.	[mg]
NEG	NaCl	NaCl	AF	MSA	0,1/0,1
POS	AF/IFA	AF	AF	MSA	0,1/0,1
C3aR	AF/IFA	AF	AF	SB290157	0,2/0,5
C5aR	AF/IFA	AF	AF	C5aR-AB	0,04/0,1
C3/5aR	AF/IFA	AF	AF	SB290157	0,2/0,5
sCR1	AF/IFA	AF	AF	cCR1	0,2/0,2

Tabelle 15: Übersicht der Versuchsgruppen mit den entsprechenden Behandlungen für die Prüfung der C3aR- und C5aR-vermittelten Rezeptorfunktion im inhalativen Aspergillus Modell an BALB/c Mäusen.

Serum-IgE-Konzentration

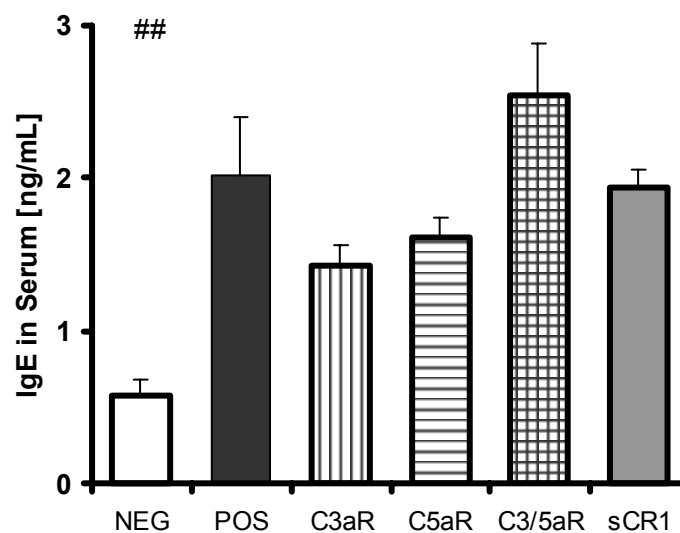


Abb. 50: Gesamt IgE Konzentration im Serum von BALB/c Mäusen 24h nach Allergenprovokation im Aspergillus Modell. N = 10 pro Gruppe, ## p ≤ 0,01 versus Positivkontrolle

Die allergenbehandelten Tiere produzieren vermehrt IgE, dass in erhöhten Konzentrationen im Serum nachweisbar ist. Die Behandlungen durch mit dem C3aR-Inhibitor dem C5aR-Antikörper und dem sCR1 zeigen keinen deutlichen Einfluss auf die IgE-Produktion.

Mediatoren in der BAL

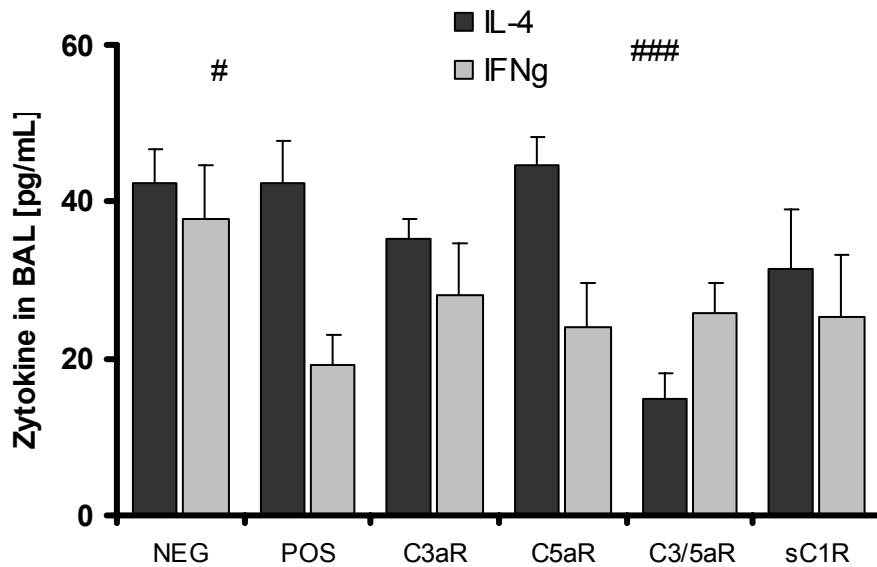


Abb. 51: Konzentrationen der Zytokine IL-4 und IFN γ in der BAL von BALB/c Mäusen 24h nach Allergenprovokation im Aspergillus Modell. N = 10 pro Gruppe, # $p \leq 0,05$, ### $p \leq 0,001$ versus Positivkontrolle.

Die Konzentration von IL-4 in der BAL ist in den Kontrolltieren sowie in allen Behandlungsgruppen auf einem ähnlich niedrigem Niveau, mit Ausnahme der simultan mit dem C3aR-Inhibitor und dem C5aR-Antikörper behandelten Tiere. Die Behandlung reduziert in diesen Tieren die IL-4 Konzentrationen deutlich unter den Level der Kontrollgruppen. IFN γ als typisches Th1 Zytokin und Gegenspieler von IL-4 ist in den allergenbehandelten Kontrolltieren signifikant gegenüber den Tieren der Negativkontrolle verringert. Die Behandlungsgruppen zeigen keine deutlichen Effekte auf die IFN γ Konzentrationen in der BAL (Abb. 51).

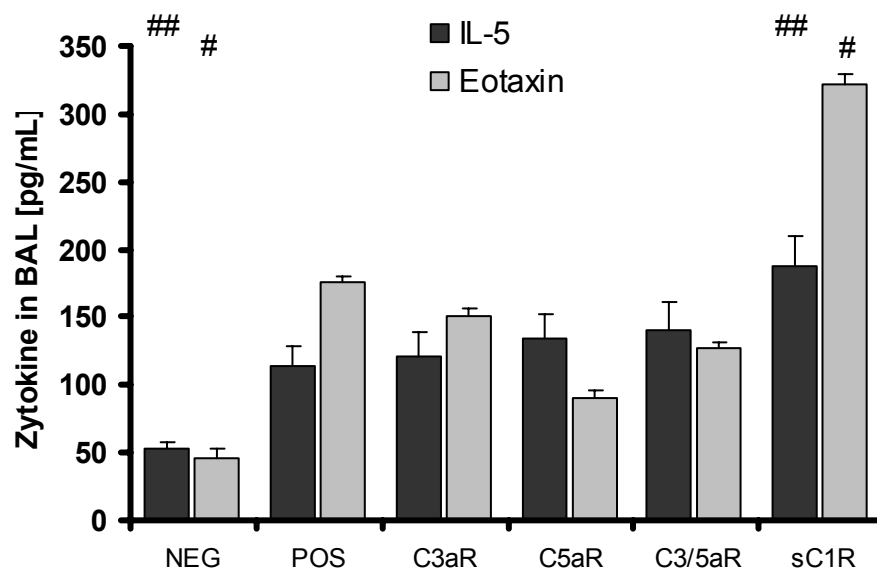


Abb. 52: Konzentrationen der Zytokine IL-5 und Eotaxin-2 in der BAL von BALB/c Mäusen 24h nach Allergenprovokation im Aspergillus Modell. N = 10 pro Gruppe, # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ versus Positivkontrolle.

IL-5 als Wachstums- und Differenzierungsfaktor für Eosinophile ist in den allergenbehandelten Tieren gegenüber der Negativkontrolle erhöht. Analog zu IL-5 ist die Konzentration des Eosinophilen-Chemokins Eotaxin-2 in den allergenbehandelten Tieren gegenüber den Kontrolltieren erhöht. Die Behandlung mit dem C3aR-Inhibitor und dem C5aR-Antikörper separat oder in Kombination zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die IL-5 oder Eotaxin-2 Konzentrationen in der BAL. Die mit dem sCR1 behandelten Tiere hingegen weisen neben erhöhten IL-5 Konzentrationen auch vermehrt Eotaxin-2 in der BAL auf (Abb. 52).

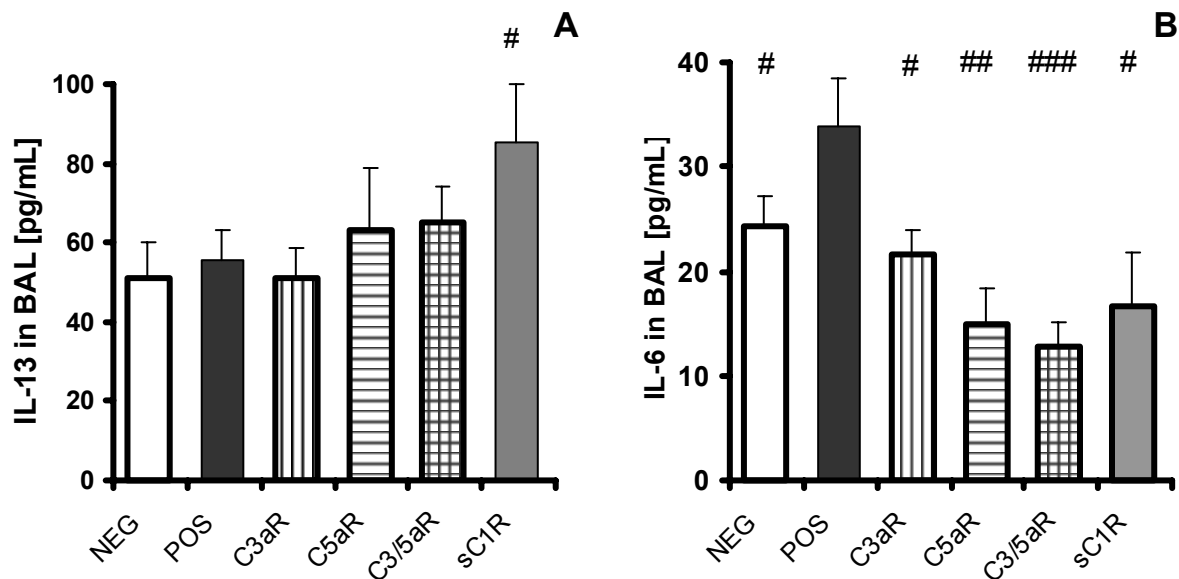


Abb. 53: Konzentrationen von **A:** IL-13 und **B:** IL-6 in der BAL von BALB/c Mäusen 24h nach Allergenprovokation im Aspergillus Modell. N = 10 pro Gruppe, # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$, ### $p \leq 0,001$ versus Positivkontrolle.

IL-13 ist in den allergenbehandelten Tieren als auch in den Tieren der Negativkontrolle in gleicher Menge vorhanden. Die Behandlung mit dem C3aR-Inhibitor und dem C5aR-Antikörper separat oder in Kombination zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die IL-13 Konzentrationen in der BAL. In denen mit dem sCR1 behandelten Tiere ist parallel zu erhöhten IL-5 und Eotaxin-2 Konzentrationen auch vermehrt IL-13 in der BAL nachzuweisen (Abb. 53A).

IL-6 ist in beiden Kontrollgruppen in geringem Masse vorhanden, in der Allergenbehandelten Positivkontrolle aber signifikant höher. Die Behandlung mit dem C3aR-Inhibitor und dem C5aR-Antikörper separat oder in Kombination sowie mit dem sCR1 reduzieren alle die IL-6 Konzentration in der BAL im Verhältnis zur Positivkontrolle. Die Behandlung mit dem C5aR-Antikörper separat oder in Kombination mit dem C3aR-Inhibitor reduzieren die IL-6 Konzentration sogar unter Negativkontroll-Niveau (Abb. 53B).

Lungenhistologie

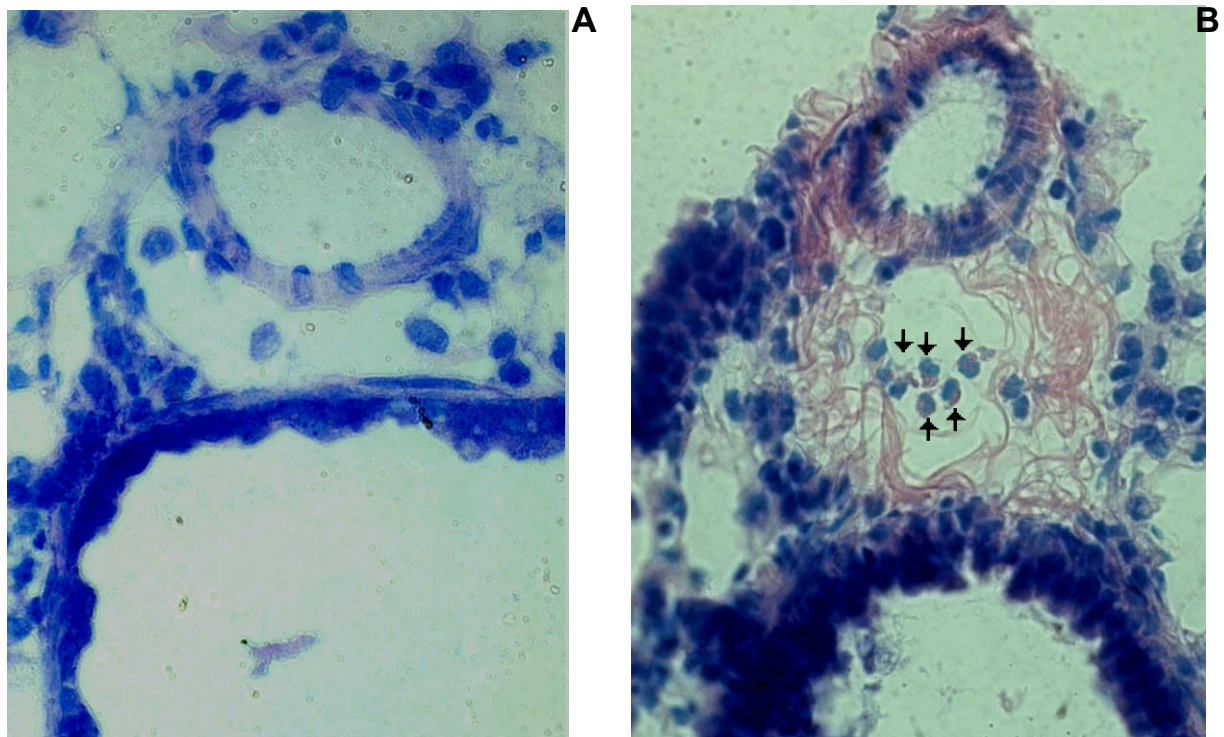


Abb. 54: Kryoschnitte von Mauslungen 24h nach Allergenprovokation im Aspergillus Modell, Giemsa-Färbung, Vergrößerung 400-fach. **A:** Negativkontrolle, unsensibilisiert und ein Mal inhalativ mit Aspergillus Extrakt exponiert. **B:** Positivkontrolle, sensibilisiert und zweimal inhalativ mit Aspergillus Extrakt exponiert. Die Pfeile markieren eosinophile Granulozyten.

In den Tieren der Positivkontrolle finden sich im Vergleich zur Negativkontrolle viele eosinophile Granulozyten in der Lunge, die besonders im perivaskulären Raum zwischen Gefäß und Atemweg gut zu identifizieren sind. Des Weiteren fällt in der Positivkontrolle ein massives Atemwegsepithel auf, das reich an Becherzellen ist. Ausgeprägt ist ebenso die Ausbildung von Bindegewebsfasern in den sensibilisierten und allergenexponierten Tieren (Abb 54).

In den Behandlungsgruppen sind die Unterschiede zur Positivkontrolle weniger deutlich und in verschiedenen Ausschnitten der Lungen nicht einheitlich ausgeprägt. Darüber hinaus ist generell die Entzündung in der Lunge nicht gleichmäßig ausgebildet, was bereits makroskopisch, gekennzeichnet durch eine fahle matte Färbung der Lungen, zu erkennen ist. Eine valide Quantifizierung der eosinophilen Granulozyten an Lungenschnitten ist bereits aus diesen Gründen schwer möglich. Auch unter Einbeziehung von Bezugsgrößen wie ausgezählte Lungenfläche oder Epithel-/Endothellänge ist die Analyse stark von Auswahl des bewerteten Ausschnitts abhängig, so dass hier keine objektiven Darstellungen möglich sind.

Differentialzellbild der BAL

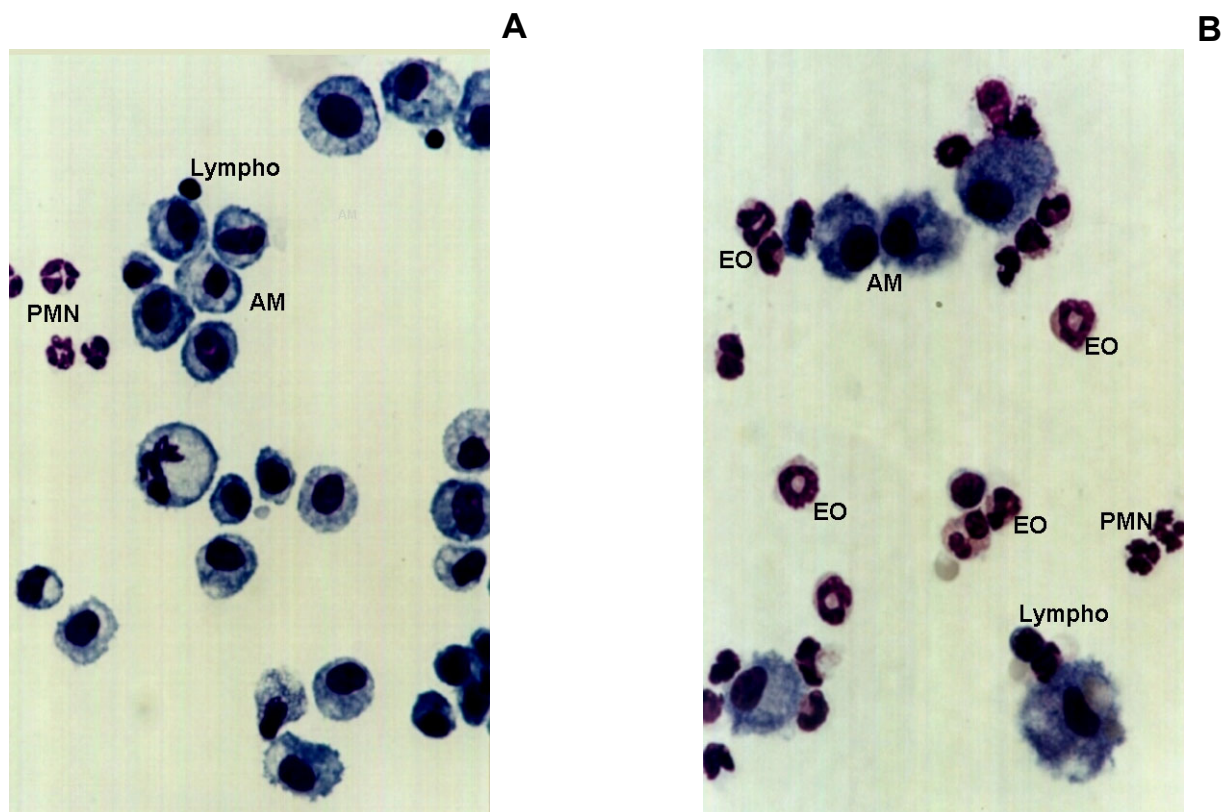


Abb. 55: BAL Zytospots von BALB/c Mäusen 24h nach Allergenprovokation im Aspergillus Modell, gefärbt nach Papanheim, Vergrößerung 630-fach. **A:** Negativkontrolle, unsensibilisiert und ein Mal inhalativ mit Aspergillus Extrakt exponiert. **B:** Positivkontrolle, sensibilisiert und zweimal inhalativ mit Aspergillus Extrakt exponiert. AM: Alveolarmakrophage, EO: Eosinophile Granulozyten, PMN: neutrophiler Granulozyt, Lympho: Lymphozyt

Die BAL der Negativkontrolle wird von Alveolarmakrophagen dominiert, daneben sind einige Neutrophile Granulozyten vorhanden und vereinzelt auch Lymphozyten zu finden. Im Gegensatz dazu treten in der BAL der Positivkontrolle vermehrt eosinophile Granulozyten in Erscheinung. Darüber hinaus sind vermehrt Lymphozyten vorhanden. Lymphozyten und Alveolarmakrophagen sind im Vergleich zu der Negativkontrolle sehr viel größer und weisen einen aktivierten Phänotyp auf (Abb. 55).

Die Abbildung von einzelnen Zytospot-Bereichen die repräsentativ für die 4 Behandlungsgruppen sind wäre hier wenig objektiv, da die Zelltypen nicht gleichmäßig über den Spot verteilt sind und die Unterschiede nicht völlig gegensätzlich sind wie zwischen der Positiv- und Negativkontrolle. So dienen die gezeigten Abbildungen ebenso wie der Bilder der Lungenhistologie lediglich der visuellen Untermalung der eosinophilen Entzündung in der Lunge, die in den folgenden Diagrammen objektiv quantifiziert dargestellt ist.

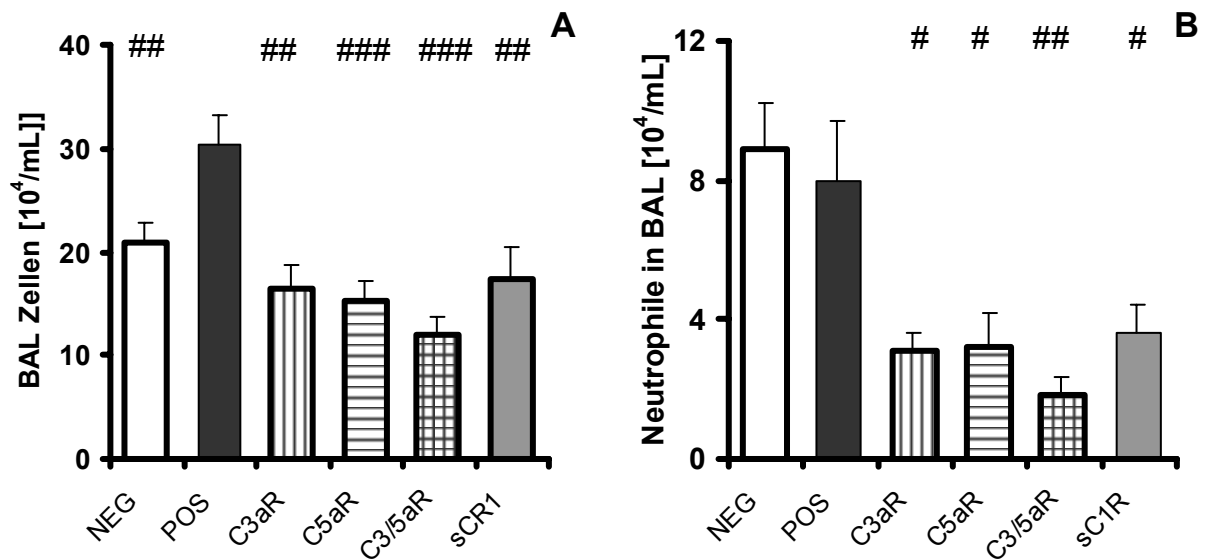


Abb. 56: Gesamt-Leukozytenzahl und Anzahl neutrophiler Granulozyten in der BAL von BALB/c Mäusen 24h nach letzter inhalativer Allergenprovokation im Aspergillus Modell, dargestellt als 10^4 Zellen pro gewonnenes Lavagevolumen. N = 10 pro Gruppe, # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$, ### $p \leq 0,001$ versus Positivkontrolle.

Die Gesamtleukozytenzahl in der BAL ist in den allergenbehandelten Kontrolltieren gegenüber denen der Negativkontrolle erhöht. Die Behandlungen mit dem C3aR-Inhibitor, dem C5aR-Antikörper sowie mit dem sCR1 reduzieren alle die Leukozyteninfiltration in das Lungenlumen deutlich auf das Niveau der Negativkontrolle (Abb. 56A).

Neutrophile Granulozyten sind in beiden Kontrollgruppen in der BAL vorhanden. Parallel zu den Konzentrationen des proinflammatorischen Zytokins IL-6 ist in allen Behandlungsgruppen der Influx neutrophiler Granulozyten in das Lungenlumen reduziert. Am stärksten ist dieser Effekt in den Tieren, die simultan mit dem C3aR-Inhibitor und dem C5aR-Antikörper behandelt wurden ausgeprägt (Abb. 56B).

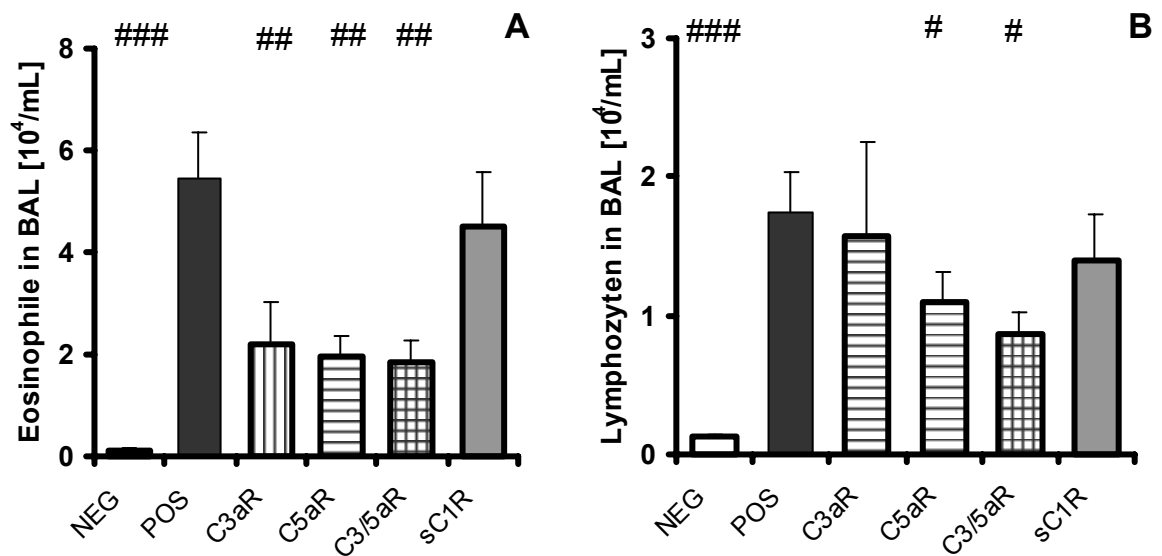


Abb. 57: Anzahl eosinophiler Granulozyten und Lymphozyten in der BAL von BALB/c Mäusen 24h nach letzter inhalativer Allergenprovokation im Aspergillus Modell, dargestellt als 10⁴ Zellen pro gewonnenes Lavagevolumen. N = 10 pro Gruppe, # p ≤ 0,05, ## p ≤ 0,01, ### p ≤ 0,001 versus Positivkontrolle.

Eosinophile Granulozyten sind in den Kontrolltieren in der BAL kaum zu finden. Die allergenbehandelten Kontrolltiere hingegen entwickeln eine deutliche Atemwegseosinophilie. Die Behandlung mit dem C3aR-Inhibitor und dem C5aR-Antikörper separat oder in Kombination reduzieren die Eosinophilieninfiltration in das Lungenlumen um 50% bis 60% relativ zur Positivkontrolle. Die Behandlung mit dem sCR1 hingegen zeigt keine Wirkung auf die Anzahl eosinophile Granulozyten in der BAL (Abb. 57A).

Die Atemwegseosinophilie geht einher mit einer Einwanderung von Lymphozyten in das Lungenlumen. Alle allergenbehandelten Tiere zeigen eine deutliche Zunahme der Lymphozytenzahl in der BAL. Die Lymphozyteneinwanderung in das Lungenlumen ist durch die Behandlung dem C5aR-Antikörper separat oder in Kombination mit dem C3aR-inhibitor signifikant verringert. Die Behandlung mit dem C3aR-Inhibitor oder dem sCR1 haben keinen Effekt auf die Lymphozytenzahl in der BAL (Abb. 57B).

Atemwegsreagibilität

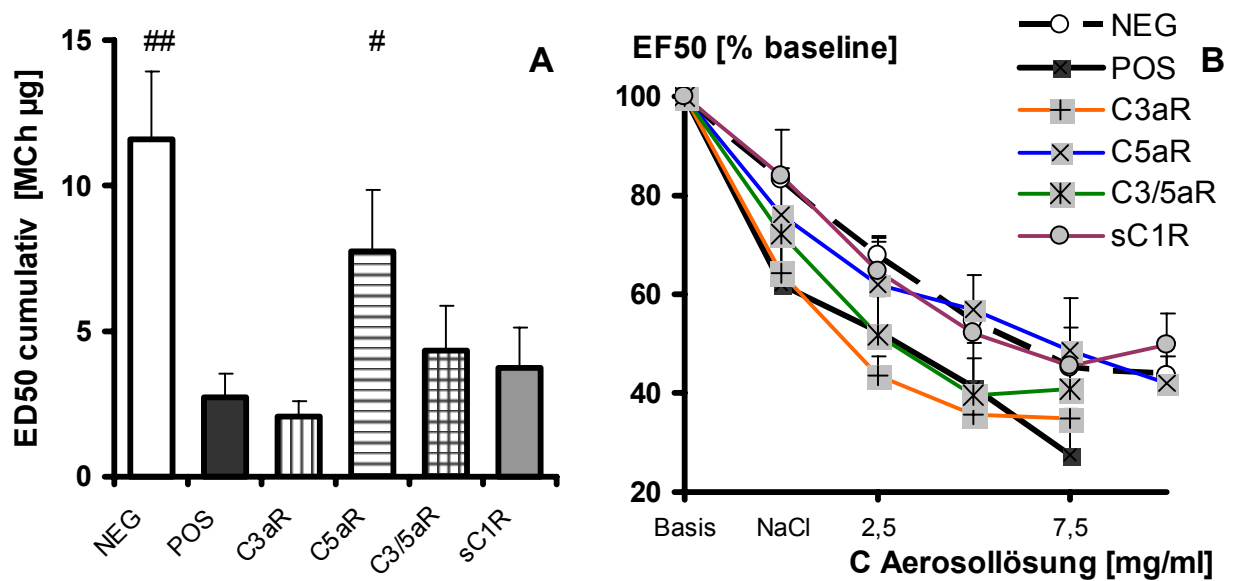


Abb. 58: Atemwegsreagibilität auf inhalative Methacholinprovokation von BALB/c Mäusen 24h nach Allergenprovokation im Aspergillus Modell, gemessen im Headout-System. N = 10 pro Gruppe, # $p \leq 0,05$ versus Positivkontrolle. **A**: Atemwegsreagibilität dargestellt als effektive kumulative Methacholindosis, die einen Abfall der EF50 um 50% bewirkt. **B**: Gemittelte Wirkungskurven der EF50 prozentual zum Basalwert als Reaktion auf Kochsalzlösung und steigende Methacholinlösungskonzentrationen.

Die allergenbehandelten Tiere entwickeln eine Atemwegshyperreagibilität. Die Behandlung mit dem C3aR-Inhibitor zeigt keinen Einfluss auf diesen Phänotyp. Im Gegensatz dazu vermag die Behandlung mit dem C5aR-Antikörper die Atemwegsreagibilität signifikant zu vermindern. Die Behandlung mit dem C3aR-Inhibitor und dem C5aR-Antikörper in Kombination sowie die Behandlung mit dem sCR1 zeigen lediglich einen Trend zu einer verringerten Atemwegsreagibilität und ist von der Positivkontrolle nicht signifikant verschieden (Abb. 58A).

Der Verlauf der Wirkungskurven spiegelt deutlich den Unterschied in der Reagibilität zwischen Negativkontrolle und allergenbehandelten Kontrolltieren wieder. Die Positivkontrolle reagiert bei der gleichen Methacholinkonzentration sehr viel stärker als die Tiere der Negativkontrolle. Auch die mit dem C5aR-Antikörper behandelten Tiere zeigen einen deutlich flacheren Kurvenverlauf mit einer Steigung vergleichbar zur Negativkontrolle (Abb. 58B).

Genexpression der Anaphylatoxinrezeptoren

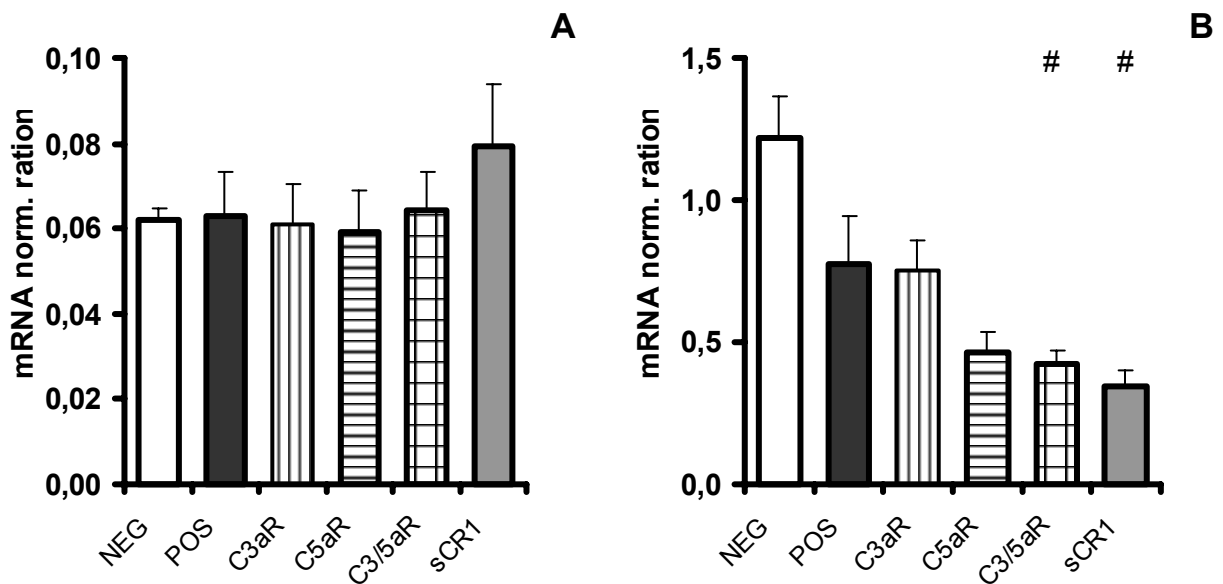


Abb. 59: Relative mRNA Expression der Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR aus Halblungenlysaten, 24h nach Allergenprovokation im Aspergillus Modell. Dargestellt als normalisiertes Verhältnis (Ratio) zu PBGD. N = 10 pro Gruppe, # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$, versus Positivkontrolle.

Die relative mRNA Expression des C3aR ist relativ niedrig in der Lunge und in den Kontrollgruppen sowie in den mit dem C3aR-Inhibitor und dem C5aR-Antikörper separat oder in Kombination behandelten Tieren zum Beobachtungszeitpunkt identisch. (Abb. 59A). Der C5aR ist deutlich stärker in der Lunge exprimiert. Die Expression ist in den allergenbehandelten Kontrolltieren signifikant zur Negativkontrolle reduziert. Die Behandlung mit dem C3aR-Inhibitor zeigt keinen Effekt auf die Expression die relativen mRNA Gehalte, sie sind identisch zur Positivkontrolle. Die Behandlung mit dem C5aR-Antikörper separat und in Kombination sowohl die Behandlung mit dem sCR1 führen zu einer weiteren Herunterregulierung des mRNA Expression, diese ist aber lediglich in der C3aR-I/C5aR-AB Kombinationsbehandlungsgruppe und in den Tieren, behandelt mit dem sC1R signifikant zur Positivkontrolle vermindert (Abb. 59B).

5.5. Proteinexpression des C5a-Rezeptors in Kryoschnitten der Mauslunge

Für die Untersuchung des Komplementsystems und insbesondere der Anaphylatoxine sind für die Maus kaum spezifische Antikörper kommerziell erhältlich. Ein spezifischer Antikörper gegen den murinen C5a-Rezeptor, der auch in den Tierexperimenten eingesetzt wurde, stand jedoch zur Verfügung. Um zu den Daten zur Genexpression die Proteinexpression des C5aR in der Lunge zu untersuchen, wurde der Antikörper für immunhistologische Färbungen des C5aR eingesetzt.

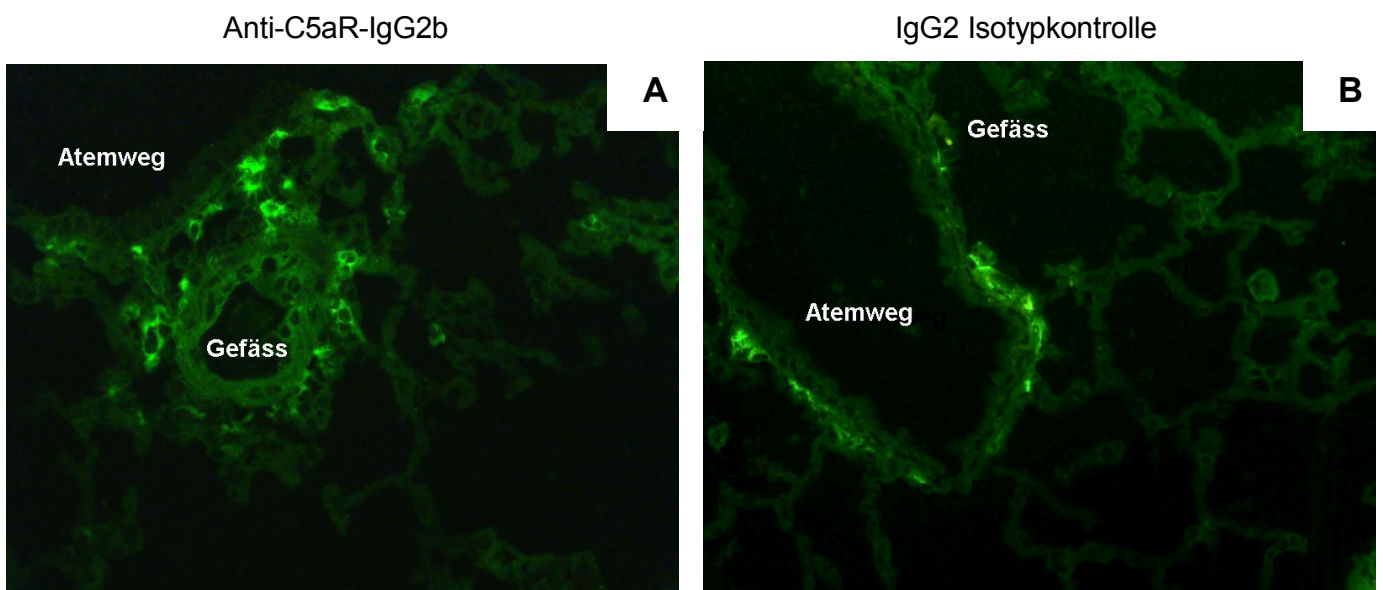


Abb. 60: Immunhistologische Färbung des C5aR an Kryoschnitten der Mauslunge, über einen sekundären Brückenantikörper und einem tertiären FITC-gekoppelten Antikörper, Vergrößerung 400-fach. **A:** Primärantikörper = Anti-Maus-C5aR Ratte IgG2b **B:** Primärantikörper = Isotypkontrolle Ratte IgG2.

Positiv gefärbte Zellen sind mit dem spezifischen C5aR-Antikörper vor allem im Perivaskulären Raum zwischen Gefäß und Atemweg zu detektieren. Die Färbung zeigt allerdings wesentliche unspezifische Komponenten, denn auch unter Verwendung der Isotypkontrolle als Primärantikörper sind besonders im Bereich des Atemwegsepithels Zellen positiv gefärbt.

Die immunhistochemische Färbung wurde vielfältig variiert, um ein eindeutiges Signal zu erzielen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte allerdings keine eindeutig spezifische Färbung für den C5aR entwickelt werden.

5.6. Bestimmung der Konzentrationen von C3a desarg und C5a desarg in der BAL

5.6.1. C3a desarg und C5a desarg Konzentration in der BAL von Asthmatischer nach segmentaler Allergenprovokation

Die Desarginierung von C3a zu C3a desarg und von C5a zu C5a desarg ist die natürliche Regulation der Anaphylatoxin-Wirkungen, vermittelt durch die Carboxypeptidase N im Serum. Die Quantifizierung von C3a und C5a durch die entsprechenden Systeme ist daher auf die Messung dieser Inaktivierungsprodukte ausgelegt. In der BAL ist eine entsprechende Inaktivierung durch die Carboxypeptidase N oder Enzyme mit ähnlicher Aktivität nicht bekannt, obgleich wahrscheinlich. Der für die Bestimmung der Gehalte für C3a desarg und C5a desarg verwendete RIA ist jedoch spezifisch sowohl für die desarginierten Inaktivierungsprodukte als auch für die nativen Proteine.

Die Messung der Anaphylatoxine in der BAL von Asthmatischer diente hier zum einem zur Reproduktion, der bereits veröffentlichten Daten und als Grundlage für die Prüfung einer Adaptionsfähigkeit des Messsystems an das murine System.

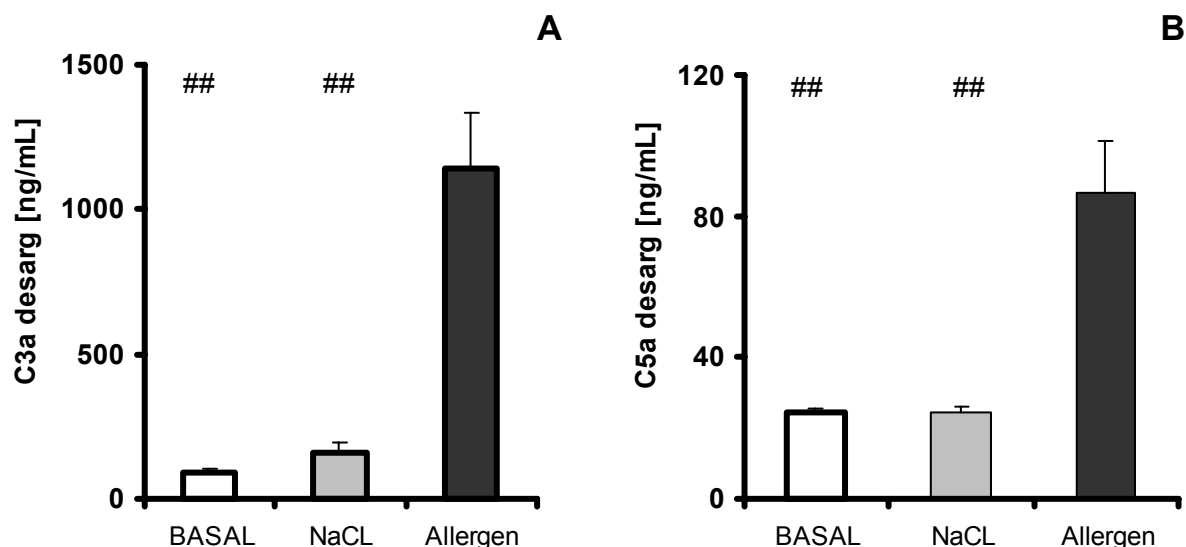


Abb. 61: **A:** C3a desarg und **B:** C5a desarg Konzentration in der BAL von Asthmatischer 24h nach segmentaler Allergenprovokation im Vergleich zu Basalwert und Vehikelkontrolle (NaCl).

N = 10 pro Gruppe, ## $p \leq 0,01$ versus Positivkontrolle.

Die Konzentration der ersten Inaktivierungsprodukte der Anaphylatoxine von C3a desarg und C5a desarg sind nach einer segmentalen Allergenprovokation von Asthmatischer stark in der BAL erhöht. Die Provokation durch Kochsalzlösung allein führt bereits zu einem geringen Anstieg in der C3a desarg Konzentration im Vergleich zum Basalwert (Abb. 61).

5.6.2. Prüfung der human spezifischen C3a desarg- und C5a desarg-RIA auf Kreuzreaktivität zu den analogen Maus-Peptiden.

Zur Überprüfung einer Kreuzreaktivität der human-spezifischen Antikörper gegen C3a desarg und C5a desarg des RIA wurden Verdrängungsexperimente für die Bindung des Antikörpers an das Protein aus dem humanem Standard des Kits gegenüber den kompetitiven Proteinen aus murinem und humanem Probenmaterial durchgeführt.

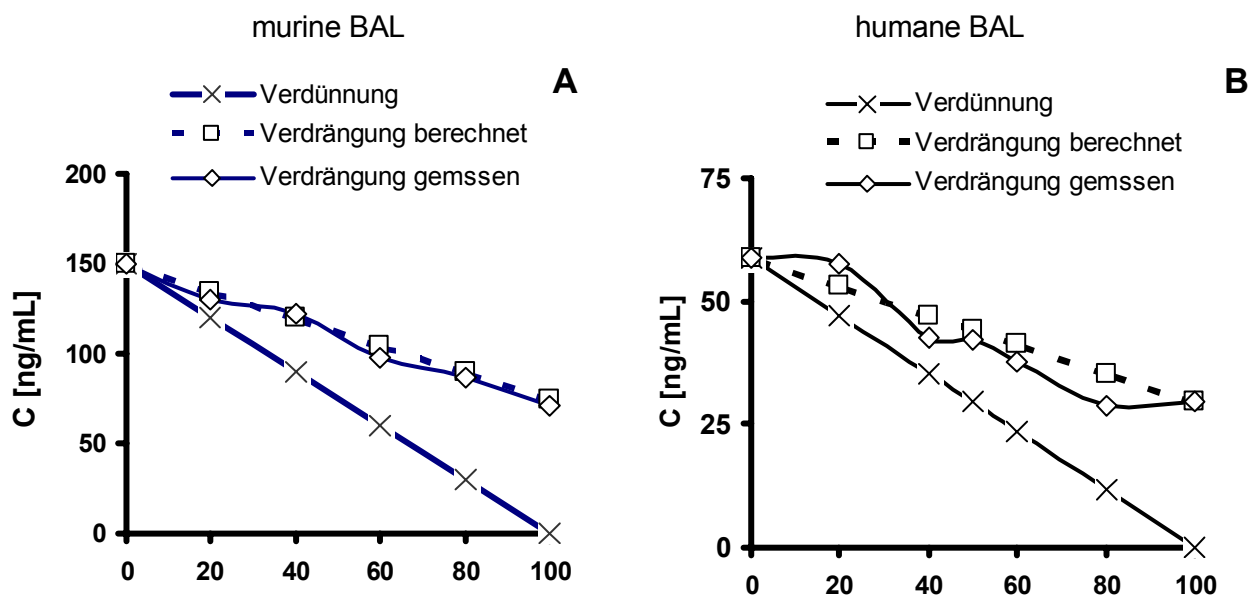


Abb. 62: Verdrängungsreihen von humanem C3a desarg Standard gegenüber dem kompetitiven Proteinen aus **A**: muriner und **B**: humaner BAL.

Die Verdrängungskurven zeigen sowohl für murine als auch humane BAL einen kompetitiven Effekt zum entsprechenden Standard. Diese ist allerdings gerade für die humane BAL auf Grund der relativ geringen Ausgangskonzentration nicht sehr überzeugend darzustellen (Abb. 62)

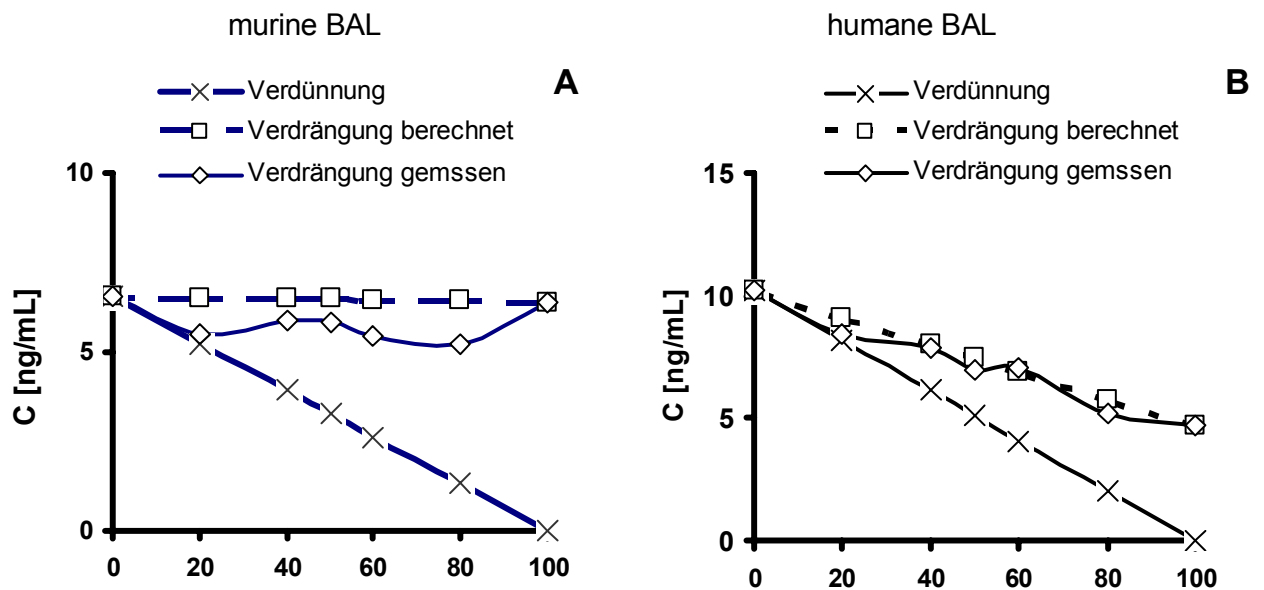


Abb. 63: Verdrängungsreihen von humanem C5a desarg Standard gegenüber dem kompetitiven Proteinen aus **A**: muriner und **B**: humaner BAL.

Analog zu den Verdrängungsreihen zu C3a desarg ist auch für C5a desarg eine kompetitive Verdrängung des Standards durch die murine als auch die humane BAL zu messen. Grundlage der Verdrängungsexperimente bilden aber hier murine Proben mit einer relativ geringen Ausgangskonzentration (Abb. 63).

In einer Reihe von Untersuchungen fanden sich keine murinen Proben mit einem höheren positiven Signal, das als besser geeignetes Ausgangsmaterial hätte dienen können. Auch Maus-Serum oder Maus-Komplement-Extraktionen mit oder ohne Aktivierung durch Zymosan oder Cobra-Venum-Faktor ergaben im Gegensatz zu entsprechenden humanen Proben kein stark positives Signal in diesem Messsystem.

6. Diskussion

Die Bedeutung der Anaphylatoxine als Mediatoren von Entzündungsprozessen ist lange Zeit bekannt. Bereits Ende der 1990er Jahre wurden veränderte Komplementaktivitäten im Blut und erhöhte C3a-Gehalte in der BAL von Asthmatikern festgestellt [Onyemelukwe GC 1989, Castro FF 1991, Onodera H 1991, van de Graaf EA 1992]. Vor 3 Jahren wurde dann erstmals an C3aR-defizienten Mäusen und Meerschweinchen die Bedeutung der Anaphylatoxine in der Ausbildung eines asthmatischen Phänotyps dargestellt [Humbles AA 2000, Bautsch W 2000], und inzwischen in mehreren Tierexperimenten bestätigt [Drouin SM 2002, Abe M 2001, Taube C 2003]. In diesen Experimenten konnten keine vergleichenden Aussagen über C3a und C5a-vermittelte Effekte getroffen werden und die meisten wurden an gendefizienten Tieren durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von C3a und C5a in der Pathophysiologie des allergischen Asthma am murinen Modell der Atemwegsentzündung und Hyperreagibilität untersucht. Hierfür wurden gezielt die Funktionen der Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR durch pharmakologische Behandlung in der allergischen Effektorphase blockiert, und der Einfluss auf die Ausbildung des asthmatischen Phänotyps untersucht.

Die wichtigsten Ergebnisse dabei waren, dass sowohl die Blockade des C3aR als auch die des C5aR die Einwanderung von eosinophilen Granulozyten in die Lunge reduziert, und dass eine Blockade des C5aR die Atemwegshyperreaktivität vermindert.

6.1. Mausmodelle für die Untersuchung des Asthma bronchiale

6.1.1. Lungenfunktionsmessung der Atemwegsreagibilität

Die Atemwegshyperreagibilität ist das wesentliche diagnostische Merkmal einer obstruktiven Ventilationsstörung wie sie beim Asthma bronchiale auftritt. Sie wird am Patienten über einen Bronchoprovokationstest spirometrisch ermittelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Messmethoden für das Maussystem etabliert, über die eine Lungenfunktionsmessung an Versuchstieren durchgeführt werden kann. Analog zum humanen System wurden definierte Provokation mit Allergenen oder Bronchokonstriktoren wie Methacholin durchgeführt und die lungenphysiologische Reaktion gemessen. Sowohl die Methode der orotrachealen Intubation an der narkotisierten Maus als auch die Headout Bodyplethysmographie an der wachen Maus eigneten sich gut, relevante Parameter der Atemmechanik zwischen lungengesunden und lungenkranken Mäusen vergleichend darzustellen. Die Behandlung der Mäuse mit Allergen über Sensibilisierung und Allergenprovokation führte zur Ausbildung einer

Atemwegshyperreagibilität gegenüber Methacholin, wie sie auch beim Asthmatiker zu beobachten ist. Diese ließ sich sowohl über die Lungenfunktionsparameter Resistance als auch dem Midexpiratorischen Fluss (EF50) messen. Dies steht im Einklang mit Studien von Finotto und Glaab, in denen die Verwendung verschiedener Methoden der Lungenfunktion vergleichbare Ergebnisse lieferten [Finotto S 2001, Glaab 2001].

Trotz der ähnlichen Symptomatik in der Lungenfunktion, kann das Mausmodell die Komplexität der Atemwegshyperreagibilität beim Asthma bronchiale nur in Teilen widerspiegeln. Die Respirationssysteme von Mensch und Maus sind anatomisch und auch funktionell in einigen Punkten verschieden. [McBride JT 1992]

Abgesehen von ihrer geringern Gesamtgröße mit einer totalen Lungenkapazität (TLC) von ungefähr 1 mL ist der Respirationstrakt der Mauslunge weniger verzweigt, in 13–17 Generationen im Vergleich zu 17-21 beim Menschen, und eher monopodial als dichotom. Der Parenchymanteil bei der Maus ist geringer, dafür machen die Atemwege einen größeren Anteil aus mit kleineren aber auch deutlich weniger Alveolen. Der relativ große Gesamtdurchmesser der Atemwege ist vermutlich für die Überwindung des Atemwegwiderstandes bei der hohen Atemfrequenz von 250-350 1/min erforderlich. Die Blut-Gas-Barriere ist mit 0,32 μm vergleichbar mit der der Ratte (0,38 μm) aber nur fast halb so dick wie beim Menschen (0,62 μm) [Nagase T 1997].

Ein wesentlicher funktioneller Unterschied der Lunge von Maus und Ratte im Vergleich zu der des Menschen ist das Fehlen von submukosalen Drüsen und eine hohe Anzahl von Clara-Zellen [McBride JT 1992]. Die Mukosa der Atemwege wird bei der Maus auch kaum über Gefäße versorgt und nur spärlich durch afferente Nerven innerviert. Der Automatierythmus des Atemzentrums ist fast vollständig autonom (abgesehen vom Schnappatmungszentrum) und nur abhängig von der afferenten Nervenaktivität, die durch den mechanischen Reiz der Atmung stimuliert wird. So kann in der Maus auch kein Hustenreflex ausgelöst werden.

Beim Menschen können eine Vielzahl von Substanzen einen Bronchospasmus auslösen, hierzu zählen Acetylcholin, Methacholin, Histamin, Leukotriene (LTC₄, LTD₄, LTE₄), Tachykinin, Bradykinin, Endotheline, Prostaglandine (PGD₂, PGF_{2a}, TXA₂) and Serotonin, während die Mauslunge v.a. auf cholinerge Agonisten, Serotonin and Endotheline reagiert.

Trotz der vielen anatomischen und funktionellen Unterschiede zwischen der Mensch- und Mauslunge lassen sich wesentliche Symptome des Asthma bronchiale im Mausmodell hervorrufen. Einige dieser Charakteristika wie die Ausbildung einer Früh- oder Spätreaktion hängen aber z.T. stark vom Behandlungsprotokoll ab [Cieslewicz G 1999]. In speziellen Langzeit-Modellen lassen sich auch chronische Umbauprozesse wie

Basalmembranverdickung und Hyperplasie der glatten Muskelzellen induzieren [Sakai K 2001, Henderson WR Jr 2002].

Inwieweit die anatomischen Unterschiede Auswirkungen auf die Relevanz der Lungenfunktionsmessung an der Maus haben ist im Wesentlichen von der Fragestellung abhängig.

Zudem ist die Atemwegshyperreagibilität beim humanem Asthma bronchiale heterogen und der pathogene Mechanismus kaum verstanden, sodass Untersuchungen an einem relativ einfachen Respirationssystem vermutlich eher Aufschluss über pathologische Zusammenhänge geben können [Gelfand EW 2002, Persson CG 2002, Hantos Z 2002, L. Prieto 2000].

Die hier verwendete Methode, die Bronchokonstriktion auf steigende Dosen des Acetylcholinagonisten Methacholin zu messen ist das allgemein verwendete Standardverfahren zur Bestimmung der AHR in Maus und Mensch [Kelly HW 2003, O'Byrne PM 2000, Glaab 2001].

6.1.2. Lungenfunktionsmessung der allergischen Frühreaktion

Eine Allergenprovokation beim Asthmatiker bewirkt eine unmittelbare Bronchokonstriktion, die 15 bis 30 min andauert. Diese Reaktion ist beim Menschen Mastzell- und IgE-abhängig und wird über Histamin vermittelt. Bei der sensibilisierten Maus kann eine ähnliche Reaktion nach Allergenprovokation ausgelöst werden, die allerdings weder von Mastzellen noch IgE wohl aber von einer B- und T-Zell-abhängigen Immunisierung und IgG1 anhängig ist und über 5-hydroxytryptamine (Serotonin) vermittelt wird. [Martin TR 1993, Crosby JR 2002, Barnes PJ 1998]. Der genaue Mechanismus der allergischen Frühreaktion bei der Maus ist ungeklärt. Die Beobachtung, dass basophile Granulozyten manche Asthmatiker nicht über IgE aber über IgG4 - analog zu IgG1 der Maus - mit einer Degranulation reagieren, lässt die Vermutung zu, dass basophile Granulozyten die Effektorzellen der allergischen Frühreaktion bei der Maus darstellen könnten [Jimeno L 1992].

Eine allergische Frühreaktion lässt sich über Änderungen der Lungenfunktion an Mäusen messen [Cieslewicz G 1999]. Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt ist die Ausprägung dieser Reaktion stark vom Behandlungsprotokoll abhängig. Oft sind mehrere vorangehende Allergenexpositionen nötig, um deutliche Reaktionen zu provozieren und intranasale Provokationen wirken oft effektiver als inhalative [Neuhaus-Steinmetz U 2000]. Das in der vorliegenden Arbeit primär verwendete Aspergillus Modell ist sehr einfach mit insgesamt nur 2 Allergenexpositionen nach einer einmaligen Sensibilisierung. Dennoch ließen sich bei einzelnen Mäusen eine deutliche Frühreaktion durch inhalative Allergenexposition mit einem

EF50-Abfall bis zu 60% und Resistance-Anstiegen bis zu 300% in den Messsystemen darstellen. Insgesamt waren diese Reaktionen innerhalb der Behandlungsgruppen starken Streuungen unterworfen und in vielen Tieren blieb eine Allergenprovokation ohne Wirkung auf die Lungenfunktion. In der Mehrzahl der Studien wurde daher auf die Messung der EAR verzichtet, um eine unnötige Belastung der Tiere zu vermeiden. Möglicherweise sind gerade die mechanistischen Unterschiede in der EAR der Maus im Vergleich zum Menschen für die Schwierigkeit in der Modellierung dieses Symptoms verantwortlich.

6.2. Mausmodelle für die Untersuchung des Asthma bronchiale

6.2.1. Allergene

Traditionell wird in Asthma-Modellen überwiegend das artifizielle Allergen Ovalbumin (OVA) eingesetzt. Die natürlichen Quellen der für Asthmatiker relevanten Aerosolallergene sind Pollen, Schimmelpilze, Hausstaubmilbe und Haustiere. Dabei wird die Sensibilisierung für Schimmelpilzallergene als Risikofaktor für die Ausbildung von schwerem Asthma angesehen [Zureik M 2002]. Natürliche Allergene als Extrakte z.B. aus dem Kot der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus* und Schimmelpilzen oder rekombinante Proteine wurden bisher nur vereinzelt in Asthma Modellen eingesetzt [Wilder JA 1999, Clarke AH 1999]. Pilzallergen als Extrakt von *Aspergillus fumigatus* wurde v.a. in Verbindung mit lebenden Konidien und OVA benutzt [Hogaboam CM 2000, Drouin SM 2002].

Aspergillus fumigatus ist ein ubiquitärer Pilz aus der Abteilung der Deuteromyzeten (= Fungi imperfecti) und daher eine bedeutende Quelle von Allergenen. 10% bis 20% aller Asthmatiker sind gegen *Aspergillus* sensibilisiert [Horner WE 1995, Martinez Ordaz VA 2002, Nolles G 2001].

Allergene in Form von heterogenen Substanzgemischen wie Extrakte aus Schimmelpilzen können relevant und effektiv in Modellen der allergischen Atemwegsentzündung und Hyperreagibilität eingesetzt werden. Auf Grund ihrer Heterogenität kann ihre Verwendung im Tiermodell aber auch zusätzliche immunologische Prozesse aktivieren. Dies macht das Modellsystem komplexer und weniger definiert, ist aber auf der anderen Seite der natürlichen Situation des Patienten, dessen Respirationstrakt ständig mit immunmodulatorischen Agenzien konfrontiert ist, nicht unähnlich.

Aspergillus Extrakt ist nicht nur ein starkes Allergen, sondern hat auch proinflammatorische Aktivität. Dies wird repräsentiert durch eine Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in das Lungenlumen und erhöhten IL-6 Konzentrationen in der BAL, die durch eine einmalige Exposition mit Aspergillus-Aerosol konzentrationsabhängig ausgelöst werden kann. Eine vorherige Sensibilisierung mit dem Allergen induziert jedoch einen anderen Phänotyp, der charakterisiert ist durch eine Atemwegseosinophilie und die Entwicklung einer Atemwegshyperreagibilität, die in unsensibilisierten Tieren gänzlich fehlt.

Um das immunologische Potential des Aspergillus Extraktes besser zu charakterisieren, wurde dieser in Kooperation mit der IMTM GmbH auf verschiedene Enzymaktivitäten untersucht. Unter anderem ist für das Aspergillus Allergen Asp f 13 eine Serinprotease-Aktivität beschrieben, das damit ein Komplementaktivierendes Potential besäße [Kurup VP 2002]. In dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Aspergillus Extrakt konnte jedoch keine Serinprotease-Aktivität nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wies der Extrakt aber eine signifikante DPPIV- und Endopeptidase-Aktivität auf. Die Endopeptidase-Aktivität wurde näher charakterisiert und wird nicht durch eine Serinprotease und auch nicht durch eine Cystein- oder Metalloprotease vermittelt. Vermutlich wird sie durch eine Aspartartprotease bestimmt, die ebenso wie die DPPIV als Exoenzyme für *Aspergillus fumigatus* beschrieben ist [Monod M 2002].

Für verschiedene andere Aspergillusallergene konnten modulierende Effekte auf die eosinophile Entzündung und Atemwegsreagibilität im Mausmodell nachgewiesen werden. Wobei die Allergene Asp f1, f3 und f4 einen verstärkenden Effekt auf die Entzündungsreaktion und Atemwegshyperreaktivität ausübten, während das Allergen Asp f6 diese verminderte [Kurup VP 2001].

Inwieweit die einzelnen Komponenten des Aspergillus Extraktes in der Ausbildung des asthmatischen Phänotyps eingreifen ist schwer abzuschätzen. Eine erhöhte DPPIV-Aktivität könnte beispielsweise die Funktion von Chemokinen in der Lunge limitieren und so antiinflammatorisch wirken [Mentlein R 1999, Proost P 1998]. Auf der anderen Seite ist bekannt, dass Chemokine wie RANTES zu Chemoattraktoren anderer Spezifität oder zu inaktiven Agonisten werden, wenn sie von der DPPIV gespalten werden, womit sie modulierenden Einfluss auf das Rekrutierungsmuster der Blutleukozyten nehmen könnten [Oravec T 1997, Struyf S 1998, Proost P 1998]. Darüber hinaus sind Effekte über die Regulation ihrer Hauptsubstrate Neuropeptid Y und Substanz P auf neuro-immunologische Wechselwirkungen der Lunge denkbar [Wang LH 1991, van der Velden VH 1999].

Das Potential aktiver Wirkkomponenten im Aspergillus Extrakt könnte die Unterschiede zwischen den in Kapitel 5.2.5. beschriebenen Kontrollgruppen auf die Aerosolexposition mit Aspergillus Extrakt im Vergleich zu Kochsalzlösung erklären.

Die Komplexität des Aspergillus Extraktes ist sicherlich zum Teil auch für die markanten Mausstamm spezifischen Unterschiede in der Ausprägung der allergischen Entzündung mitverantwortlich, die im Folgenden diskutiert werden.

6.2.2. Unterschiede zwischen den Maustämmen C57BL/6 und BALB/c in der Ausprägung der Atemwegseosinophilie im Aspergillus Modell

Abgesehen von einer unterschiedlichen Ausprägung der Allele, die die Fellfarbe kodieren (BALB/cJ A, b, c, D vs. C57BL/6J a, B, C, D) differenzieren sich die beiden Mausstämmen BALB/c und C57BL/6 auch in einer Reihe anderer Gene durch unterschiedliche Allelvarianten, wie z.B., der Geta-Glukoronidase (Gus), der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6pd-1), des Hämoglobin- β -Komplexes (Hbb) und der IL-4-Rezeptors- α -Kette (IL4ra) [taconic.com, Suzuki H 1991]. Obgleich Unterschiede in Allelen nicht direkt an funktionelle Konsequenzen gekoppelt sind, bedingen sie insgesamt charakteristische physiologische Merkmale der beiden Mausstämmen. So zeichnen sich C57BL/6 gegenüber BALB/c durch eine geringere Herzschlagvariabilität; einen um die Hälfte verringerten Anteil neutrophiler Granulozyten mit fast doppelt so vielen Retikulozyten im Blut und u.a. durch eine Empfindlichkeit gegenüber Infektionen mit *Bazillus anthracis* aus, während BALB/c-Mäuse resistent sind [aretha.jax.org]. Microarray Analysen in einem Bleomycin-induzierten Fibrose-Modell an resistenten BALB/c- gegenüber empfindlichen C57BL/6-Mäusen zeigen zudem extreme Unterschiede in der Aktivität bestimmter Gene [hopkins-genomics.org].

In Modellen allergischer Atemwegsentzündung zeigen BALB/c-Mäuse oft eine stärkere allergische Reaktion und Atemwegshyperreagibilität als C57BL/6-Mäuse. Dies wurde sowohl für OVA-induzierte allergische Reaktionen als auch in Modellen, die mit pulmonalen *Toxocaria canis* Infektionen oder mit Di-Isozyanat eine allergische Atemwegsentzündung induzieren, beschrieben. [Morokata T 1999, Hayashi T 2001, Herrick CA 2003].

In der vorliegenden Arbeit wurde eine sehr viel stärkere Reaktion von C57BL/6- gegenüber BALB/s-Mäusen im Aspergillus Modell festgestellt (Kapitel: 4.2.4.). In mehreren unabhängigen Experimenten zeigten C67BL/6-Mäuse eine starke Atemwegseosinophilie, mit 10 mal höheren Leukozytenzahlen in der BAL als im BALB/c-Stamm. Die starke eosinophile Entzündung war assoziiert mit hohen IL-5- und Eotaxin-2 Konzentrationen in der BAL. Demgegenüber entwickelten beide Mausstämmen trotz der starken Unterschiede in der Entzündung eine vergleichbare Atemwegshyperreagibilität.

Über welche Mechanismen diese Unterschiede in der Reaktion auf die Behandlung mit Aspergillus Extrakt zwischen den beiden Mausstämmen vermittelt werden, und in welcher Weise dabei die Komponenten des Aspergillus Extrakt und die Herterogenität des genetischen Hintergrundes miteinander gekoppelt sind, ist völlig unklar.

Vergleichende Untersuchungen an BALB/c- und C57BL/6 Mäusen deuten jedoch darauf hin, dass die Mechanismen, die der Ausbildung einer Atemwegseosinophilie und Atemwegshyperreagibilität zu Grunde liegen in diesen Mausstämmen unterschiedlich

gewichtet sind. So führt die Inhibition des Endothelin-A Rezeptors durch einen Antagonisten im OVA-Modell in beiden Mausstämmen zu einer Reduktion der Makrophagenzahl in der BAL. Die Einwanderung von eosinophilen Granulozyten wurde in diesem Experiment nur in BALB/c-Mäusen deutlich reduziert, während in C57BL/6-Mäusen die Eosinophilenzahl unverändert blieb und der unbehandelter BALB/c-Mäuse entsprach [Gosselin M 2002]. In einem anderen Experiment wurde gezeigt, dass die Blockade von CTLA-4 (CD152), ein Rezeptor der inhibierenden Einfluss auf die T-Zell-Aktivierung ausübt, den asthmatischen Phänotyp in BALB/c-Mäusen verstärkt und die Genexpression von TGF β in der Lunge vermindert, aber keinen Einfluss auf die Ausprägung von Atemwegsentzündung und Atemwegshypereagibilität in C57BL6-Mäusen hat [Hellings PW 2002]. Außerdem konnten Unterschiede in dem Einwanderungsverhalten der eosinophilen Granulozyten im Asthma-Modell gezeigt werden. In dieser Studie akkumulierten die eosinophilen Granulozyten in BALB/c-Mäuse im peribronchialen and peripheren Lungewebe, während sich in C57BL/6-Mäusen die eosinophilen Granulozyten diffus im Peribronchialraum verteilen [Takeda K 2001].

Auch der Zusammenhang zwischen eosinophiler Atemwegsentzündung und AHR in C57BL/6 und BALB/c scheint unterschiedlich ausgeprägt zu sein. So können OVA-sensibilisierte BALB/c-Mäuse bereits nach einmaliger Allergenprovokation eine Atemhyperreagibilität entwickeln, die unter gleichen Bedingungen in C57BL/6 nicht zu beobachten ist, obwohl diese eine höhere Anzahl eosinophiler Granulozyten in der BAL aufweisen und mehr spezifisches IgE produzieren [Wilder JA 1999]. Auch beim Vergleich anderer Maustämme und ebenso im Menschen ist die Atemwegseosinophilie nicht zwangsläufig an die Ausbildung einer AHR gekoppelt [Blyth DI 2001, Leckie MJ 2000]. Die Ausbildung einer AHR kann über verschiedene Mechanismen vermittelt werden, die je nach genetischem Hintergrund aber ebenso in Abhängigkeit vom Behandlungsprotokoll unterschiedlich stark ausgeprägt sein können. In akuten „Asthma“-Modellen kann eine AHR im Wesentlichen von zwei Effektorsystemen bestimmt werden, der eine ist anhängig von IL-5 und eosinophilen Granulozyten, der andere wird über Th2-Lymphozyten und IL-13 vermittelt [Leong KP 2001]. Diese Mechanismen sind aber keine isolierten Ereignisse sondern Teil eines dynamischen Systems, und die Beurteilung eines Zeitpunktes innerhalb dieser kinetischen Prozesse ist für Rückschlüsse auf die beteiligten Mechanismen schwierig. Im BALB/c-OVA-Modell ist eine AHR bereits 8h nach Allergenprovokation messbar und entwickelt ihr Maximum zwischen 24h und 48h, während es erst nach 48h zu einer signifikanten Einwanderung von eosinophilen Granulozyten in das Lungenlumen kommt, die zum 96h Zeitpunkt noch weiter ansteigt. Die Konzentrationen von IL-4 und IL-5 steigen in der BAL zum 24h Zeitpunkt deutlich an, während L-13 sowohl 24h als auch 48h nach Allergenprovokation erhöht ist [Tomkinson A 2001].

Auch in dem in dieser Arbeit verwendeten Aspergillus Modell zeigen BALB/c-Mäuse eine ähnliche Kinetik. Die Anzahl Eosinophiler Granulozyten sind bereits nach 24h in der BAL erhöht, steigt aber deutlich zum 48h Zeitpunkt weiter an. IL-13 ist ebenfalls 24h und 48h nach Allergenprovokation erhöht und IL-5 nur zum 24h Zeitpunkt messbar. C57BL/6-Mäuse zeigen eine ähnliche Zytokin-Kinetik, jedoch mit einem sehr viel stärkeren Anstieg von IL-5. Anders verhält es sich mit den eosinophilen Granulozyten. Bereits 24h nach Allergenprovokation kommt es zu einem sehr starken Einstrom von eosinophilen Granulozyten (70%), der zum 48h Zeitpunkt kaum weiter ansteigt (79%). In einem gesonderten Versuch waren bereits 6h nach Allergenprovokation 50% eosinophile Granulozyten in der BAL nachweisbar (Daten nicht gezeigt, N = 4, SEM = \pm 16%). Die sehr frühe Nachweisbarkeit einer hohen Anzahl eosinophile Granulozyten in BAL lässt darauf schließen, dass bereits nach der ersten Allergenprovokation an Tag 14 des Protokolls eine starke Atemwegsesionophilie induziert wird. Die zweite Exposition mit dem Aspergillus Extrakt an Tag 21 provoziert dann eine bereits inflammatorisch hoch aktivierte Lunge, die schnell mobilisierte eosinophile Granulozyten aus dem Blut rekrutieren kann.

Nach derzeitigem Wissenstand lassen sich schwer konkrete Erklärungsansätze für die extreme Reaktion von C57BL/6-Mäusen auf die Behandlung mit Aspergillus Extrakt postulieren. Eine mögliche Erklärung läge in der Gewichtung des Th1/Th2-Gleichgewichts in immunologischen Reaktionen von C57BL/6- im Vergleich zu BALB/c-Mäusen. C57BL/6 reagieren auf viele bakterielle und virale Infektionen mit einer hohen IFN γ Produktion, die z.T. über IL-12 reguliert wird [Liu T 2000, Huygen K 1983, Liu T 2000], und die Bleomycin-Empfindlichkeit ist durch eine gesteigerte IFN γ -abhängige Produktion von TGF- β gekennzeichnet [Kumar RK 1996]. Im Gegensatz dazu produzieren OVA-restimulierte Leukozyten der Milz von C57BL/6- deutliche weniger IL-4 und IL-5 als jene von BALB/c-Mäusen [Liu T 2000]. Bei C57BL/6 scheint sich das Th1/Th2-Gleichgewicht generell präferenziell in Richtung Th1 zu verschieben, oder anders ausgedrückt ist eine stärkere Th1-Reaktion nötig um die Th-2 Reaktion zu unterdrücken. Eine Störung in der Ausbildung dieser Th1-Dominanz - möglicherweise durch modulatorisch wirksame Proteasen im Aspergillus Extrakt - könnte eine unkontrollierte Th-2 Reaktion generieren, die sich im Aspergillus Modell durch eine sehr hohe IL-5-Produktion und eosinophile Reaktion äußert.

6.3. Kreuzreaktivität des hum C3a desarg und C5a desarg für murine Anaphylatoxine

Für die Quantifizierung der Anaphylatoxine bez. ihrer desarginierten Inaktivierungsprodukte in der Maus existieren derzeit keine kommerziell erhältlichen Testsysteme. Um die Verwendbarkeit eines Testsystems zum Nachweis der entsprechenden humanen Peptide für das Maussystem zu prüfen, wurde eine Kreuzreaktivität der Antikörper zu den murinen Anaphylatoxinen untersucht. In einigen murinen Proben konnten mit diesem Testsystem Anaphylatoxine nachgewiesen werden. Verdrängungsexperimente dieser Proben gegenüber den Anaphylatoxin-Standards ergaben ein kompetitives Verhalten, jedoch auf einem sehr niedrigen Konzentrationsniveau und in einem engem Verdünnungsbereich. In einer Reihe von anderen Tests ergaben sich keine positiven Signale in Maus-BAL, Maus-Serum oder Maus-Komplement-Extraktionen (BioTrend) mit oder ohne Aktivierung durch Zymosan oder Cobra-Venum-Faktor, im Gegensatz zu entsprechenden humanen Proben. Eine Kreuzreaktivität der Antikörper gegen humane Anaphylatoxine für die murinen Proteine ist daher nicht gegeben. Die vermeintlich positiven Signale in einigen murinen Proben könnten auf Bindungen zu den Hauptkomplementkomponenten C3 und C5, zu denen Affinitäten insbesondere zu C3 für das humane System vorliegen. C3 und C5 werden in einem vorherigen Fällungsschritt aus dem Probenmaterial isoliert, eine Restkontamination ist allerdings nicht auszuschließen, die sich bei verhältnismäßig geringen Konzentration der Anaphylatoxine auf das Messsystem auswirken können.

Um alternativ Aussagen über die Komplementaktivität in murinen Proben treffen zu können, wurde mit der Etablierung eines CH50-Assays begonnen, der auf der Basis einer komplementabhängigen Lyse von antikörpermarkierten Erythrozyten funktioniert. Die Komplementaktivität in der Maus ist im Vergleich zum Menschen allerdings relativ schwach ausgeprägt [Hitsumoto Y 1999]. Und eine Komplementaktivierung in der BAL ist auch in humanen Proben kaum messbar, sodass hierfür im Rahmen dieser Arbeit kein geeignetes System entwickelt werden konnte.

6.4. Immunhistochemischer Nachweis von C5aR in Kryoschnitten der Mauslunge

Zum Nachweis der Proteinexpression des C5a-Rezeptors in der Mauslunge wurden mit dem maus-spezifischen C5aR-Antikörper immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Bei der Etablierung der Färbung zeigten sich jedoch Probleme die Spezifität der Färbung nachzuweisen. Zum Teil zeigte der sekundäre Antikörper eine positive Färbung, und eine einsprechende Isotyp-Kontrolle ergab keine eindeutig zum C5aR-Antikörper zu diskriminierende Signale. Valide Aussagen zur Proteinexpression des C5aR in der Mauslunge können daher im Rahmen dieser Arbeit nicht getroffen werden.

6.5. Die Rolle der Anaphylatoxine in der Effektorphase der allergischen Atemwegsentzündung im Mausmodell

Die Bedeutung der Anaphylatoxine in allergischen Entzündungsprozessen ist wenig verstanden. Es ist bekannt, dass Anaphylatoxine eine der ersten immunmodulatorischen Mediatoren sind, die in Entzündungsprozessen freigesetzt werden und chemotaktische sowie aktivierende Wirkungen auf Effektorzellen ausüben können. Vor allem C5a spielt eine bedeutende Rolle bei inflammatorischen Erkrankungen wie Sepsis [Huber-Lang MS 2002, Ward PA 2003].

Experimente an C3- und C3a-Rezeptor defizienten Mäusen und Meerschweinchen weisen zudem auf eine Bedeutung der Anaphylatoxine in der Pathogenese von allergischen Atemwegserkrankungen wie das Asthma bronchiale [Bautsch W 2000, Humbles AA 2000, Drouin SM 2002 Drouin SM 200].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die funktionelle Blockade der Anaphylatoxin Rezeptoren C3aR und C5aR in der Effektorphase des experimentellen Asthma die eosinophile Atemwegsentzündung signifikant vermindert. Und dass darüber hinaus die Entwicklung der Atemwegshyperreagibilität in diesem Modell zum Teil über C5a vermittelt wird.

Die Gesamt-IgE-Konzentration im Serum ist unabhängig von der funktionellen Blockade der Anaphylatoxin Rezeptoren

Immunglobulin E ist eines der zentralen Effektormoleküle beim allergischen Asthma. Komplementfaktoren und Anaphylatoxine können die Effektorfunktionen von Mononukleären Zellen modulieren und es wird vermutet, dass sie Einfluss auf die Immunglobulinsynthese nehmen können [Carroll MC 1998]. In Tiermodellen des Asthma bronchiale mit C3aR-defizienten Mäusen sind widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf veränderte Serum-IgE-Konzentrationen beschrieben worden. Humbles et al berichtet von unbeeinflussten IgE-Konzentrationen in einem OVA-Modell mit C3aR-Knockout-Mäusen, die auf einem heterozygoten Hintergrund von BALB/c und 129/sv generiert wurden [Humbles AA 2000]. Hingegen beschreibt Drouin et al an C3aR-Knockout-Mäusen, die auf einen C57BL/6-Hintergrund zurückgekreuzt wurden eine Reduktion der Serum-IgE-Konzentration in einem OVA/Aspergillus Modell [Drouin SM 2002]. Beide Autoren beschreiben eine Verminderung der AHR in C3aR-Knockout-Mäusen. Diese widersprüchlichen Beobachtungen könnten ein Hinweis auf die Abhängigkeit des genetischen Hintergrundes der C3a-vermittelten Effekten

auf die IgE-Produktion sein, oder eine unterschiedliche Beeinflussungsmöglichkeit auf Grund des verschiedenen Behandlungsprotokolls reflektieren.

Die Experimente an C3aR-defizienten Mäusen sind schwerlich mit dem in dieser Arbeit verwendeten Protokoll zu vergleichen, da die Blockade oder das Fehlen einer C3aR-Funktion während der Sensibilisierungsphase andere Effekte auf die Immunglobulinsynthese haben kann, als eine C3aR-Inhibition während der Effektorphase. Monozyten und Dendritische Zellen exprimieren sowohl C3a- als auch C5a-Rezeptoren, deren Ligandenbindung die Sekretion von IL-10 und IL-12 induzieren kann und damit das Zytokinmilieu, das kritisch für die Entwicklung einer Th1- oder Th2-Immunantwort ist, beeinflussen [Kirchhoff K 2001, Karp CL 2000, Fischer WH 1997].

In einer kürzlich publizierten Arbeit von Taube et al, konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung der Komplement-Aktivierung während der Effektorphase durch eine Crry-Ig Verbindung die Gesamt-IgE-Konzentration im Serum von C57BL/6-Mäusen signifikant reduziert. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass möglicherweise andere Spaltprodukte der Komplementaktivierung wie C3d wirksam die Immunglobulin-Produktion verstärken können [Carroll MC 1998]. Andererseits hatte die Inhibierung der Komplementaktivierung durch die Verwendung eines löslichen C1-Rezeptors in dem in der vorliegenden Arbeit benutzten Aspergillus Modell keinen Einfluss auf die IgE-Konzentration im Serum, was wiederum für einen Modell-abhängigen Effekt sprechen würde.

Die simultane Blockade der Anaphylatoxinrezeptor-Funktion von C3aR und C5aR reduziert die IL-4-Konzentration in der BAL

IL-4 ist ein primär von Th2-Lymphozyten sezerniertes Zytokin, dass als Differenzierungsfaktor für B-Lymphozyten wirkt und neben IL-13 den Isotypen-Wechsel zu IgE in diesen Zellen induziert. IL-4 hat außerdem Eigenschaften als Wachstumsfaktor für Mastzellen und basophile Granulozyten.

In C3aR-Knockout-Mäusen und in Mäusen behandelt mit der Crry-Ig-Verbindung ist die IL-4-Konzentration in der BAL unter Bedingungen des experimentellen Asthma erniedrigt. Unklar ist, über welchen Zelltyp dieser Effekt vermittelt wird. Die Expression eines C3a-Rezeptors auf T-Lymphozyten wird derzeit kontrovers diskutiert. Es ist beschrieben, dass die Hauptquelle des IL-4 während der Effektorphase nicht T-Lymphozyten sind, sondern Mastzellen und basophile Granulozyten [Wills-Karp M 1999, Luccioli S 2002, Schroeder JT 2001]. Mastzellen und basophile Granulozyten exprimieren sowohl C3aR als auch C5aR. Obwohl mukosale Mastzellen im Gegensatz zu serosalen nicht auf kationische Mediatoren

wie Anaphylatoxine mit einer Degranulation reagieren, kann ihre Zytokinproduktion durch Anaphylatoxine moduliert werden [Erdei A 1999].

In dem hier verwendeten Aspergillus Modell ist die IL-4-Konzentration in der BAL generell recht niedrig und es sind keine Unterschiede zwischen der allergenbehandelten Positivkontrolle und der nicht-sensibilisierten Negativkontrolle 24h nach Allergenprovokation feststellbar. Da in der Negativ-Gruppe keine Lymphozyten zu detektieren sind, ist es wahrscheinlich, dass dieser IL-4-Spiegel in der BAL durch andere Zelltypen hervorgerufen wird. Die simultane Behandlung mit dem C3aR-Inhibitor und dem C5aR-Antikörper vermag die IL-4-Konzentration in der BAL signifikant zu reduzieren. Dies deutet darauf hin, dass Zellen die fähig sind IL-4 zu produzieren und auf C3a und C5a zu reagieren maßgeblich für die IL-4-Produktion in diesem Modell verantwortlich sind, wobei Mastzellen, basophile Granulozyten und ebenso Makrophagen als Produzenten in Frage kommen [Buttner C 1997, Barnes PJ 1986].

Die funktionelle Blockade von C3aR oder C5aR vermindern die Atemwegseosinophilie ohne Einfluss auf die IL-5-Konzentration in der BAL

IL-5 ist ein pleiotropes Zytokin. Seine Rolle beim allergischen Asthma wird bestimmt durch seine Wirkungen auf eosinophile Granulozyten. IL-5 ist beteiligt an der Proliferation, der Differenzierung, dem Überleben und der Aktivierung dieser Zellen in inflammatorischen Prozessen. Als zelluläre Quelle von IL-5 sind neben Th-2-Lymphozyten Mastzellen, basophile und eosinophile Granulozyten als auch Endothelzellen von Bedeutung [Salvi S 1999]. IL-5 verstärkt ebenso wie IL-3 die Freisetzung von ECP aus C3a- und C5a-aktivierten eosinophilen Granulozyten [Takafuji S 1996]. Darüber hinaus ist es ein Kostimulator der LTC₄-Freisetzung in C5a-aktivierten basophilen Granulozyten [Bischoff SC 1990]. Aus Grund des großen Spektrums an Zellen, die sowohl zur IL-5-Produktion befähigt sind als auch auf C3a und C5a reagieren können, ist es wahrscheinlich, dass Anaphylatoxine Einfluss auf die IL-5-Produktion in allergischen Entzündungsprozessen nehmen können, aber konkrete Daten liegen hierzu nicht vor.

Die Experimente an C3aR-Knockout-Mäusen und Crry-Ig-behandelten Mäusen zeigen, dass sowohl eine generelle Inhibition der Komplementaktivierung als auch das Ausschalten von C3aR-vermittelten Effekten die IL-5-Konzentration in der BAL im experimentellen Asthma reduzieren. Dieser Effekt könnte direkt durch die verminderte Anzahl von T-Lymphozyten und eosinophile Granulozyten, die in diesen Experimenten beobachtet wurden, vermittelt

sein. Ebenso könnte aber eine Anaphylatoxin-vermittelte Inhibierung der IL-5-Produktion Ursache für die Reduktion eosinophile Granulozyten in der BAL sein.

In dem hier verwendeten Aspergillus Modell ist die Konzentration von IL-5 in der BAL sensibilisierten und allergenexponierten Mäusen gegenüber unsensibilisierten Kontrolltieren erhöht. Die funktionelle Blockade des C3aR oder des C5aR sowie die Behandlung mit dem löslichen C1-Rezeptor zeigen jedoch keinen Effekt auf die erhöhte IL-5-Konzentration in der BAL.

Unabhängig von IL-5 führt die Behandlung mit dem C3aR-Inhibitor, dem C5aR-Antikörper oder beiden Substanzen in Kombination zu einer deutlichen Verminderung eosinophiler Granulozyten in der BAL um 50 bis 60%. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass Anaphylatoxine starken Einfluss auf die Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten in die Lunge haben, aber dieser Effekt nicht durch eine veränderte IL-5 Freisetzung vermittelt wird. Chemotaktische Wirkungen von C3a und C5a auf eosinophile Granulozyten sind beschrieben, aber ihr Einfluss auf die Transmigration über die Aktivierung von Endothel- und Epithelzellen können genauso oder vielleicht sogar noch wichtiger für die Einwanderung von eosinophilen Granulozyten in die Lunge sein [Daffern PJ 1995]. Studien am Kaninchen Mesenterium konnten zeigen, dass C3a ein spezifischer chemotaktischer Mediator ist, der selektiv die Adhäsion, aber nicht die Transmigration in vivo vermitteln kann. Im Gegensatz dazu aktiviert C5a sowohl alle Integrin-abhängigen Adhäsions- als auch Transmigrationsprozesse von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten [DiScipio RG 1999].

Die funktionelle Blockade von C3aR oder C5aR vermindern die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in das Lungenlumen

Neben den eosinophilen Granulozyten sind neutrophile Granulozyten wichtige Effektorzellen beim Asthma bronchiale. Neutrophile Granulozyten sind Effektorzellen des Immunsystems, die schnell aus dem marginalen Pool rekrutiert werden können und früh in Entzündungsprozessen involviert sind. Ihre Rolle in der Pathophysiologie des Asthma bronchiale ist wenig verstanden. Insbesondere schwere Fälle des chronischen Asthma sind durch einen vermehrten Einstrom neutrophiler Granulozyten gekennzeichnet und insbesondere bei asthmatischen Kindern findet man häufig vermehrt diesen Zelltyp in der Lunge [Ennis M 2003].

C5a ist ein gut charakterisierter Mediator und Aktivator von neutrophilen Granulozyten [Murakami Y 1993].

Im Gegensatz zu C5a hat C3a wenig direkte Wirkungen auf neutrophile Granulozyten. Es ist weder chemotaktisch, noch vermittelt es die Transmigration von neutrophile Granulozyten. C3a kann jedoch die Produktion von Sauerstoffradikalen in neutrophile Granulozyten stimulieren und die Synthese von IL-8 in Endothelzellen und Makrophagen, was auf indirektem Wege die neutrophile Entzündung fördert [Daffern PJ 1995, Elsner J 1994, Monsinjon T 2003].

In C3aR-Knockout-Mäusen wurde eine Verminderung der Anzahl neutrophile Granulozyten im OVA/Aspergillus Modell beobachtet.

In dem in dieser Arbeit verwendeten Aspergillus Modell führt die Provokation mit Aspergillus Extrakt sowohl in sensibilisierten als auch in nicht-sensibilisierten Mäusen zu einer Einwanderung von neutrophile Granulozyten in das Lungenlumen.

Die funktionelle Blockade der Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR als auch die Inhibierung der Komplementaktivierung durch den löslichen C1-Rezeptor reduzierten die Anzahl neutrophiler Granulozyten in der BAL. Da die simultane Behandlung mit dem C3aR-Inhibitor zusammen mit dem C5aR-Antikörper einen stärkeren Effekt zeigt als die einzelnen Applikationen, wirken C3a- und C5a- vermittelte Effekte vermutlich über unterschiedliche Mechanismen auf die Rekrutierung von neutrophile Granulozyten.

Die funktionelle Blockade von C5aR in der Effektorphase reduziert die Anzahl von T-Lymphozyten in der BAL und die Atemwegshyperreagibilität auf Methacholine

Die Ausbildung des allergischen Asthma wird primär über die Effektorfunktionen von Th2-Lymphozyten vermittelt. Wie bereits erwähnt, wurde die Expression von C3aR und C5aR auf T-Lymphozyten beschrieben. Für C3aR ist die Datenlage allerdings inkonsistent, und eine Bedeutung des Rezeptors für die T-Zell-Funktionen ist bisher nicht gezeigt.

Für eine Bedeutung des C5aR in allergischen Reaktion existieren weitaus klarere Hinweise, obwohl seine Relevanz im Maussystem angezweifelt wird [Nataf S 1999, Tsuji RF 2000, Soruri A 2003].

In Modellen des experimentellen Asthma zeigen C3aR-Knock-out-Mäuse und Wildtypmäuse, die mit Crry-Ig behandelt wurden eine Verminderung der Anzahl von T-Lymphozyten in der BAL. Darüber hinaus zeichnen sich Isolierte BAL-T-Lymphozyten dieser Mäuse durch eine verringerte Fähigkeit aus, ex-vivo Th-2-Zytokine zu produzieren.

In dem in dieser Arbeit verwendeten Aspergillus Modell hatte die Inhibierung des C3aR ebenso wie die Behandlung mit dem löslichen C1-Rezeptor keinen Einfluss auf die Einwanderung von Lymphozyten in das Lungenlumen. Die funktionelle Blockade des C5aR alleine oder zusammen mit der des C3aR konnte allerdings die Anzahl der Lymphozyten in der BAL signifikant reduzieren. Th-2-Lymphozyten können entscheidend für die Ausbildung

einer Atemwegshyperreagibilität sein, dies konnte durch Transfereperimente von ex-vivo generierten und allergen-stimulierten T-Lymphozyten in nicht-sensibilisierte Mäuse anschaulich demonstriert werden [Cohn L 1998]. Einer der Hauptmediatoren der T-Zellen der eine Atemwegshyperreagibilität induzieren kann ist IL-13 [Wills-Karp M 2003]. Für IL-13 konnten in dieser Studie keine Unterschiede zwischen Allergen behandelten sensibilisierten und nicht-sensibilisierten Tieren in der BAL festgestellt werden.

Auch die Behandlungen mit dem C3aR-Inhibitor oder C5a-Antikörper zeigen keinen Effekt auf die IL-13-Konzentration in der BAL, trotz der signifikanten Reduktion der T-Lymphozyten-Anzahl durch die Behandlung mit dem C5aR-Antikörper alleine oder in Kombination mit dem C3aR-Inhibitor. Hingegen führt die Inhibition der Komplementaktivierung über den löslichen C1-Rezeptor zu einem leichten aber signifikanten Anstieg von IL-13 in der BAL. Die Messung der Zytokine in der BAL vermag die konkreten Verhältnisse im Lungenparenchym nicht genau reflektieren und der gewählte Observationszeitpunkt könnte die Detektierbarkeit von Unterschieden erschweren.

Ungeachtet, ist die Behandlung mit dem C5aR-Antikörper in der Lage die Atemwegshyperreagibilität signifikant zu reduzieren. Im Gegensatz dazu zeigen die Behandlungen mit dem C3aR-Inhibitor keine Wirkung auf die Atemwegsreagibilität. Die Verminderung der AHR durch die C5aR-Blockade steht im Einklang mit der assoziierten Reduktion der T-Lymphozyten-Zahl im Lungenlumen; steht jedoch im Gegensatz zu den Beobachtungen an C3aR- Knockout-Mäusen. C3aR-defiziente Mäuse sowohl auf C57BL6- als auch auf BALB/c-129/sw-Hintergrund zeigen eine verbesserte Lungenfunktion im OVA/Aspergillus- bzw. OVA-Modell im Vergleich zu C3aR-kompetenten Kontrolltieren [Drouin SM 2002, Humbles AA 2000]. Interessanterweise ist dieser Effekt im OVA -BALB/c-129/sw-Modell unabhängig von einer Wirkung auf die Atemwegseosinophilie. In dem in dieser Studie verwendeten Modell ist die eosinophile Entzündung gleichermaßen durch die funktionelle Blockade des C3aR bzw. C5aR vermindert und scheint keinen direkten Einfluss auf die Ausbildung einer AHR haben, da die Behandlung mit dem C3aR-Inhibitor im Gegensatz zum C5aR-Antikörper keinen Effekt auf die AHR hat. Der Gegensatz in Bezug auf die C3a-vermittelten Wirkungen auf die AHR in C3aR-defizienten Mäuse im Vergleich zur gezielten Inhibition des Rezeptors während der Effektorphase könnten im weiteren Ausdruck für die unterschiedliche Rolle von C3a in der Sensibilisierungs- gegenüber der Effektorphase sein. In den Experimenten der Behandlung mit der Cry-Ig-Verbindung von Taube et al führt die Inhibierung der Komplementaktivierung während der Effektorphase zu einer Reduktion der AHR, der Atemwegseosinophilie als auch der T-Lymphozyten-zahl und Effektorfunktion [Taube C 2003]. C3a- und C5a-vermittelte Effekte sind in diesem Modell nicht zu trennen. Im Vergleich mit der dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modell, zeigt die Behandlung durch den löslichen C1-Rezeptor sehr viel geringere Effekte. Sie unterdrückt die

Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und vermindert die IL-6-Konzentration in der BAL, zeigt aber keine Wirkungen auf die Einwanderung von eosinophilen Granulozyten oder die AHR. Crry ist ein sehr effektiver Regulator der Komplementaktivierung bei der Maus der als DAC-Faktor (decay-accelerator = Zerfallsbeschleuniger) und Kofaktor- für die Faktor I-abhängige Spaltung von C3b und C4b) wirkt.

Die sehr viel ausgeprägteren Wirkungen der Crry-Ig-Behandlung könnten auf die spezifischere Inhibierung der Komplementaktivierung zustande kommen, oder durch das intensivere Behandlungsprotokoll bedingt sein.

Für die Rolle von C5a in allergischen Entzündungsreaktionen existieren weit weniger Daten als für C3a. Eine Bedeutung für C5a in der Ausbildung der allergischen Atemwegsentzündung wurde in Experimenten an Ratten in einem OVA-Modell untersucht. OVA-sensibilisierte Ratten entwickeln in diesem Modell nach mehreren Allergenprovokation eine Atemwegseosinophilie und allergische Spätphasen-Reaktion, die durch die Behandlung mit einem C5aR-Antagonisten inhibiert werden konnte [Abe M 2001].

Die Anaphylatoxin-vermittelten Effekte auf die allergische Entzündung und speziell die C5a-vermittelten Effekte auf T-Lymphozyten können die Wirkungen auf die verbesserte Lungenfunktion erklären. C3a- und C5a-vermittelte Effekte könnten zusätzlich über residente Effektorzellen wie glatte Muskelzellen und Nervenzellen Einfluss auf die lungenphysiologischen Reaktionen haben [Nataf S 1999 Drouin SM 2001].

Die C5aR Genexpression ist in allergenbehandelten Mäusen reduziert und wird durch C5aR-Blockade weiter herunterreguliert

Der C3a-Rezeptor wird in vielen Geweben in myeloiden wie nicht-myeloiden Zellen exprimiert, mit der Einschränkung der strittigen Expression in T-Lymphozyten insbesondere im Maussystem [Tornetta MA 1997]. Über die Regulation der C3aR –Genexpression ist nicht viel bekannt. In dem in dieser Arbeit verwendeten Modell ist die C3aR-Genexpression in der Lunge, gemessen in Lungenlysaten relativ gering im Vergleich zum Housekeeping-Gen. Eine Regulation der Rezeptorgenexpression konnte zum Observierungszeitpunkt 24h nach Allergenprovokation nicht festgestellt werden. In allen Behandlungsgruppen sowie in den Kontrollen ist die mRNA-Expression des C3aR auf gleichem Niveau.

In Experimenten von Drouin et al konnten ebenfalls keine Unterschiede in der Expression von C3aR sowie C5aR in bronchialen und alveolären Epithelzellen 24h nach der letzten OVA-Provokation nachgewiesen werden. Allerdings fanden sie eine Hochregulation des C3aR auf bronchialen glatten Muskelzellen, sowohl immunhistochemisch als auch über In-Situ-Hybridisierung [Drouin SM 2001].

Im Gegensatz dazu konnte in dem in dieser Arbeit verwendeten Modell durch Light-Cycler-Analysen eine relativ hohe Genexpression des C5aR nachgewiesen werden, die ungefähr 20 mal höher im Vergleich zum C3aR ist. Darüber hinaus zeigen allergenbehandelte sensibilisierte Mäuse gegenüber unsensibilisierten Mäusen eine Herunterregulierung des C5aR 24h nach Allergenprovokation. Die funktionelle Blockade des C5aR und die simultane Blockade beider Rezeptoren sowie die Inhibierung der Komplementaktivierung über sC1R verstärkten diese Herunterregulierung, während die C3aR-Inhibierung keinen Effekt zeigte.

In akuten inflammatorischen Prozessen wie in LPS- oder CLP-Modellen konnte eine Hochregulierung der Anaphylatoxinrezeptoren gezeigt werden [Ward PA 2003]. In Vitro-Untersuchungen an verschiedenen Zelltypen konnten eine Hochregulierung des C5aR durch LPS, TNF, IL-6, IFN γ und C5a selber induziert werden [Riedemann NC 2002, Laudes IJ 2002, Burg M 1995]. Basierend auf diesen in vitro-Daten könnte in Bezug auf das hier verwendete Aspergillus Modell die erniedrigte Konzentration von IFN γ in der BAL der Allergen behandelten Tiere in direktem Zusammenhang mit der Herunterregulierung des C5aR stehen. Zusätzlich deuten die erniedrigten IL-6-Konzentrationen in der BAL der Tiere, die mit dem C5aR-Antikörper alleine oder in Kombination mit dem C3aR-Inhibitor behandelt wurden, als auch in der Behandlungsgruppe des C1R auf eine Beteiligung dieses Zytokines in der Regulation des C5aR. Beschrieben ist, dass C5a die IL-6-Produktion in Monozyten/Makrophagen beeinflusst und vermutlich auch auf die IL-6 Produktion in Lungenepithelzellen wirken kann [O'Barr S 2000, Fukuoka Y 2003].

Der Mechanismus der Hochregulierung des C5aR über IL-6, die im Gegenzug eine C5a-vermittelte Stimulierung der IL-6-Produktion positiv beeinflusst, könnte einen positiven Feedback-Mechanismus darstellen. Über die Regulation des C5aR auf T-Lymphozyten würde dieser Mechanismus den Effekt der C5aR-Blockierung auf die T-Zell-Rekrutierung unterstützen [Fukuoka Y 2003, Pobanz JM 2000, O'Barr S 2000].

7. Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte eine wichtige Rolle der Anaphylatoxine in der Rekrutierung von Effektorzellen im Modell der allergischen Atemwegsentzündung gezeigt werden. Darüber hinaus konnte ein Einfluss von C5a auf die Ausbildung der Atemwegshyperreagibilität in diesem Modell nachgewiesen werden.

Die Wirkungen von Komplementfaktoren und der Anaphylatoxine C3a und C5a in der Pathogenese von entzündlich allergischen Erkrankungen wie dem Asthma bronchiale können vielfältig sein. Ein deutlicher Einfluss auf die Entzündungsprozesse konnte hier gezeigt werden. Zusätzlich können die beschriebenen Wirkungen der Anaphylatoxine auf eine Reihe von Zelltypen wie glatte Muskelzellen, Neurone und Dendritischen Zellen in komplexer Weise an der Effektor- sowie der Sensibilisierungsphase beteiligt sein.

Um die Rolle der unterschiedlichen Wirkungen der Anaphylatoxine im Zusammenspiel mit Entzündungsprozessen verstehen zu können, sind weitere Arbeiten nötig. Dennoch zeigen die bisherigen Daten, dass die Anaphylatoxine einen viel versprechenden Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien nicht nur bei Erkrankungen wie Sepsis, sondern auch für das Asthma bronchiale darstellen.

8. Ausblick

Im Fraunhofer Institut für Toxikologie und experimentelle Medizin konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Tiermodell entwickelt werden, dass durch pharmakologische Beeinflussung anaphylatoxin-vermittelte Wirkungen im experimentellen Asthma beschreibt.

Die Charakterisierung der funktionellen Bedeutung der Anaphylatoxine in bestimmten Stufen und Kompartimenten, die in der Pathogenese des Asthma bronchiale beteiligt sind, wird den Forschungsschwerpunkt meiner zukünftigen wissenschaftlichen Arbeit darstellen.

Diese Arbeiten sollen im Cincinnati Childrens Hospital Ohio unter der Leitung von Professor Jörg Köhl durchgeführt werden, der seit einigen Jahren intensiv auf dem Forschungsgebiet Asthma und Anaphylatoxine tätig ist.

9. Literaturverzeichnis

- Aalberse RC, van der Gaag R, van Leeuwen J. Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response. Serologic aspects of IgG4 antibodies. *J Immunol.* 1983 Feb;130(2):722-6. PMID: 6600252
- Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature.* 1996 Oct 31;383(6603):787-93. PMID: 8893001
- Abe M, Shibata K, Akatsu H, Shimizu N, Sakata N, Katsuragi T, Okada H. Contribution of anaphylatoxin C5a to late airway responses after repeated exposure of antigen to allergic rats. *J Immunol.* 2001 Oct 15;167(8):4651-60. PMID: 11591795
- Abraham WM, Ahmed A, Sielczak MW, Narita M, Arrhenius T, Elices MJ. 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 Sep;156(3 Pt 1):696-703. PMID: 9309981
- Allergy and Asthma Associates, Houston, Texas, USA. Theophylline revisited. *Allergy Asthma Proc.* 2001 Nov-Dec;22(6):347-51. PMID: 11775391
- Ames RS, Lee D, Foley JJ, Jurewicz AJ, Tornetta MA, Bautsch W, Settmacher B, Klos A, Erhard KF, Cousins RD, Sulpizio AC, Hieble JP, McCafferty G, Ward KW, Adams JL, Bondinell WE, Underwood DC, Osborn RR, Badger AM, Sarau HM. Identification of a selective nonpeptide antagonist of the anaphylatoxin C3a receptor that demonstrates antiinflammatory activity in animal models. *J Immunol.* 2001 May 15;166(10):6341-8. PMID: 11342658
- aretha.jax.org. <http://aretha.jax.org/pub-cgi/phenome>
- Bai TR. Abnormalities in airway smooth muscle in fatal asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1990 Mar;141(3):552-7. PMID: 2310090
- Bandeira-Melo C, Sugiyama K, Woods LJ, Weller PF. Cutting edge: eotaxin elicits rapid vesicular transport-mediated release of preformed IL-4 from human eosinophils. *J Immunol.* 2001 Apr 15;166(8):4813-7. PMID: 11290754
- Barnes PJ, Adcock IM. How do corticosteroids work in asthma? *Ann Intern Med.* 2003 Sep 2;139(5 Pt 1):359-70. PMID: 12965945
- Barnes PJ, Chung KF, Page CP. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol Rev.* 1998 Dec;50(4):515-96. PMID: 9860804
- Barnes PJ. Neural mechanisms in asthma. *Br Med Bull.* 1992 Jan;48(1):149-68. PMID: 1352167
- Barnes PJ. Neural mechanisms in asthma: new developments. *Pediatr Pulmonol Suppl.* 1997;16:82-3. PMID: 9443216
- Barnes PJ. New concepts in the pathogenesis of bronchial hyperresponsiveness. *Agents Actions Suppl.* 1987;21:225-37. PMID: 3314413
- Barnes PJ. Non-adrenergic non-cholinergic neural control of human airways. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1986 Apr;280(2 Suppl):208-28. PMID: 2425761

- Bartholomew WR, Shanahan TC. Complement components and receptors: deficiencies and disease associations. *Immunol Ser.* 1990;52:33-51.
- Bautsch W, Hoymann HG, Zhang Q, Meier-Wiedenbach I, Raschke U, Ames RS, Sohns B, Flemme N, Meyer zu Vilsendorf A, Grove M, Klos A, Kohl J. Cutting edge: guinea pigs with a natural C3a-receptor defect exhibit decreased bronchoconstriction in allergic airway disease: evidence for an involvement of the C3a anaphylatoxin in the pathogenesis of asthma. *J Immunol.* 2000 Nov 15;165(10):5401-5. PMID: 11067890
- Befus D. The role of the mast cell in allergic bronchospasm. *Can J Physiol Pharmacol.* 1987 Mar;65(3):435-41. PMID: 3555749
- Belmont HM, Hopkins P, Edelson HS, Kaplan HB, Ludewig R, Weissmann G, Abramson S. Complement activation during systemic lupus erythematosus. C3a and C5a anaphylatoxins circulate during exacerbations of disease. *Arthritis Rheum.* 1986 Sep;29(9):1085-9. PMID: 3489467
- Benson MK. Bronchial hyperreactivity. *Br J Dis Chest.* 1975 Oct;69(0):227-39. PMID: 1106744
- Bischoff SC, Brunner T, De Weck AL, Dahinden CA. Interleukin 5 modifies histamine release and leukotriene generation by human basophils in response to diverse agonists. *J Exp Med.* 1990 Dec 1;172(6):1577-82. PMID: 1701820
- Bischoff SC, de Weck AL, Dahinden CA. Interleukin 3 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor render human basophils responsive to low concentrations of complement component C3a. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Sep;87(17):6813-7. PMID: 1697689
- Blyth DI. The homeostatic role of bronchoconstriction. *Respiration.* 2001;68(2):217-23. PMID: 11287841
- Bordet, J., and Gengou, O. Sur l'existence de substances sensibilisatrices dans la plupart des sérums antimicrobiens. 1901 *Ann. Inst. Past.* 15, 290-302
- Boulet LP. Physiopathology of airway hyperresponsiveness. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2003 Mar;3(2):166-71. PMID: 12562557
- Braun A, Nockher WA, Renz H. Control of nerve growth and plasticity. *Curr Opin Pharmacol.* 2002 Jun;2(3):229-34. PMID: 12020462
- Broide DH. Molecular and cellular mechanisms of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Aug;108(2 Suppl):S65-71. PMID: 11498675
- Burg M, Martin U, Rheinheimer C, Kohl J, Bautsch W, Bottger EC, Klos A. IFN-gamma up-regulates the human C5a receptor (CD88) in myeloblastic U937 cells and related cell lines. *J Immunol.* 1995 Nov 1;155(9):4419-26. PMID: 7594603
- Buttner C, Skupin A, Reimann T, Rieber EP, Unteregger G, Geyer P, Frank KH. Local production of interleukin-4 during radiation-induced pneumonitis and pulmonary fibrosis in rats: macrophages as a prominent source of interleukin-4. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997 Sep;17(3):315-25. PMID: 9308918
- Cain SA, Monk PN. The orphan receptor C5L2 has high affinity binding sites for complement fragments C5a and C5a des-Arg(74). *J Biol Chem.* 2002 Mar 1;277(9):7165-9. Epub 2001 Dec 31. PMID: 11773063

- Carroll MC. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:545-68. PMID: 9597141
- Castro FF, Schmitz-Schumann M, Rother U, Kirschfink M. Complement activation by house dust: reduced reactivity of serum complement in patients with bronchial asthma. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1991;96(4):305-10. PMID: 1809688
- Chakraborti T, Mandal A, Mandal M, Das S, Chakraborti S. Complement activation in heart diseases. Role of oxidants. *ischemia Cell Signal.* 2000 Oct;12(9-10):607 -17. PMID: 11080612
- Chen G, Zhou D, Kang BC. A comparative study on cockroach and ovalbumin sensitizations and challenge responses in Hartley guinea- pigs. *Respir Physiol.* 2001 Apr;125(3):239-47. PMID: 11282390
- Chen H, Paul WE. Cultured NK1.1+ CD4+ T cells produce large amounts of IL-4 and IFN-gamma upon activation by anti-CD3 or CD1 J *Immunol.* 1997 Sep 1;159(5):2240-9. PMID: 9278312
- Chronic myelogenous leukemia-derived basophilic granulocytes express a functional active receptor for the anaphylatoxin C3a. *Eur J Immunol.* 1993 Feb;23(2):558-61. PMID: 7679650
- Cieslewicz G, Tomkinson A, Adler A, Duez C, Schwarze J, Takeda K, Larson KA, Lee JJ, Irvin CG, Gelfand EW. The late, but not early, asthmatic response is dependent on IL-5 and correlates with eosinophil infiltration. *J Clin Invest.* 1999 Aug;104(3):301-8. PMID: 10430611
- Clarke AH, Thomas WR, Rolland JM, Dow C, O'Brien RM. Murine allergic respiratory responses to the major house dust mite allergen Der p 1. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999 Oct;120(2):126-34. PMID: 10545766
- Clemenza L, Isenman DE. Structure-guided identification of C3d residues essential for its binding to complement receptor 2 (CD21). *J Immunol.* 2000 Oct 1;165(7):3839-48. PMID: 11034390
- Clutterbuck EJ, Hirst EM, Sanderson CJ. Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6, and GM-CSF. *Blood.* 1989 May 1;73(6):1504-12. PMID: 2653458
- Cockcroft DW, Marciniuk DD, Hurst TS, Cotton DJ, Laframboise KF, McNab BD, Skomro RP. Methacholine challenge: test-shortening procedures. *Chest.* 2001 Dec;120(6):1763-5. *chest.* 2001 Dec;120(6):1857-60. PMID: 11742913
- Cockcroft DW. Airway hyperresponsiveness in asthma. *Hosp Pract (Off Ed).* 1990 Jan 15;25(1):111-8, 121, 125-9. PMID: 2104859
- Cockcroft DW. Airway responses to inhaled allergens. *Can Respir J.* 1998 Jul-Aug;5 Suppl A:14A-7A. PMID: 9753510
- Cockcroft DW. Bronchial inhalation tests. I. Measurement of nonallergic bronchial responsiveness. *Ann Allergy.* 1985 Oct;55(4):527-34 PMID: 3901829
- Cohn L, Tepper JS, Bottomly K. IL-4-independent induction of airway hyperresponsiveness by Th2, but not Th1, cells. *J Immunol.* 1998 Oct 15;161(8):3813-6. PMID: 9780144
- Corless JA, Paracha M. The use of leukotriene modifying drugs in asthma and other respiratory diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2002 Sep;1(3):271-5. PMID: 14561192

- Corry DB, Grunig G, Hadeiba H, Kurup VP, Warnock ML, Sheppard D, Rennick DM, Locksley RM. Requirements for allergen-induced airway hyperreactivity in T and B cell-deficient mice. *Mol Med.* 1998 May;4(5):344-55. PMID: 9642684
- Coulson FR, Fryer AD. Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. *Pharmacol Ther.* 2003 Apr;98(1):59-69. PMID: 12667888
- Crosby JR, Cieslewicz G, Borchers M, Hines E, Carrigan P, Lee JJ, Lee NA. Early phase bronchoconstriction in the mouse requires allergen-specific IgG. *J Immunol.* 2002 Apr 15;168(8):4050-4. PMID: 11937563
- Cunningham AF, Fallon PG, Khan M, Vacheron S, Acha-Orbea H, MacLennan IC, McKenzie AN, Toellner KM. Th2 activities induced during virgin T cell priming in the absence of IL-4, IL-13, and B cells. *J Immunol.* 2002 Sep 15;169(6):2900-6. PMID: 12218103
- Cuvelier SL, Patel KD. Shear-dependent eosinophil transmigration on interleukin 4-stimulated endothelial cells: a role for endothelium-associated eotaxin-3. *J Exp Med.* 2001 Dec 17;194(12):1699-709. PMID: 11748272
- Dabbagh K, Takeyama K, Lee HM, Ueki IF, Lausier JA, Nadel JA. IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo. *J Immunol.* 1999 May 15;162(10):6233-7. PMID: 10229869
- Daffern PJ, Pfeifer PH, Ember JA, Hugli TE. C3a is a chemotaxin for human eosinophils but not for neutrophils. I. C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation. *J Exp Med.* 1995 Jun 1;181(6):2119-27 PMID: 7760001
- de Jongste JC, Jongejan RC, Kerrebijn KF. Control of airway caliber by autonomic nerves in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis.* 1991 Jun;143(6):1421-6. PMID: 2048831
- De Smedt T, Van Mechelen M, De Becker G, Urbain J, Leo O, Moser M. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol.* 1997 May;27(5):1229-35. PMID: 9174615
- DiScipio RG, Daffern PJ, Jagels MA, Broide DH, Sriramarao P. A comparison of C3a and C5a-mediated stable adhesion of rolling eosinophils in postcapillary venules and transendothelial migration in vitro and in vivo. *J Immunol.* 1999 Jan 15;162(2):1127-36. PMID: 9916743
- Doucet C, Brouty-Boye D, Pottin-Clemenceau C, Canonica GW, Jasmin C, Azzarone B. Interleukin (IL) 4 and IL-13 act on human lung fibroblasts. Implication in asthma. *J Clin Invest.* 1998 May 15;101(10):2129-39. PMID: 9593769
- Drouin SM, Corry DB, Hollman TJ, Kildsgaard J, Wetsel RA. Absence of the complement anaphylatoxin C3a receptor suppresses Th2 effector functions in a murine model of pulmonary allergy. *J Immunol.* 2002 Nov 15;169(10):5926-33. PMID: 12421977
- Drouin SM, Kildsgaard J, Haviland J, Zabner J, Jia HP, McCray PB Jr, Tack BF, Wetsel RA. Expression of the complement anaphylatoxin C3a and C5a receptors on bronchial epithelial and smooth muscle cells in models of sepsis and asthma. *J Immunol.* 2001 Feb 1;166(3):2025-32 PMID: 11160252

- Dulkys Y, Schramm G, Kimmig D, Knoss S, Weyergraf A, Kapp A, Elsner J. Detection of mRNA for eotaxin-2 and eotaxin-3 in human dermal fibroblasts and their distinct activation profile on human eosinophils. *J Invest Dermatol.* 2001 Apr;116(4):498-505. PMID: 11286614
- Dvorak AM, Morgan ES, Tzizik DM, Weller PF. Prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase): ultrastructural localization to nonmembrane-bound cytoplasmic lipid bodies in human eosinophils and 3T3 fibroblasts. *Int Arch Allergy Immunol.* 1994 Nov;105(3):245-50. PMID: 7920026
- Egesten A, Alumets J, von Mecklenburg C, Palmegren M, Olsson I. Localization of eosinophil cationic protein, major basic protein, and eosinophil peroxidase in human eosinophils by immunoelectron microscopic technique. *J Histochem Cytochem.* 1986 Nov;34(11):1399-403. PMID: 3772075
- Eglite S, Pluss K, Dahinden CA. Requirements for C5a receptor-mediated IL-4 and IL-13 production and leukotriene C4 generation in human basophils. *J Immunol.* 2000 Aug 15;165(4):2183-9. PMID: 10925305
- Ehrlich, P. (1879): Über die spezifischen Granulationen des Blutes. *Arch. Anat. Physiol. Lpz 3 Physiol. Abstr.* 571 in: Wardlaw, A.J., R. Moqbel u. A.B. Kay (1995): Eosinophils: Biology and role in disease. *Adv. Immunol.* 60, 151-266
- Elsner J, Kapp A. The chemokine network in eosinophil activation. *Allergy Asthma Proc.* 2001 May-Jun;22(3):139-48. PMID: 11424874
- Elsner J, Oppermann M, Czech W, Dobos G, Schopf E, Norgauer J, Kapp A. C3a activates reactive oxygen radical species production and intracellular calcium transients in human eosinophils. *Eur J Immunol.* 1994 Mar;24(3):518-22. PMID: 8125125
- Elsner J, Oppermann M, Czech W, Kapp A. C3a activates the respiratory burst in human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes via pertussis toxin-sensitive G-proteins. 1994 Jun 1;83(11):3324-31. PMID: 8193368
- Ember, J.A., Jagels, M.A., Hugli, T.E., 1998. Characterization of complement anaphylatoxins and their biological responses. In: Volanakis, J.E., Frank, M.M. (Eds.), *The Human Complement System in Health and Disease.* Marcel Dekker, New York, pp. 41–284.
- Emson CL, Bell SE, Jones A, Wisden W, McKenzie AN. Interleukin (IL)-4-independent induction of immunoglobulin (Ig)E, and perturbation of T cell development in transgenic mice expressing IL-13. *J Exp Med.* 1998 Jul 20;188(2):399-404. PMID: 9670052
- Ennis M. Neutrophils in asthma pathophysiology. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2003 Mar;3(2):159-65. PMID: 12562556
- Erdei A, Toth GK, Andrasfalvy M, Matko J, Bene L, Bajtay Z, Ischenko A, Rong X, Pecht I. Inhibition of IgE-mediated triggering of mast cells by complement-derived peptides interacting with the Fc epsilon RI. *Immunol Lett.* 1999 May 3;68(1):79-82. PMID: 10397159
- Fahy JV, Fleming HE, Wong HH, Liu JT, Su JQ, Reimann J, Fick RB Jr, Boushey HA. The effect of an anti-IgE monoclonal antibody on the early- and late-phase responses to allergen inhalation in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Jun;155(6):1828-34. PMID: 9196082

- Fernandez HN, Hugli TE. Primary structural analysis of the polypeptide portion of human C5a anaphylatoxin. Polypeptide sequence determination and assignment of the oligosaccharide attachment site in C5a. 1978 Oct 10;253(19):6955-64. PMID: 690134
- Finotto S, De Sanctis GT, Lehr HA, Herz U, Buerke M, Schipp M, Bartsch B, Atreya R, Schmitt E, Galle PR, Renz H, Neurath MF. Treatment of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness by antisense-induced local blockade of GATA-3 expression. *J Exp Med*. 2001 Jun 4;193(11):1247-60. PMID: 11390432
- Fischer WH, Hugli TE. Regulation of B cell functions by C3a and C3a(desArg): suppression of TNF-alpha, IL-6, and the polyclonal immune response. *J Immunol*. 1997 Nov 1;159(9):4279-86. PMID: 9379023
- Fischer WH, Jagels MA, Hugli TE. Regulation of IL-6 synthesis in human peripheral blood mononuclear cells by C3a and C3a(desArg). *J Immunol*. 1999 Jan 1;162(1):453-9. PMID: 9886419
- Flood-Page PT, Menzies-Gow AN, Kay AB, Robinson DS. Eosinophil's role remains uncertain as anti-interleukin-5 only partially depletes numbers in asthmatic airway. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Jan 15;167(2):199-204. Epub 2002 Oct 17. PMID: 12406833
- Freeman GJ, Boussiotis VA, Anumanthan A, Bernstein GM, Ke XY, Rennert PD, Gray GS, Gribben JG, Nadler LM. B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity*. 1995 May;2(5):523-32. PMID: 7538442
- Fukuoka Y, Strainic M, Medof ME. Differential cytokine expression of human retinal pigment epithelial cells in response to stimulation by C5a. *Clin Exp Immunol*. 2003 Feb;131(2):248-53. PMID: 12562384
- Garcia-Zepeda EA, Rothenberg ME, Ownbey RT, Celestin J, Leder P, Luster AD. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nat Med*. 1996 Apr;2(4):449-56 PMID: 8597956
- Gavett SH, Chen X, Finkelman F, Wills-Karp M. Depletion of murine CD4+ T lymphocytes prevents antigen- induced airway hyperreactivity and pulmonary eosinophilia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994 Jun;10(6):587-93. PMID: 8003337
- Gelfand EW. Pro: mice are a good model of human airway disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Jul 1;166(1):5-6; discussion 7-8. PMID: 12091160
- Gerard NP, Gerard C. Complement in allergy and asthma. *Curr Opin Immunol*. 2002 Dec;14(6):705-8. PMID: 12413519
- Ghebrehiwet B, Muller-Eberhard HJ. C3e: an acidic fragment of human C3 with leukocytosis-inducing activity. *J Immunol*. 1979 Aug;123(2):616-21. PMID: 110877
- Glaab T, Daser A, Braun A, Neuhaus-Steinmetz U, Fabel H, Alarie Y, Renz H. Tidal midexpiratory flow as a measure of airway hyperresponsiveness in allergic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001 Mar;280(3):L565-73. PMID: 11159041
- Glassberg MK, Ergul A, Wanner A, Puett D. Endothelin-1 promotes mitogenesis in airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994 Mar;10(3):316-21. PMID: 7509612

- Goebeler M, Schnarr B, Toksoy A, Kunz M, Brocker EB, Duschl A, Gillitzer R. Interleukin-13 selectively induces monocyte chemoattractant protein-1 synthesis and secretion by human endothelial cells. Involvement of IL-4R alpha and Stat6 phosphorylation. *Immunology*. 1997 Jul;91(3):450-7. PMID: 9301536
- Gorski JP, Hugli TE, Muller-Eberhard HJ. C4a: the third anaphylatoxin of the human complement system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Oct;76(10):5299-302. PMID: 291947
- Gosselin M, Goulet S, Wu-Wong JR, Wessale JL, Opgenorth TJ, Boulet LP, Battistini B. Effects of a selective ET(A)-receptor antagonist, atrasentan (ABT-627), in murine models of allergic asthma: demonstration of mouse strain specificity. *Clin Sci (Lond)*. 2002 Aug;103 Suppl 48:367S-370S. PMID: 12193124
- Green RH, Brightling CE, Pavord ID, Wardlaw AJ. Management of asthma in adults: current therapy and future directions. *Postgrad Med J*. 2003 May;79(931):259-67. PMID: 12782771
- Grunig G, Warnock M, Wakil AE, Venkayya R, Brombacher F, Rennick DM, Sheppard D, Mohrs M, Donaldson DD, Locksley RM, Corry DB. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science*. 1998 Dec 18;282(5397):2261-3. PMID: 9856950
- Hakonarson H, Grunstein MM. Autocrine regulation of airway smooth muscle responsiveness. *Respir Physiol Neurobiol*. 2003 Sep 16;137(2-3):263-76. PMID: 14516731
- Hakonarson H, Wjst M. Current concepts on the genetics of asthma. *Curr Opin Pediatr*. 2001 Jun;13(3):267-77. PMID: 11389363
- Hamelmann E, Gelfand EW. IL-5-induced airway eosinophilia--the key to asthma? *Immunol Rev*. 2001 Feb;179:182-91. PMID: 11292022
- Hang LW, Hsia TC, Chen WC, Chen HY, Tsai JJ, Tsai FJ. Interleukin-10 gene -627 allele variants, not interleukin-1 beta gene and receptor antagonist gene polymorphisms, are associated with atopic bronchial asthma. *J Clin Lab Anal*. 2003;17(5):168-73. PMID: 12938145
- Hansen G, Jin S, Umetsu DT, Conti M. Absence of muscarinic cholinergic airway responses in mice deficient in the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4D. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jun 6;97(12):6751-6. PMID: 10841571
- Hantos Z, Brusasco V. Assessment of respiratory mechanics in small animals: the simpler the better? *J Appl Physiol*. 2002 Oct;93(4):1196-7. PMID: 12235014
- Hardin JH, Spicer SS. An ultrastructural study of human eosinophil granules: maturational stages and pyroantimonate reactive cation. *Am J Anat*. 1970 Jul;128(3):283-310. PMID: 4193813
- Hargreave FE, Dolovich J, O'Byrne PM, Ramsdale EH, Daniel EE. The origin of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol*. 1986 Nov;78(5 Pt 1):825-32. PMID: 3537079
- Hartmann K, Henz BM, Kruger-Krasagakes S, Kohl J, Burger R, Guhl S, Haase I, Lippert U, Zuberbier T. C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells. *Blood*. 1997 Apr 15;89(8):2863-70. PMID: 9108406
- Haurand M, Flohe L. Leukotriene formation by human polymorphonuclear leukocytes from endogenous arachidonate. Physiological triggers and modulation by prostanoids. *Biochem Pharmacol*. 1989 Jul 1;38(13):2129-37. PMID: 2735951

- Haviland DL, McCoy RL, Whitehead WT, Akama H, Molmenti EP, Brown A, Haviland JC, Parks WC, Perlmutter DH, Wetsel RA. Cellular expression of the C5a anaphylatoxin receptor (C5aR): demonstration of C5aR on nonmyeloid cells of the liver and lung. *J Immunol*. 1995 Feb 15;154(4):1861-9. PMID: 7836770
- Hayashi T, Hasegawa K, Nakai S, Hamachi T, Adachi Y, Yamauchi Y, Maeda K. Bronchial lesions of the late asthmatic response in BALB/c and C57BL/6 mice. *J Comp Pathol*. 2001 Aug-Oct;125(2-3):208-13. PMID: 11578138
- Heijink IH, Vellenga E, Borger P, Postma DS, de Monchy JG, Kauffman HF. Interleukin-6 promotes the production of interleukin-4 and interleukin-5 by interleukin-2-dependent and -independent mechanisms in freshly isolated human T cells. *Immunology*. 2002 Nov;107(3):316-24. PMID: 12423307
- Hellings PW, Vandenberghe P, Kasran A, Coorevits L, Overbergh L, Mathieu C, Ceuppens JL. Blockade of CTLA-4 enhances allergic sensitization and eosinophilic airway inflammation in genetically predisposed mice. *Eur J Immunol*. 2002 Feb;32(2):585-94. PMID: 11828376
- Henderson WR Jr, Tang LO, Chu SJ, Tsao SM, Chiang GK, Jones F, Jonas M, Pae C, Wang H, Chi EY. A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Jan 1;165(1):108-16. PMID: 11779739
- Hennecke M, Otto A, Baensch M, Kola A, Bautsch W, Klos A, Kohl J. A detailed analysis of the C5a anaphylatoxin effector domain: selection of C5a phage libraries on differentiated U937 cells. *Eur J Biochem*. 1998 Feb 15;252(1):36-44. PMID: 9523709
- Henson P. Complementing asthma. *Nat Immunol*. 2000 Sep;1(3):190-2. PMID: 10973272
- Herrick CA, Das J, Xu L, Wisnewski AV, Redlich CA, Bottomly K. Differential roles for CD4 and CD8 T cells after diisocyanate sensitization: genetic control of TH2-induced lung inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 May;111(5):1087-94 PMID: 12743574
- Heusser CH, Wagner K, Bews JP, Coyle A, Bertrand C, Einsle K, Kips J, Eum SY, Lefort J, Vargaftig BB. 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 May-Jul;113(1-3):231-5. PMID: 9130531
- Hirani S, Fair DS, Papin RA, Sundsmo JS. Leukocyte complement: interleukin-like properties of factor Bb. *Cell Immunol*. 1985 May;92(2):235-46. PMID: 3846490
- Hitsumoto Y, Okada M, Makino H. Inhibition of human and mouse complement-dependent hemolytic activity by mouse fibronectin. *fibronectin Immunopharmacology*. 1999 May;42(1-3):203-8. PMID: 10408381
- Hogaboam CM, Blease K, Mehrad B, Steinhauser ML, Standiford TJ, Kunkel SL, Lukacs NW. Chronic airway hyperreactivity, goblet cell hyperplasia, and peribronchial fibrosis during allergic airway disease induced by *Aspergillus fumigatus*. *Am J Pathol*. 2000 Feb;156(2):723-32. PMID: 10666400
- Hogg JC, James AL, Pare PD. Evidence for inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1991 Mar;143(3 Pt 2):S39-42. PMID: 2003688
- Hogg JC. Bronchial mucosal permeability and its relationship to airways hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol*. 1981 Jun;67(6):421-5. PMID: 7346527

- Holt PG. Programming for responsiveness to environmental antigens that trigger allergic respiratory disease in adulthood is initiated during the perinatal period. *Environ Health Perspect.* 1998 Jun;106 Suppl 3:795-800. PMID: 9646039
- Hopkin JM. Mechanisms of enhanced prevalence of asthma and atopy in developed countries. *Curr Opin Immunol.* 1997 Dec;9(6):788-92. PMID: 9492979
- hopkins-genomics.org. http://www.hopkins-genomics.org/ali/ali_murine_bleo_results.html
- Horner WE, Helbling A, Salvaggio JE, Lehrer SB. Fungal allergens. *Clin Microbiol Rev.* 1995 Apr;8(2):161-79. PMID: 7621398
- Howard TD, Koppelman GH, Xu J, Zheng SL, Postma DS, Meyers DA, Bleecker ER. Gene-gene interaction in asthma: IL4RA and IL13 in a Dutch population with asthma. *Am J Hum Genet.* 2002 Jan;70(1):230-6. Epub 2001 Nov 14. PMID: 11709756
- Hoymann HG, Heinrich U, Beume R, Kilian U. Comparative investigation of the effects of zardaverine and theophylline on pulmonary function in rats. *Exp Lung Res.* 1994 May-Jun;20(3):235-50. PMID: 7925141
- Huber-Lang MS, Riedeman NC, Sarma JV, Younkin EM, McGuire SR, Laudes IJ, Lu KT, Guo RF, Neff TA, Padgaonkar VA, Lambris JD, Spruce L, Mastellos D, Zetoune FS, Ward PA. Protection of innate immunity by C5aR antagonist in septic mice. *FASEB J.* 2002 Oct;16(12):1567-74. PMID: 12374779
- Hugli TE, Kawahara MS, Unson CG, Molinar-Rode R, Erickson BW. The active site of human C4a anaphylatoxin. *Mol Immunol.* 1983 Jun;20(6):637-45. PMID: 6603573
- Hugli TE. Human anaphylatoxin (C3a) from the third component of complement. Primary structure. *J Biol Chem.* 1975 Nov 10;250(21):8293-301. PMID: 1238393
- Humbles AA, Lu B, Friend DS, Okinaga S, Lora J, Al-Garawi A, Martin TR, Gerard NP, Gerard C. The murine CCR3 receptor regulates both the role of eosinophils and mast cells in allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Feb 5;99(3):1479-84. PMID: 11830666
- Humbles AA, Lu B, Nilsson CA, Lilly C, Israel E, Fujiwara Y, Gerard NP, Gerard C. A role for the C3a anaphylatoxin receptor in the effector phase of asthma. *Nature.* 2000 Aug 31;406(6799):998-1001. PMID: 10984054
- Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczek RA. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature.* 1999 Jan 21;397(6716):263-6. PMID: 9930702
- Huygen K, Palfliet K. In vitro production of gamma interferon is dependent on the mouse genotype. *J Interferon Res.* 1983;3(1):129-37. PMID: 6221053
- Iozzo RV, MacDonald GH, Wight TN. Immunoelectron microscopic localization of catalase in human eosinophilic leukocytes. *J Histochem Cytochem.* 1982 Jul;30(7):697-701. PMID: 6809811
- Ito K, Lim S, Caramori G, Cosio B, Chung KF, Adcock IM, Barnes PJ. A molecular mechanism of action of theophylline: Induction of histone deacetylase activity to decrease inflammatory gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jun 25;99(13):8921-6. Epub 2002 Jun 17. PMID: 12070353

- Jagels MA, Daffern PJ, Hugli TE. C3a and C5a enhance granulocyte adhesion to endothelial and epithelial cell monolayers: epithelial and endothelial priming is required for C3a-induced eosinophil adhesion. *Immunopharmacology*. 2000 Mar;46(3):209-22. PMID: 10741901
- James AL, Pare PD, Hogg JC. The mechanics of airway narrowing in asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1989 Jan;139(1):242-6. PMID: 2912345
- James K. Complement: activation, consequences, and control. *Am J Med Technol*. 1982 Sep;48(9):735-42. PMID: 6215861
- Ji X, Azumi K, Sasaki M, Nonaka M. ancient origin of the complement lectin pathway revealed by molecular cloning of mannan binding protein- associated serine protease from a urochordate, the Japanese ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jun 10;94(12):6340-5. PMID: 9177219
- Jimeno L, Lombardero M, Carreira J, Moscoso Del Prado J. Presence of IgG4 on the membrane of human basophils. Histamine release is induced by monoclonal antibodies directed against the Fab but not the Fc region of the IgG4 molecule. *Clin Exp Allergy*. 1992 Nov;22(11):1007-14. PMID: 1281749
- Jose PJ, Griffiths-Johnson DA, Collins PD, Walsh DT, Moqbel R, Totty NF, Truong O, Hsuan JJ, Williams TJ. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J Exp Med*. 1994 Mar 1;179(3):881-7. PMID: 7509365
- Kaplan AP. Chemokines, chemokine receptors and allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001 Apr;124(4):423-31. PMID: 11340325
- Karp CL, Grupe A, Schadt E, Ewart SL, Keane-Moore M, Cuomo PJ, Kohl J, Wahl L, Kuperman D, Germer S, Aud D, Peltz G, Wills-Karp M. Identification of complement factor 5 as a susceptibility locus for experimental allergic asthma. *Nat Immunol*. 2000 Sep;1(3):221-6. PMID: 10973279
- Kelly HW. The assessment of childhood asthma. *Pediatr Clin North Am*. 2003 Jun;50(3):593-608. PMID: 12877238
- Kimura M, Tsuruta S, Yoshida T. IL-4 production by PBMCs on stimulation with mite allergen is correlated with the level of serum IgE antibody against mite in children with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Feb;105(2 Pt 1):327-32. PMID: 10669854
- Kirchhoff K, Weinmann O, Zwirner J, Begemann G, Gotze O, Kapp A, Werfel T. Detection of anaphylatoxin receptors on CD83+ dendritic cells derived from human skin. *Immunology*. 2001 Jun;103(2):210-7. PMID: 11412308
- Kirschfink M, Borsos T. Binding and activation of C4 and C3 on the red cell surface by non-complement enzymes. *Mol Immunol*. 1988 May;25(5):505-12. PMID: 3412332
- Kirschfink M. Targeting complement in therapy. *Immunol Rev*. 2001 Apr;180:177-89. PMID: 11414360
- Knall C, Worthen GS, Buhl AM, Johnson GL. IL-8 signal transduction in human neutrophils. *Ann N Y Acad Sci*. 1995 Sep 7;766:288-91. PMID: 7486674
- Knight D. Epithelium-fibroblast interactions in response to airway inflammation. *Immunol Cell Biol*. 2001 Apr;79(2):160-4. PMID: 11264711

- Kodani M, Sakata N, Takano Y, Kamiya H, Katsuragi T, Hugli TE, Abe M. Intratracheal administration of anaphylatoxin C5a potentiates antigen-induced pulmonary reactions through the prolonged production of cysteinyl-leukotrienes. *Immunopharmacology*. 2000 Sep;49(3):263-74. PMID: 10996024
- Krug N, Tschernig T, Erpenbeck VJ, Hohlfeld JM, Kohl J. Complement factors C3a and C5a are increased in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation in subjects with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Nov 15;164(10 Pt 1):1841-3. PMID: 11734433
- Kumar RK, O'Grady R, Maronese SE, Wilson MR. Epithelial cell-derived transforming growth factor-beta in bleomycin-induced pulmonary injury. *Int J Exp Pathol*. 1996 Jun;77(3):99-107. PMID: 8774378
- Kurup VP, Xia JQ, Cramer R, Rickaby DA, Choi HY, Fluckiger S, Blaser K, Dawson CA, Kelly KJ. Purified recombinant *A. fumigatus* allergens induce different responses in mice. *Clin Immunol*. 2001 Mar;98(3):327-36. PMID: 11237556
- Kurup VP, Xia JQ, Shen HD, Rickaby DA, Henderson JD Jr, Fink JN, Chou H, Kelly KJ, Dawson CA. Alkaline serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* has synergistic effects on Asp-f-2-induced immune response in mice. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002 Oct;129(2):129-37. PMID: 12403930
- L. Prieto, V. Gutiérrez The limitations of the functional response model to the bronchial challenge with allergens in asthma *Alergol Inmunol Clin* 2000;15:77-81
- Lacy M, Jones J, Whittemore SR, Haviland DL, Wetsel RA, Barnum SR. Expression of the receptors for the C5a anaphylatoxin, interleukin-8 and FMLP by human astrocytes and microglia. *J Neuroimmunol*. 1995 Aug;61(1):71-8 PMID: 7560015
- Lambrecht BN, Salomon B, Klatzmann D, Pauwels RA. Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice. *J Immunol*. 1998 Apr 15;160(8):4090-7. PMID: 9558120
- Lane PJ, Brouck T. Developmental regulation of dendritic cell function. *Curr Opin Immunol*. 1999 Jun;11(3):308-13. PMID: 10375555
- Lantero S, Alessandri G, Spallarossa D, Scarso L, Rossi GA. Stimulation of eosinophil IgE low-affinity receptor leads to increased adhesion molecule expression and cell migration. *Eur Respir J*. 2000 Nov;16(5):940-6. PMID: 11153596
- Laudes IJ, Chu JC, Huber-Lang M, Guo RF, Riedemann NC, Sarma JV, Mahdi F, Murphy HS, Speyer C, Lu KT, Lambris JD, Zetoune FS, Ward PA. Expression and function of C5a receptor in mouse microvascular endothelial cells. *J Immunol*. 2002 Nov 15;169(10):5962-70. PMID: 12421982
- Le Gros G, Ben-Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med*. 1990 Sep 1;172(3):921-9. PMID: 2117636
- Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, Mathur AK, Cowley HC, Chung KF, Djukanovic R, Hansel TT, Holgate ST, Sterk PJ, Barnes PJ. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet*. 2000 Dec 23-30;356(9248):2144-8. PMID: 11191542

- Leong KP, Huston DP. Understanding the pathogenesis of allergic asthma using mouse models. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2001 Aug;87(2):96-109; quiz 110,. PMID: 11527255
- Lett-Brown MA, Leonard EJ. Histamine-induced inhibition of normal human basophil chemotaxis to C5a. *J Immunol.* 1977 Mar;118(3):815-8. PMID: 845438
- Lienenklaus S, Ames RS, Tornetta MA, Sarau HM, Foley JJ, Crass T, Sohns B, Raffetseder U, Grove M, Holzer A, Klos A, Kohl J, Bautsch W. Human anaphylatoxin C4a is a potent agonist of the guinea pig but not the human C3a receptor. *J Immunol.* 1998 Sep 1;161(5):2089-93. PMID: 9725198
- Liu LY, Jarjour NN, Busse WW, Kelly EA. Chemokine receptor expression on human eosinophils from peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid after segmental antigen challenge. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Sep;112(3):556-62. PMID: 13679815
- Liu T, Nishimura H, Matsuguchi T, Yoshikai Y. Differences in interleukin-12 and -15 production by dendritic cells at the early stage of *Listeria monocytogenes* infection between BALB/c and C57 BL/6 mice. *Cell Immunol.* 2000 May 25;202(1):31-40. PMID: 10873304
- Locksley RM. Th2 cells: help for helminths. *J. Exp Med.* 1994 May 1;179(5):1405-7. PMID: 8163928
- Luccioli S, Brody DT, Hasan S, Keane-Myers A, Prussin C, Metcalfe DD. IgE(+), Kit(-), I-A/I-E(-) myeloid cells are the initial source of IL-4 after antigen challenge in a mouse model of allergic pulmonary inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2002 Jul;110(1):117-24. PMID: 12110830
- Maezawa Y, Nakajima H, Seto Y, Suto A, Kumano K, Kubo S, Karasuyama H, Saito Y, Iwamoto I. IgE-dependent enhancement of Th2 cell-mediated allergic inflammation in the airways. *Clin Exp Immunol.* 2004 Jan;135(1):12-18. PMID: 14678259
- Maizel A, Sahasrabudhe C, Mehta S, Morgan J, Lachman L, Ford R. Biochemical separation of a human B cell mitogenic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Oct;79(19):5998-6002. PMID: 6985268
- Martin C, Uhlig S, Ullrich V. Videomicroscopy of methacholine-induced contraction of individual airways in precision-cut lung slices. *Eur Respir J.* 1996 Dec;9(12):2479-87. PMID: 8980957
- Martin C, Wohlsen A, Uhlig S. Changes in airway resistance by simultaneous exposure to TNF-alpha and IL-1beta in perfused rat lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001 Apr;280(4):L595-601. PMID: 11237998
- Martin LB, Kita H, Leiferman KM, Gleich GJ. Eosinophils in allergy: role in disease, degranulation, and cytokines. *Int Arch Allergy Immunol.* 1996 Mar;109(3):207-15. PMID: 8620088
- Martin TR, Takeishi T, Katz HR, Austen KF, Drazen JM, Galli SJ. cell activation enhances airway responsiveness to methacholine in the mouse. *J Clin Invest.* 1993 Mar;91(3):1176-82. PMID: 8450046
- Martinez Ordaz VA, Rincon-Castaneda CB, Esquivel Lopez G, Lazo- Saenz JG, Llorenz Meraz MT, Velasco Rodriguez VM. [Fungal spores in the environment of the asthmatic patient in a semi-desert area of Mexico] *Rev Alerg Mex.* 2002 Jan-Feb;49(1):2-7. PMID: 12070893

- Masten BJ, Lipscomb MF. Dendritic cells: pulmonary immune regulation and asthma. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2000 Jun;55(3):225-30. PMID: 10948671
- Matricardi PM, Rosmini F, Ferrigno L, Nisini R, Rapicetta M, Chionne P, Stroffolini T, Pasquini P, D'Amelio R. Cross sectional retrospective study of prevalence of atopy among Italian military students with antibodies against hepatitis A virus. *BMJ*. 1997 Apr 5;314(7086):999-1003. PMID: 9112843
- Mattes J, Foster PS. Regulation of eosinophil migration and Th2 cell function by IL-5 and eotaxin. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2003 Jun;2(2):169-74. PMID: 14561170
- Mattes J, Karmaus W. The use of antibiotics in the first year of life and development of asthma: which comes first? *Clin Exp Allergy*. 1999 Jun;29(6):729-32. PMID: 10336584
- Mayr SI, Zuberi RI, Zhang M, de Sousa-Hitzler J, Ngo K, Kuwabara Y, Yu L, Fung-Leung WP, Liu FT. IgE-dependent mast cell activation potentiates airway responses in murine asthma models. *J Immunol*. 2002 Aug 15;169(4):2061-8 PMID: 12165533
- McBride JT: Architecture of the tracheobronchial tree. In *Treatise on Pulmonary Toxicology: Comparative Biology of the Normal Lung* (Edited by: Parent RA). Boca Raton, Florida: CRC Press 1992, 49-61.
- Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept*. 1999 Nov 30;85(1):9-24. PMID: 10588446
- Meri S, Jarva H. Complement regulation. *Vox Sang*. 1998;74 Suppl 2:291-302. PMID: 9704459
- Meri S, Pangburn MK. A mechanism of activation of the alternative complement pathway by the classical pathway: protection of C3b from inactivation by covalent attachment to C4b. *Eur J Immunol*. 1990 Dec;20(12):2555-61. PMID: 2148521
- Monod M, Capoccia S, Lechenne B, Zaugg C, Holdom M, Jousson O. Secreted proteases from pathogenic fungi. *Int J Med Microbiol*. 2002 Oct;292(5-6):405-19. PMID: 12452286
- Monsinjon T, Gasque P, Chan P, Ischenko A, Brady JJ, Fontaine MC. Regulation by complement C3a and C5a anaphylatoxins of cytokine production in human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J*. 2003 Jun;17(9):1003-14. PMID: 12773483
- Moore PE, Church TL, Chism DD, Panettieri RA Jr, Shore SA. IL-13 and IL-4 cause eotaxin release in human airway smooth muscle cells: a role for ERK. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Apr;282(4):L847-53. PMID: 11880312
- Moqbel R, Levi-Schaffer F, Kay AB. Cytokine generation by eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*. 1994 Dec;94(6 Pt 2):1183-8. PMID: 7798558
- Moqbel R, Ying S, Barkans J, Newman TM, Kimmitt P, Wakelin M, Taborda-Barata L, Meng Q, Corrigan CJ, Durham SR, et al. Identification of messenger RNA for IL-4 in human eosinophils with granule localization and release of the translated product. *J Immunol*. 1995 Nov 15;155(10):4939-47. PMID: 7594499
- Morawetz RA, Gabriele L, Rizzo LV, Noben-Trauth N, Kuhn R, Rajewsky K, Muller W, Doherty TM, Finkelman F, Coffman RL, Morse HC 3rd. Interleukin (IL)-4-independent immunoglobulin class switch to immunoglobulin (Ig)E in the mouse. *J Exp Med*. 1996 Nov 1;184(5):1651-61. PMID: 8920855

- Morokata T, Ishikawa J, Ida K, Yamada T. C57BL/6 mice are more susceptible to antigen-induced pulmonary eosinophilia than BALB/c mice, irrespective of systemic T helper 1/T helper 2 responses. *Immunology*. 1999 Nov;98(3):345-51.
- Mould AW, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG, Rothenberg ME, Foster PS. The effect of IL-5 and eotaxin expression in the lung on eosinophil trafficking and degranulation and the induction of bronchial hyperreactivity. *J Immunol*. 2000 Feb 15;164(4):2142-50. PMID: 10657668
- Murakami Y, Imamichi T, Nagasawa S. Characterization of C3a anaphylatoxin receptor on guinea-pig macrophages. *Immunology*. 1993 Aug;79(4):633-8. PMID: 8406589
- Murphy PM. International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacol Rev*. 2002 Jun;54(2):227-9. PMID: 12037138
- Nagase H, Miyamasu M, Yamaguchi M, Fujisawa T, Kawasaki H, Ohta K, Yamamoto K, Morita Y, Hirai K. Regulation of chemokine receptor expression in eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;125 Suppl 1:29-32. PMID: 11408769
- Nagase T, Ishii S, Katayama H, Fukuchi Y, Ouchi Y, Shimizu T. Airway responsiveness in transgenic mice overexpressing platelet-activating factor receptor. Roles of thromboxanes and leukotrienes. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Nov;156(5):1621-7. PMID: 9372685
- Naseer T, Minshall EM, Leung DY, Laberge S, Ernst P, Martin RJ, Hamid Q. 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 Mar;155(3):845-51. PMID: 9117015
- Nataf S, Davoust N, Ames RS, Barnum SR. Human T cells express the C5a receptor and are chemoattracted to C5a. *J Immunol*. 1999 Apr 1;162(7):4018-23. PMID: 10201923
- Nataf S, Stahel PF, Davoust N, Barnum SR. Complement anaphylatoxin receptors on neurons: new tricks for old receptors? *Trends Neurosci*. 1999 Sep;22(9):397-402. PMID: 10441300
- Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:701-38. PMID: 10358772
- Neuhaus-Steinmetz U, Glaab T, Daser A, Braun A, Lommatzsch M, Herz U, Kips J, Alarie Y, Renz H. Sequential development of airway hyperresponsiveness and acute airway obstruction in a mouse model of allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000 Jan;121(1):57-67. PMID: 10686510
- Nilsson G, Johnell M, Hammer CH, Tiffany HL, Nilsson K, Metcalfe DD, Siegbahn A, Murphy PM. C3a and C5a are chemotaxins for human mast cells and act through distinct receptors via a pertussis toxin-sensitive signal transduction pathway. *J Immunol*. 1996 Aug 15;157(4):1693-8. PMID: 8759757
- Nolles G, Hoekstra MO, Schouten JP, Gerritsen J, Kauffman HF. Prevalence of immunoglobulin E for fungi in atopic children. *Clin Exp Allergy*. 2001 Oct;31(10):1564-70. PMID: 11678856
- O'Barr S, Cooper NR. The C5a complement activation peptide increases IL-1beta and IL-6 release from amyloid-beta primed human monocytes: implications for Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol*. 2000 Sep 22;109(2):87-94. PMID: 10996210

- Obase Y, Shimoda T, Mitsuta K, Matsuo N, Matsuse H, Kohno S. Correlation between airway hyperresponsiveness and airway inflammation in a young adult population: eosinophil, ECP, and cytokine levels in induced sputum. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2001 Mar;86(3):304-10. PMID: 11289329
- Obiri NI, Debinski W, Leonard WJ, Puri RK. Receptor for interleukin 13. Interaction with interleukin 4 by a mechanism that does not involve the common gamma chain shared by receptors for interleukins 2, 4, 7, 9, and 15. *J Biol Chem.* 1995 Apr 14;270(15):8797-804. PMID: 7721786
- Obiri NI, Leland P, Murata T, Debinski W, Puri RK. The IL-13 receptor structure differs on various cell types and may share more than one component with IL-4 receptor. *J Immunol.* 1997 Jan 15;158(2):756-64. PMID: 8992992
- O'Byrne PM, Inman MD. New considerations about measuring airway hyperresponsiveness. *J Asthma.* 2000 Jun;37(4):293-302. PMID: 10883740
- Ogilvie P, Bardi G, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Ugucioni M. Eotaxin is a natural antagonist for CCR2 and an agonist for CCR5 *Blood.* 2001 Apr 1;97(7):1920-4. PMID: 11264152
- Ohshima Y, Yang LP, Uchiyama T, Tanaka Y, Baum P, Sergerie M, Hermann P, Delespesse G. OX40 costimulation enhances interleukin-4 (IL-4) expression at priming and promotes the differentiation of naive human CD4(+) T cells into high IL-4-producing effectors. *Blood.* 1998 Nov 1;92(9):3338-45. PMID: 9787171
- Okayama Y, Bradding P, Tunon-de-Lara JM, Holgate ST, Church MK. Cytokine production by human mast cells. *Chem Immunol.* 1995;61:114-34. PMID: 7662140
- Okinaga S, Slattery D, Humbles A, Zsengeller Z, Morteau O, Kinrade MB, Brodbeck RM, Krause JE, Choe HR, Gerard NP, Gerard C. C5L2, a nonsignaling C5A binding protein. *Biochemistry.* 2003 Aug 12;42(31):9406-15. PMID: 12899627
- O'Neil KM. Complement deficiency. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2000 Oct;19(2):83-108. PMID: 11107496
- Onodera H, Okamoto M, Takemura S, Doi T, Kasamatsu Y, Yanagida K, Fukuda W, Tanaka M, Deguchi M, Ueda M, et al. [Complement fragments in patients with bronchial asthma] *Arerugi.* 1991 Oct;40(10):1272-81. PMID: 1772350
- Onyemelukwe GC. Complement components in Nigerians with bronchial asthma. *Ann Allergy.* 1989 Oct;63(4):309-12. PMID: 2802267
- Oravec T, Pall M, Roderiquez G, Gorrell MD, Ditto M, Nguyen NY, Boykins R, Unsworth E, Norcross MA. Regulation of the receptor specificity and function of the chemokine RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) by dipeptidyl peptidase IV (CD26)-mediated cleavage. *J Exp Med.* 1997 Dec 1;186(11):1865-72. PMID: 9382885
- Otto M, Hawlisch H, Monk PN, Mueller M, Klos A, Karp CL, Koehl J. C5a mutants are potent antagonists of the C5a receptor (CD88) and of C5L2: Position 69 is the locus that determines agonism or antagonism. *J Biol Chem.* 2003 Oct 21 [Epub ahead of print]. PMID: 14570896
- Pala P, Message SD, Johnston SL, Openshaw PJ. Increased aeroallergen-specific interleukin-4-producing T cells in asthmatic adults. *Clin Exp Allergy.* 2002 Dec;32(12):1739-44. PMID: 12653165

- Parmley RT, Spicer SS. Cytochemical and ultrastructural identification of a small type granule in human late eosinophils. *Lab Invest.* 1974 May;30(5):557-67. PMID: 4133088
- Pease JE, Williams TJ. Eotaxin and asthma. *Curr Opin Pharmacol.* 2001 Jun;1(3):248-53. PMID: 11712747
- Perlmutter DH, Colten HR. The role of complement in the pathophysiology of lung diseases. R. G. Crystal, and J. B. West, eds. 1997 *The Lung: Scientific Foundation* 841.- 857. Lippincott, Philadelphia.
- Persson CG. Con: mice are not a good model of human airway disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Jul 1;166(1):6-7; discussion 8. PMID: 12091161
- Peters M, Meyer zum Buschenfelde KH, Rose-John S. The function of the soluble IL-6 receptor in vivo. *Immunol Lett.* 1996 Dec;54(2-3):177-84. PMID: 9052874
- Pobanz JM, Reinhardt RA, Koka S, Sanderson SD. C5a modulation of interleukin-1 beta-induced interleukin-6 production by human osteoblast-like cells. *J Periodontal Res.* 2000 Jun;35(3):137-45. PMID: 10929868
- Pomes A. Intrinsic properties of allergens and environmental exposure as determinants of allergenicity. *Allergy.* 2002 Aug;57(8):673-9 PMID: 12121184
- Pradalier A. Late-phase reaction in asthma: basic mechanisms. *Int Arch Allergy Immunol.* 1993;101(3):322-5. PMID: 8324396
- Proost P, De Meester I, Schols D, Struyf S, Lambeir AM, Wuyts A, Opdenakker G, De Clercq E, Scharpe S, Van Damme J. Amino-terminal truncation of chemokines by CD26/dipeptidyl-peptidase IV. Conversion of RANTES into a potent inhibitor of monocyte chemotaxis and HIV-1-infection. *J Biol Chem.* 1998 Mar 27;273(13):7222-7. PMID: 9516414
- Riedemann NC, Guo RF, Sarma VJ, Laudes IJ, Huber-Lang M, Warner RL, Albrecht EA, Speyer CL, Ward PA. Expression and function of the C5a receptor in rat alveolar epithelial cells. *J Immunol.* 2002 Feb 15;168(4):1919-25. PMID: 11823527
- Rulifson IC, Sperling AI, Fields PE, Fitch FW, Bluestone JA. CD28 costimulation promotes the production of Th2 cytokines *J Immunol.* 1997 Jan 15;158(2):658-65. PMID: 8992981
- Sahu A, Lambris JD. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunol Rev.* 2001 Apr;180:35-48. PMID: 11414361
- Schwartz LB, Kawahara MS, Hugli TE, Vik D, Fearon DT, Austen KF. Generation of C3a anaphylatoxin from human C3 by human mast cell tryptase. *J Immunol.* 1983 Apr;130(4):1891-5. PMID: 6339618
- Sakai K, Yokoyama A, Kohno N, Hamada H, Hiwada K. Prolonged antigen exposure ameliorates airway inflammation but not remodeling in a mouse model of bronchial asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001 Oct;126(2):126-34. PMID: 11729350
- Salvi S, Semper A, Blomberg A, Holloway J, Jaffar Z, Papi A, Teran L, Polosa R, Kelly F, Sandstrom T, Holgate S, Frew A. Interleukin-5 production by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999 May;20(5):984-91. PMID: 10226068
- Sandford AJ, Chagani T, Zhu S, Weir TD, Bai TR, Spinelli JJ, Fitzgerald JM, Behbehani NA, Tan WC, Pare PD. polymorphisms in the IL4, IL4RA, and FCER1B genes and asthma severity. *J Allergy Clin Immunol.* 2000 Jul;106(1 Pt 1):135-40. PMID: 10887316

- Schmidt D, Rabe KF. Immune mechanisms of smooth muscle hyperreactivity in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2000 Apr;105(4):673-82. PMID: 10756215
- Schraufstatter IU, Trieu K, Sikora L, Sriramarao P, DiScipio R. Complement C3a and C5a Induce Different Signal Transduction Cascades in Endothelial Cells¹ *J Immunol.* 2002 Aug 15;169(4):2102-10. PMID: 12165538
- Schroeder JT, Lichtenstein LM, Roche EM, Xiao H, Liu MC. IL-4 production by human basophils found in the lung following segmental allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Feb;107(2):265-71. PMID: 11174192
- Schulz O, Sewell HF, Shakib F. Proteolytic cleavage of CD25, the alpha subunit of the human T cell interleukin 2 receptor, by Der p 1, a major mite allergen with cysteine protease activity. *J Exp Med.* 1998 Jan 19;187(2):271-5. PMID: 9432986
- Shaheen SO, Aaby P, Hall AJ, Barker DJ, Heyes CB, Shiell AW, Goudiaby A. Measles and atopy in Guinea-Bissau. *Lancet.* 1996 Jun 29;347(9018):1792-6. PMID: 8667923
- Shushakova N, Skokowa J, Schulman J, Baumann U, Zwirner J, Schmidt RE, Gessner JE. C5a anaphylatoxin is a major regulator of activating versus inhibitory FcγR3s in immune complex-induced lung disease. *J Clin Invest.* 2002 Dec;110(12):1823-30. PMID: 12488432
- Siroux V, Oryszczyn MP, Paty E, Kauffmann F, Pison C, Vervloet D, Pin I. Relationships of allergic sensitization, total immunoglobulin E and blood eosinophils to asthma severity in children of the EGEA Study. *Clin Exp Allergy.* 2003 Jun;33(6):746-51. PMID: 12801307
- Song P, Milanese M, Crimi E, Rehder K, Brusasco V. Allergen challenge of passively sensitized human bronchi alters M2 and beta2 receptor function. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Apr;155(4):1230-4. PMID: 9105059
- Soruri A, Kim S, Kiafard Z, Zwirner J. Characterization of C5aR expression on murine myeloid and lymphoid cells by the use of a novel monoclonal antibody. *Immunol Lett.* 2003 Jul 3;88(1):47-52. PMID: 12853161
- StbA 2001. Bundesamt für Statistik <http://www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab20.htm>
- Struyf S, De Meester I, Scharpe S, Lenaerts JP, Menten P, Wang JM, Proost P, Van Damme J. Natural truncation of RANTES abolishes signaling through the CC chemokine receptors CCR1 and CCR3, impairs its chemotactic potency and generates a CC chemokine inhibitor. *Eur J Immunol.* 1998 Apr;28(4):1262-71. PMID: 9565366
- Sumiya M, Summerfield JA. The role of collectins in host defense. *Semin Liver Dis.* 1997;17(4):311-8. PMID: 9408966 Turner MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol.* 2003 Nov;40(7):423-9. PMID: 14568388
- Suzuki H, Chung FZ, Palmer E, Sasaki T, Ohara N, Taylor BA, Ohara J. Gene mapping of mouse IL-4 receptor: the loci of interleukin 4 (IL-4) receptor gene and lymphocyte function associated antigen 1 (LFA-1) gene are closely linked on chromosome 7. *Immunogenetics.* 1991;34(4):252-6. PMID: 1680807
- Takafuji S, Bischoff SC, De Weck AL, Dahinden CA. IL-3 and IL-5 prime normal human eosinophils to produce leukotriene C4 in response to soluble agonists. *J Immunol.* 1991 Dec 1;147(11):3855-61. PMID: 1940371

- Takafuji S, Tadokoro K, Ito K. Effects of interleukin (IL)-3 and IL-5 on human eosinophil degranulation induced by complement components C3a and C5a. 1996 Aug;51(8):563-8. PMID: 8874660
- Takaki S, Kanazawa H, Shiiba M, Takatsu K. A critical cytoplasmic domain of the interleukin-5 (IL-5) receptor alpha chain and its function in IL-5-mediated growth signal transduction. *Mol Cell Biol.* 1994 Nov;14(11):7404-13. PMID: 7935454
- Takeda K, Haczku A, Lee JJ, Irvin CG, Gelfand EW. Strain dependence of airway hyperresponsiveness reflects differences in eosinophil localization in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001 Aug;281(2):L394-402. PMID: 11435214
- Takeda K, Hamelmann E, Joetham A, Shultz LD, Larsen GL, Irvin CG, Gelfand EW. Development of eosinophilic airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mast cell-deficient mice. *J Exp Med.* 1997 Aug 4;186(3):449-54. PMID: 9236197
- Taube C, Rha YH, Takeda K, Park JW, Joetham A, Balhorn A, Dakhama A, Giclas PC, Holers VM, Gelfand EW. Inhibition of complement activation decreases airway inflammation and hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Dec 1;168(11):1333-41. Epub 2003 Sep 18 PMID: 14500265
- ten Berge RE, Santing RE, Hamstra JJ, Roffel AF, Zaagsma J. Dysfunction of muscarinic M2 receptors after the early allergic reaction: possible contribution to bronchial hyperresponsiveness in allergic guinea-pigs. *Br J Pharmacol.* 1995 Feb;114(4):881-7. PMID: 7773550
- Tomkinson A, Cieslewicz G, Duez C, Larson KA, Lee JJ, Gelfand EW. Temporal association between airway hyperresponsiveness and airway eosinophilia in ovalbumin-sensitized mice. PMID: 11254531
- Tomkinson A, Duez C, Cieslewicz G, Gelfand EW. Eotaxin-1-deficient mice develop airway eosinophilia and airway hyperresponsiveness. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001 Oct;126(2):119-25. PMID: 11729349
- Tsuji RF, Kawikova I, Ramabhadran R, Akahira-Azuma M, Taub D, Hugli TE, Gerard C, Askenase PW. Early local generation of C5a initiates the elicitation of contact sensitivity by leading to early T cell recruitment. *J Immunol.* 2000 Aug 1;165(3):1588-98. PMID: 10903768
- Tsuruta T, Yamamoto T, Matsubara S, Nagasawa S, Tanase S, Tanaka J, Takagi K, Kambara T. Novel function of C4a anaphylatoxin. Release from monocytes of protein which inhibits monocyte chemotaxis. *Am J Pathol.* 1993 Jun;142(6):1848-57. PMID: 8506953
- Uguccioni M, Loetscher P, Forssmann U, Dewald B, Li H, Lima SH, Li Y, Kreider B, Garotta G, Thelen M, Baggiolini M. Monocyte chemotactic protein 4 (MCP-4), a novel structural and functional analogue of MCP-3 and eotaxin. *J Exp Med.* 1996 May 1;183(5):2379-84. PMID: 8642349
- Uzonna JE, Kaushik RS, Zhang Y, Gordon JR, Tabel H. Experimental murine *Trypanosoma congolense* infections. II. Role of splenic adherent CD3+Thy1.2+ TCR-alpha beta- gamma delta- CD4+8- and CD3+Thy1.2+ TCR-alpha beta- gamma delta- CD4-8- cells in the production of IL-4, IL-10, and IFN-gamma and in trypanosome-elicited immunosuppression. *J Immunol.* 1998 Dec 1;161(11):6189-97. PMID: 9834105

- van de Graaf EA, Jansen HM, Bakker MM, Alberts C, Eeftinck Schattenkerk JK, Out TA. ELISA of complement C3a in bronchoalveolar lavage fluid. *Asthma J Immunol Methods*. 1992 Mar 4;147(2):241-50. PMID: 1548406
- van der Pouw Kraan TC, Boeije LC, de Groot ER, Stapel SO, Snijders A, Kapsenberg ML, van der Zee JS, Aarden LA. Reduced production of IL-12 and IL-12-dependent IFN- gamma release in patients with allergic asthma. *J Immunol*. 1997 Jun 1;158(11):5560-5. PMID: 9164981
- van der Velden VH, Hulsmann AR. Peptidases: structure, function and modulation of peptide-mediated effects in the human lung. *Clin Exp Allergy*. 1999 Apr;29(4):445-56. PMID: 10202358
- van der Zee JS, van Swieten P, Aalberse RC. Serologic aspects of IgG4 antibodies. II. IgG4 antibodies form small, nonprecipitating immune complexes due to functional monovalency. *J Immunol*. 1986 Dec 1;137(11):3566-71. PMID: 3782791
- van Oosterhout AJ, van Ark I, Folkerts G, van der Linde HJ, Savelkoul HF, Verheyen AK, Nijkamp FP. Antibody to interleukin-5 inhibits virus-induced airway hyperresponsiveness to histamine in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Jan;151(1):177-83 PMID: 7812550
- Wang LH, Ahmad S, Benter IF, Chow A, Mizutani S, Ward PE. Differential processing of substance P and neurokinin A by plasma dipeptidyl(amino)peptidase IV, aminopeptidase M and angiotensin converting enzyme. *Peptides*. 1991 Nov-Dec;12(6):1357-64. PMID: 1726123
- Ward PA, Riedemann NC, Guo RF, Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS. Anti-complement strategies in experimental sepsis *Scand J Infect Dis*. 2003;35(9):601-3. PMID: 14620141
- Wardlaw AJ, Brightling CE, Green R, Woltmann G, Bradding P, Pavord ID. New insights into the relationship between airway inflammation and asthma. *Clin Sci (Lond)*. 2002 Aug;103(2):201-11. PMID: 12149112
- Wardlaw AJ, Dunnette S, Gleich GJ, Collins JV, Kay AB. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma. Relationship to bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis*. 1988 Jan;137(1):62-9. PMID: 2447813
- Watts TH, DeBenedette MA. T cell co-stimulatory molecules other than CD28. *Curr Opin Immunol*. 1999 Jun;11(3):286-93. PMID: 10375549
- Weissflog D, Matthys H, Hasse J, Virchow Jr JC. [Epidemiology and costs of lung cancer in Germany] *Pneumologie*. 2001 Jul;55(7):333-8. PMID: 11481580
- Welch TR, Frenzke M, Witte D, Davis AE. C5a is important in the tubulointerstitial component of experimental immune complex glomerulonephritis. PMID: 12296852
- Weller PF, Dvorak AM. Arachidonic acid incorporation by cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. *Blood*. 1985 May;65(5):1269-74. PMID: 3922452
- Weller PF, Dvorak AM. Lipid bodies: intracellular sites for eicosanoid formation. *J Allergy Clin Immunol*. 1994 Dec;94(6 Pt 2):1151-6. PMID: 7798553
- Weller PF, Monahan-Earley RA, Dvorak HF, Dvorak AM. Cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. Subcellular isolation and analysis of arachidonate incorporation. *Am J Pathol*. 1991 Jan;138(1):141-8. PMID: 1846262

- Wells TN, Proudfoot AE. Chemokine receptors and their antagonists in allergic lung disease. *Inflamm Res*. 1999 Jul;48(7):353-62. PMID: 10450784
- Werfel T, Kirchhoff K, Wittmann M, Begemann G, Kapp A, Heidenreich F, Gotze O, Zwirner J. Activated human T lymphocytes express a functional C3a receptor. *J Immunol*. 2000 Dec 1;165(11):6599-605. PMID: 11086104
- Whitehead GS, Walker JK, Berman KG, Foster WM, Schwartz DA. Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003 Jul;285(1):L32-42. Epub 2003 Mar 07. PMID: 12626335
- Wierenga EA, Snoek M, Jansen HM, Bos JD, van Lier RA, Kapsenberg ML. Human atopenspecific types 1 and 2 T helper cell clones. *J Immunol*. 1991 Nov 1;147(9):2942-9. PMID: 1680923
- Wilder JA, Collie DD, Wilson BS, Bice DE, Lyons CR, Lipscomb MF. Dissociation of airway hyperresponsiveness from immunoglobulin E and airway eosinophilia in a murine model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999 Jun;20(6):1326-34. PMID: 10340953
- Wills-Karp M, Chiaramonte M. Interleukin-13 in asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2003 Jan;9(1):21-7. PMID: 12476080
- Wills-Karp M, Chiaramonte M. Interleukin-13 in asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2003 Jan;9(1):21-7. PMID: 12476080 Torretta MA, Foley JJ, Sarau HM, Ames RS. The mouse anaphylatoxin C3a receptor: molecular cloning, genomic organization, and functional expression. *J Immunol*. 1997 Jun 1;158(11):5277-82. PMID: 9164946
- Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, Donaldson DD. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science*. 1998 Dec 18;282(5397):2258-61. PMID: 9856949
- Wills-Karp M. IL-12/IL-13 axis in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Jan;107(1):9-18. PMID: 11149983
- Wills-Karp M. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:255-81. PMID: 10358759
- Wise JT, Baginski TJ, Mobley JL. An adoptive transfer model of allergic lung inflammation in mice is mediated by CD4⁺CD62L^{low}CD25⁺ T cells. *J Immunol*. 1999 May 1;162(9):5592-600. PMID: 10228042
- Wjst M, Dold S. Genes, factor X, and allergens: what causes allergic diseases? *Allergy*. 1999 Jul;54(7):757-9. PMID: 10442534
- Wjst M, Kruse S, Illig T, Deichmann K. Asthma and IL-4 receptor alpha gene variants. *Eur J Immunogenet*. 2002 Jun;29(3):263-8. PMID: 12047364
- Wohlsen A, Uhlig S, Martin C. Immediate allergic response in small airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 May;163(6):1462-9. PMID: 11371419
- Xu H, Heeger PS, Fairchild RL. Distinct roles for B7-1 and B7-2 determinants during priming of effector CD8⁺ Tc1 and regulatory CD4⁺ Th2 cells for contact hypersensitivity. *J Immunol*. 1997 Nov 1;159(9):4217-26. PMID: 9379016

- Yamashita N, Takeno M, Kaneko S, Mizushima Y, Sakane T. Therapeutic effects of preferential induction of mite-specific T helper 0 clones. *Clin Exp Immunol.* 1997 Aug;109(2):332-41. PMID: 9276530
- Zeck-Kapp G, Kroegel C, Riede UN, Kapp A. Mechanisms of human eosinophil activation by complement protein C5a and platelet-activating factor: similar functional responses are accompanied by different morphologic alterations. *Allergy.* 1995 Jan;50(1):34-47. PMID: 7741187
- Zhang X, Boyar W, Toth MJ, Wennogle L, Gonnella NC. Structural definition of the C5a C terminus by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Proteins.* 1997 Jun;28(2):261-7. PMID: 9188742
- Zuiderweg ER, Fesik SW. Heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy of the inflammatory protein C5a. *Biochemistry.* 1989 Mar 21;28(6):2387-91. PMID: 2730871
- Zurawski SM, Chomarat P, Djossou O, Bidaud C, McKenzie AN, Miossec P, Banchereau J, Zurawski G. The primary binding subunit of the human interleukin-4 receptor is also a component of the interleukin-13 receptor. *J Biol Chem.* 1995 Jun 9;270(23):13869-78. PMID: 7775445
- Zurawski SM, Vega F Jr, Huyghe B, Zurawski G. Receptors for interleukin-13 and interleukin-4 are complex and share a novel component that functions in signal transduction. *EMBO J.* 1993 Jul;12(7):2663-70. PMID: 8101483
- Zureik M, Neukirch C, Leynaert B, Liard R, Bousquet J, Neukirch F; European Community Respiratory Health Survey. Sensitisation to airborne moulds and severity of asthma: cross sectional study from European Community respiratory health survey. *BMJ.* 2002 Aug 24;325(7361):411-4. PMID: 12193354
- Zwirner J, Gotze O, Begemann G, Kapp A, Kirchhoff K, Werfel T. Evaluation of C3a receptor expression on human leucocytes by the use of novel monoclonal antibodies. *Immunology.* 1999 May;97(1):166-72. PMID: 10447728

10. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
Abb	Abbildung
ADCC	Antikörper-abhängige Zellvermittelte Zelltoxizität (engl.: antibody dependent cellmediated cytotoxicity)
Ag	Antigen
AHR	Atemwegshyperreagibilität
Ak	Antikörper
ANOVA	Varrianz-Analyse (engl.: analysis of Variance)
APAAP	Alkalische Phosphatase-Ant-Alkalische Phosphatase
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
AR	Atemwegsreagibilität
BAL	Bronchoalveolarlavage
BDNF	engl.: brain-derived neurotrophic factor
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumin)
bzw	beziehungsweise
C	Konzentration (engl.: concentration)
C3a	Anaphylatoxin C3a
C3aR	Anaphylatoxin Rezeptor für C3a
C4a	Anaphylatoxin C4a
C5a	Anaphylatoxin C5a
C5aR	Anaphylatoxin Rezeptor für C5a
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCR	CC-Chemokinrezeptor
CCR1	<i>Chemokine CC-Motif Receptor 1</i>
CCR3	<i>Chemokine CC-Motif Receptor 3 (Eotaxin Rezeptor)</i>
CCR5	<i>Chemokine CC-Motif Receptor 5</i>
CD	Differenzierungscluster (engl.: Cluster Differentiation)
CD40L	CD40-Ligand
CGRP	engl.: calcitonin gene-related peptid
CVF	Cobra Venum Faktor
DC	Dendritische Zellen (engl: dendritic cells)

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl: Desoxyribonucleic acid)
DZ	Dendritische Zelle
EC ₅₀	Effektive MCh-Konzentration für 50%igen Abfall
ECP	<i>eosinophilic cationic protein</i>
ED ₅₀	Effektive MCh-Dosis für 50%igen Abfall
EDN	<i>Eosinophil Derived Neurotoxin</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl.: ethylenediaminetetraacetic acid)
EF ₅₀	Expiratorischer Fluss bei 50%igem Expirationsvolumen (Midexpiratory Flow)
ELISA	Enzym-gekoppelte Immunabsorptionsbestimmung (engl: enzym linked immunosorbent assay)
Eosinophile	Eosinophile Granulozyten, Leukozytenpopulation
EPO	<i>Eosinophil Peroxidase</i>
EPX	Eosinophilenperoxidase
Fab	antigenbindendes Fragment
Fc	<i>Fragment cristalisable</i> , der Teil des Immunglobulins, der die Effektorzellmobilisierung beeinflusst
FCS	fötales Kälberserum
FEV ₁	Forziertes Expirationsvolumen in der ersten Sekunde (engl.: <i>forced expiratory volume</i>)
FhG	Fraunhofer Gesellschaft
FITC	Fluoreszein Isothiocyanat
g	Gramm
ggf	gegebenen Falls
GM-CSF	Granulozyten und Makrophagen zellstimulierender Faktor (engl.: granulocyte monocyte colony stimulating factor)
	GTP Guadenosintriphosphat
h	Stunde (engl.: hour)
HCC-1	CC-Motiv Ligand 14
HSA	Humanserumalbumin
HUVEC	Humane umbilikale venöse Endothelzellen (engl.: human umbilical vein endothelial cells)
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal

i.t.	intratracheal
i.v.	intravenös
I-309	T-Zell-sezernierter Wachstumsfaktor, CC-Chemokin
i.d.R.	in der Regel
IFN	Interferon
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL-(X)	Interleukin (nach numerischer Nomenklatur)
Lsg.	Lösung
inh.	inhalativ
IP3	Inositolphosphat
JAK	Januskinase
KGW	Körpergewicht
L	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
M	Molarität
MAPK	MAP-Kinase
MBP	<i>major basic protein</i>
MCh	Acetyl- β -methylcholinchlorid
MCP	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
mg	Milligramm
MHC	engl.: major histocompatibility complex
min	Minute
MIP	<i>Monocyte inflammatory protein</i>
mL	Milliliter
MMAD	Median des Aerosoldurchmessers nach Massenverteilung (engl.: mass median aerosol diameter)
mol	molare Stoffmenge
MSA	Murines Serumalbumin
NaCl	Natriumchlorid
Neutrophile	Neutrophile Granulozyten
NGF	engl.: nerve growth faktor

NO	Stickstoffmonoxid
OCT	Tissue-Tek, (Polyvinylalkohol/Carbonwachs)
OD	optische Dichte
OVA	Ovalbumin (Hühnereiweiß)
PAF	<i>platelet activating factor</i>
PBMC	mononucleäre Zellen des peripheren Blutes (engl: peripheral blood mononuclear cells)
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PC ₂₀	Provokationskonzentration (z.B von Histamin), die einen 20% Abfall der FEV ₁ bewirkt
PDE	Phosphodiesterase
pg	Pikogramm
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasser- stoffionen-Konzentration (lat.: potentia Hydrogenii)
PKC	Proteinkinase C
PT	Pertussistoxin
raf	MAP Kinase-Kinase-Kinase der Säuger
RANTES	<i>regulated on activation normally T-cell expressed and secreted</i> , ein CC-Chemokin
ras	Superfamilie der monomeren GTPasen
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes (engl.: standard error of mean)
SLC	<i>secondary lymphoid-tissue chemokine</i>
src	Vogel-Sarkom-Virus, Onkogen/Kinase
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl: Side Scatter)
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TARC	<i>thymus and activation regulated chemokine</i>
TECK	Thymusexprimiertes Chemokin
Th1	T-Helferzelle Typ 1
Th2	T-Helferzelle Typ 2
T _H 2-Zelle	CD4-positiver T-Helfer-Lymphozyt des Typs 2
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNF- α	Tumornekrosefaktor α

TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
U	Einheit (engl.: unit)
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
vgl.	vergleiche
z.T.	zum Teil

11. Danksagungen

Für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit in der Abteilung Immunologie/Allergologie anfertigen zu können, danke ich Herrn Professor Norbert Krug.

Mein besonderer Dank für die umsichtige Betreuung meiner Doktorarbeit auf Natur- und Politik-Wissenschaftlichem Sektor gilt Dr. Braun.

Prof. Bausch danke ich dafür, ein spannendes Projekt ins Leben gerufen zu haben, dessen wissenschaftliche Bearbeitung mich stets erfüllte. Und besonders dafür, sich mir für meine Promotion als Korreferent zur Verfügung zu stellen.

Prof. Müller danke ich für die Betreuung meiner Promotion und seine stetige Hilfsbereitschaft.

Danken möchte ich auch meinen Ko-Betreuern Prof. Pabst und Prof. Gessner für ihre Unterstützung als wissenschaftliche Berater, die ich viel zu selten in Anspruch genommen habe.

Bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Tierhauses und den Abteilungen Klinische Chemie und der Aerosolphysik sowie der Werkstatt.

Besonders danke ich den Kollegen der Lungenfunktion Dr. Hoymann, Claudia Kelle, Regina Korolewitz und Michela Mälzer für ihre fachliche Unterstützung.

Ich danke den Kollegen in der Abteilung Immunologie, ganz besonders allen und insbesondere Sabine Schild, Olaf Macke, Emma Spies, Christina Nassenstein, Barbara Fuchs, Henning Weigt, Meike Müller, Tanja Arndt und Matthias Hecht für alles, was wir Zusammen erleben durften.

Meinen Freunden danke ich für die willkommenen und unwillkommenen Ablenkungen.

Danken möchte ich dem DFG, der mir durch die Bereitstellung eines Stipendium die Promotion ermöglicht hat.

Mein innigster Dank gilt meinen Eltern, Traute und Werner Bälder, die fundamental an der Existenz dieser Arbeit beteiligt sind, sowohl in genetischer Hinsicht aber vor allem durch ihre intensive Brutpflege und gewissenhafte Erziehung.

12. Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel "Die Bedeutung der Anaphylatoxine C3a und C5a im Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung " selbständig verfasst sowie alle benutzten Hilfsmittel und Institutionen vollständig angegeben habe. Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation nicht bereits als Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Hannover, August 2004




13. Lebenslauf


Name: Ralf Bälder

Geburtsdatum: 9. April 1971

Geburtsort: Nienburg / Weser

Wohnort: Silberstraße 22a
30 65 5 Hannover

 +49 (0)511 - 5 49 07 49
+49 (0)511 -5350 259

 baelder@isp.com
baelder@item.fraunhofer

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

Juli 1977 - Juni 1981: Grundschule Holtorf

August 1981 - Juli 1983: Orientierungsstufe Erichshagen

August 1983 - Juni 1987: Realschule Nienburg

August 1987- Juni 1991: Fachgymnasium Nienburg (Richtung: Elektrotechnik)

Abschluss: Abitur

Grundwehrdienst

Juli 1991 - Juni 1992: 3. Flarak-Geschwader 35, Nienburg

Praktika

August 1992: Architekturbüro Zöllner & Lose

Sep. 1992 - Feb. 1993: Bauunternehmen Quelhorst

Studium

März 1993 - August 1993: Bauingenieurwesen, Fachhochschule Nienburg

Sep. 1993 - März 2000: Biologie, Universität Hannover

Diplomarbeit: "Charakterisierung der LPS-induzierten Entzündungsreaktion im Modell der Sprague Dawley Ratte"
Fraunhofer Institut Hannover, Abt. Immunbiologie

Jobs

April 2000 – März 2001: Kraftfahrer bei der Deutschen Post AG
Aushilfskraft im Bereich: Sterilisations- und
Laborreinigungstechnik; Fraunhofer Institut Hannover,

Promotionsstudium

April 2001 – April 2004: Graduiertenkolleg 705 der MHH
„Die Bedeutung der Anaphylatoxine C3a und C5a
im Mausmodell der allergischen Atemwegsentszündung“
Fraunhofer Institut Hannover,
Abt. Immunologie Allergologie und klin. Inhalation