

Einfluss von Interleukin-4 auf die Pulmonale Sensibilisierung

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol. Markus Arnhold

geboren am 12.10.1979, in Großburgwedel

2012

Referentin: Dr. med. Anna-Maria Dittrich

Korreferent: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Schmiedl

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Anaclet Ngezahayo

Tag der Promotion: Freitag, der 06.07.2012

1.1 Kurzzusammenfassung

Asthma bronchiale als chronische Erkrankung der Atemwege stellt mit einer Prävalenz von 10% in der industrialisierten Welt eine globale ökonomische und klinische Belastung dar. Obwohl die Kenntnisse und die Therapiemöglichkeiten dieser atopischen Erkrankung der Atemwege sich in den letzten Jahren stark verbessert haben, sind viele Fragen zur Entstehung dieser Krankheit bisher ungeklärt.

In der vorliegenden Arbeit gehe ich diesen Fragen nach und untersuche die Wirkung von Interleukin-4 (IL-4) auf alveolare Typ 2 Epithelzellen (AECII) in der Sensibilisierungsphase *in vivo* und *in vitro*. Hierzu sensibilisierte ich Mäuse eines Toll-Like Rezeptor 4 (TLR4) -defizienten Mausstamms mit Ovalbumin (OVA) in Gegenwart von IL-4. In diesem Modell, das zu einer starken eosinophilenreichen T-Helferzellen Typ 2 (T_H2) -gerichteten Atemwegsentzündung führt, wurden AECII während der Sensibilisierungsphase durchflusszytometrisch isoliert und die differentielle Genexpression dieser Zellen mittels Microarray-Technologie und Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bestimmt. Durch diese Studien konnten Gene identifiziert werden, die bei der Etablierung eines „pro-inflammatorischen“ Phänotyps in der Lunge beteiligt sein können.

Zudem wurde die Wirkung von IL-4 auf AECII in einem *in vitro* Ko-Kultur-System untersucht. In diesem System kultivierte ich antigenpräsentierende Zellen zusammen mit T-Zellen, die einen OVA-spezifischen T-Zell Rezeptor tragen auf einer murinen Epithelzelllinie, die Charakteristika von AECII aufweist. Ich beobachtete, dass AECII eine kontaktvermittelte inhibitorische Wirkung auf die T-Zellaktivierung und T-Zellproliferation hatten. Diese Inhibition stand nicht im Zusammenhang mit einer Induktion des für regulatorische T-Zellen (T_{Reg}) charakteristischen Transkriptionsfaktor Forkhead Box P3 (FoxP3). Jedoch führte eine Behandlung der Epithelzelllinie mit IL-4 zu einer starken Verminderung der inhibitorischen Wirkung und einer Induktion des kostimulatorischen Moleküls Glucocorticoid-induced TNFR-related Protein Ligand (GITR-L).

Die hier aufgeführten Ergebnisse gewähren Einblicke in die Rolle von Epithelzellen bei pulmonalen Sensibilisierungen und zeigen den Einfluss von IL-4 auf diese Phase allergischer Erkrankungen. Die Erkenntnisse dieser Arbeit können als Anhaltspunkte für zukünftige Früherkennungsmaßnahmen dienen und die Entwicklung von Präventionsstrategien für atopische Erkrankungen, wie Asthma bronchiale fördern.

1.2 Abstract

Bronchial Asthma is considered a chronic disease of the airways. With a prevalence of 10% in the industrialized world, it represents an economical and clinical thread, worldwide. Although, the understanding and treatment strategies of asthma improved increasingly over the last years, we still need to learn more about the early phases of this atopic disease.

In the present thesis, I examined the influence of IL-4 on AECII during the sensitization phase, in vivo and in vitro.

For this purpose, I sensitized mice of a TLR4-deficient mouse strain for OVA in the presence of IL-4. In this model, characterized by an eosinophilic, T_H2-biased pulmonary inflammation, AECII were isolated. In these studies, several genes could be identified via Microarray-Technology and Real-Time PCR Analysis, which possibly promote “pro-inflammatory” processes in the lung.

Moreover, the influence of IL-4 on AECII was studied in an in vitro co-culture system. Antigen-presenting cells presenting OVA were co-cultivated together with antigen-specific t cells in the presence of a murine epithelial cell line, showing characteristics of AECII. In this system, I could observe a contact-mediated inhibitory effect of the epithelial cells on the t cell activation and proliferation. This effect was not associated to an induction of the T_{Reg}-characteristic transcription factor FoxP3. However, treatment with IL-4 attenuated the inhibitory effect of the epithelial cells and induced surface expression of the co-stimulatory molecule GITR-L.

My results grant new insights into the role of epithelial cells in pulmonary sensitization and show the influence of IL-4 on this phase of allergic diseases. The given findings contribute to the development of future strategies for early recognition and prevention of atopic diseases, like bronchial asthma.

2. Schlagwörter / Key Words:

Sensibilisierung, Epithelzellen, Asthma Bronchiale

Sensitization, Epithelial Cells, Bronchial Asthma

3. Inhaltsverzeichnis

1.1 Kurzzusammenfassung.....	3
1.2 Abstract	4
2. Schlagwörter / Key Words:	4
3. Inhaltsverzeichnis	5
4. Verzeichnisse.....	9
4.1 Abkürzungsverzeichnis	9
4.2 Tabellenverzeichnis	17
4.3 Abbildungsverzeichnis.....	18
5. Einleitung	20
5. Einleitung	20
5.1 Adaptive und angeborene Immunität	20
5.2 Allergie	20
5.2.1 Typ-I-Reaktionen.....	21
5.3 Asthma bronchiale	23
5.4 Sensibilisierungsphase einer Immunreaktion.....	24
5.4.1 T Zellpolarisierung	25
5.4.1.1 TH1 Zellen.....	25
5.4.1.2 TH2 Zellen.....	26
5.4.1.3 Regulatorische T Zellen.....	26
5.5 Effektorphase	28
5.6 Einfluss der Epithelzellen auf die pulmonale Sensibilisierung	30
5.7 Ziele der vorliegenden Arbeit	35
6. Material und Methoden	36
6.1 Material	36
6.1.1 Chemikalien.....	36
6.1.2 Geräte.....	38
6.1.3 Verbrauchsmaterial.....	39
6.1.4 Oligonukleotide	42
6.1.5 Antikörper.....	43
6.1.7 Enzymkonjugate	46

6.1.6 Lösungen und Medien	46
6.1.7 Kits.....	46
6.1.8 Versuchstiere	47
6.1.9 Software.....	47
6.2 Methoden	48
6.2.1 Molekularbiologische Methoden	48
6.2.1.1 Isolation von RNA.....	48
6.2.1.2 Synthese von komplementärer DNA (cDNA) durch Reverse Transkription von RNA ...	49
6.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	50
6.2.1.4 Relative Quantifizierung von Zielgenen mittels RealTime-PCR	51
6.2.1.5 Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	52
6.2.1.6 Herstellung eines Gesamt-Proteinextrakt aus tierischen Zellen	52
6.2.1.7 Proteinmengenbestimmung mit Bicinchinonsäure (BCA)-Kit.....	52
6.2.1.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	53
6.2.1.9 Western Blot	54
6.2.1.10 Mikroarrayanalyse	55
6.2.2 Zellkultur	56
6.2.2.1 Kultivierung primärer muriner Zellen und muriner Zelllinien	56
6.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von LA4 Zellen.....	56
6.2.2.3 Generierung von dendritischen Zellen aus murinem Knochenmark	57
6.2.2.4 Herstellung von Einzel-Zellsuspensionen aus murinen Lungen.....	57
6.2.2.5 Isolation von murinen Splenozyten	58
6.2.2.6 Zellzahlbestimmung vitaler Zellen	58
6.2.3 Immunologische Methoden	59
6.2.3.1 Anreicherung von CD4+ Primärzellen aus murinen Splenozyten.....	59
6.2.3.2 Anreicherung von antigenpräsentierenden Zellen aus murinen Splenozyten.....	60
6.2.3.3 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)	60
6.2.3.4 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung zur Isolation von AECII	62
6.2.3.7 Messung der T-Zell Proliferation	62
6.2.3.5 Nachweis von Zytokinen und Immunglobulinen mittels ELISA	63
6.2.4 Tierexperimentelle Methoden.....	65

6.2.4.1	Haltung und Behandlung von Versuchstieren	65
6.2.4.2	Betäubung durch Isofluran-Narkose	65
6.2.4.3	Tötung der Tiere	65
6.2.4.4	Intranasale Verabreichung von Antigen	65
6.2.4.5	Sensibilisierung und Provokation von C3H/HeJ Mäusen.....	66
6.2.4.6	Blutentnahme durch Punktion des Herzen.....	67
6.2.4.7	Spülung der Lunge mit PBS zur Gewinnung von bronchoalveolären Zellen (Bronchoalveolare Lavage)	67
6.2.4.8	Pappenheim-Färbung und Differenzierung von BALF-Zellen.....	68
6.2.4.9	Entnahme der Lungenflügel für die RNA-Isolation	68
6.2.4.10	Entnahme der Milz	68
6.2.5	Statistische Methoden.....	69
7.	Ergebnisse	70
7.1	Charakterisierung der „IL-4 abhängigen pulmonalen Sensibilisierung“	70
7.1.1	Infiltration von Eosinophilen in den Bronchoalveolarraum nach Sensibilisierung und Provokation mit OVA und IL-4.....	71
7.1.2	Induktion von Zyto- und Chemokinen nach Sensibilisierung und Provokation mit OVA und IL-4	73
7.1.4	Charakterisierung des BALF-Phänotyps in der Sensibilisierungsphase der „IL-4 abhängigen Sensibilisierung“	76
7.1.4.1	Eosinophile Granulozyten infiltrieren die BALF bereits während der Sensibilisierungsphase.....	76
7.1.4.1	Eosinophile Granulozyten infiltrieren die BALF bereits während der Sensibilisierungsphase.....	77
6.1.4.2	Die Expression des Eotaxin-2 Gens in der Sensibilisierungsphase wird durch IL-4 beeinflusst.....	79
7.2	Genexpressionsanalysen mittels Microarray von AECII während der Sensibilisierungsphase der IL-4 abhängigen Sensibilisierung	81
7.3	Wirkung von Alveolarepithelzellen Typ 2 ähnlichen LA4 Zellen auf die Aktivierung von TC 89	
7.3.1	LA4 Epithelzellen supprimieren die Proliferation von TC	89
7.3.2	LA4 Epithelzellen wirken über Zellkontakt auf die T-Zellaktivierung ein	93
7.3.3	LA4 Epithelzellen wirken auch in Kulturen von TC mit APC aus der Milz inhibitorisch auf die T Zellaktivierung	94
7.3.4	LA4 Epithelzellen beeinflussen den Aktivierungszustand von TC	96
7.3.5	LA4 Epithelzellen induzieren keine FoxP3+ T-Zellpopulation.....	101

7.4 Die Wirkung von AECII ähnlichen LA4 Epithelzellen auf T-Zellen kann durch Behandlung mit IL-4 beeinflusst werden	102
7.4.1 LA4 Zellen bilden CD124 mRNA und Protein	102
7.4.2 Die Behandlung mit IL-4 schwächt die inhibitorische Wirkung von Epithelzellen auf die T-Zellproliferation ab	104
7.4.3 LA4 Epithelzellen werden durch geringste Mengen IL-4 beeinflusst	105
7.4.4 IL-4 verändert die Expression von kostimulatorischen Proteinen auf der Oberfläche von LA4 Epithelzellen	106
8. Diskussion	109
8.1 TLR-unabhängiges Sensibilisierungsmodell	110
8.2 Ko-Kultur-System	117
8.3 Zusammenfassung	120
9. Literaturangaben	122
10. Erklärung	138
11. Danksagung	139
12. Lebenslauf	141

4. Verzeichnisse

4.1 Abkürzungsverzeichnis

®	Registered
°C	Grad Celsius
µg	Microgramm
AECL	Alveolarepithelzelle Typ 1
AECII	Alveolare Typ 2 Epithelzellen
AHR	Atemwegshyperreagibilität
APC	Allophycocyanin, Antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Atf3	Activating transcription factor 3
BAL	Bronchoalveolare Lavage
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl10	B-cell leukemia/lymphoma 10
BD	Becton Dickinson
BSA	Bovines Serum Albumin
BTLA	B- and T-Lymphocyte Attenuator
bzw.	beziehungsweise
CCL20	C-C motif ligand 20
Ccl9	C-C Chemokinligand 9
CCR3	C-C chemokine receptor 3

Ccr11	C-C Chemokinrezeptor-like 1
cDNA	komplementäre DNA
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Esther
Chi313	Chitinase 3-like 3
Clec4a2.....	C-type lectin domain family 4, member a2
Clec4a3.....	C-type lectin domain family 4, member a3
cm ²	Quadratzenimeter
CO ₂	Kohlendioxid
COPD	Chronical obstructive pulmonary disease
cRNA.....	komplementäre RNA
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
Cxcl-2	C-X-C Chemokinligand 2
Cxcl-3	C-X-C Chemokinligand 3
Cxcl-5	C-X-C Chemokinligand 5
Cxcr4	C-X-C Chemokinrezeptor 4
DAPI.....	4', 6-Diamin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zelle
DIG.....	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleotide Acid
DNase	Desoxyribonukleotid Endonuklease
dNTP	Desoxynukleotriphosphate, Desoxyribonukleotidphosphate
ECL	Elektrochemische Lumineszenz

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR.....	Epidermal Growth Factor Receptor
Fabp1	Fatty acid binding protein 1
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fötales Bovines Serum
Fcε	Fc-Fragment des Immunglobulin E
Fcεr2a	Fc epsilon receptor II
FCS	Fötales Kälber Serum
Fetub.....	Fetuin beta
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FosB	Fosfomycin resistance protein
FoxP3	Forkhead Box P3
FXYP4	FXYP domain-containing ion transport regulator 4
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA-3	GATA Binding Protein 3
GITR-L.....	Glucocorticoid-induced TNFR-related Protein Ligand
GmbH.....	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GM-CSF.....	Granulocyte and Monocyte-Colony Stimulating Factor
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
HEPES.....	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
Hsp1	Heat shock protein 1

HZI Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung

i.n..... intranasal

ICOS-L.....inducible T-cell co-stimulator ligand

IFN- γ Interferon gamma

IgE Immunglobulin E

Igfbp4Insulin-like growth factor binding protein 4

IgG.....Immunglobulin G

IL-10..... Interleukin-10

IL-12..... Interleukin-12

IL-13..... Interleukin-13

IL-1F9..... Interleukin-1F9

IL-2..... Interleukin-2

IL-33..... Interleukin-33

IL-4..... Interleukin-4

IL4i1 Interleukin-4 induced 1

IL-5..... Interleukin-5

IL-6..... Interleukin-6

IL-8..... Interleukin-8

Inc..... Incorporated

KHCO₃ Kaliumhydrogencarbonat

L Liter

Lemd1..... LEM domain containing 1

LPSLipopolysaccharid

M	Molar
Malt1	Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1
Mat2a.....	Methionine adenosyltransferase II alpha
MFI.....	Mittlere Fluoreszenzintensität
mg.....	Milligramm
MHC.....	Major Histocompatibility Complex
MHC II.....	Major Histocompatibility Komplex Klasse 2
Mip1 α	Macrophage inflammatory protein 1 alpha
ml.....	Milliliter
mL	Milliliter
mM	Millimolar
Myd88	Myeloid Differentiation 88
N.....	Normalität
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NaCl	Natriumchlorid
NaF.....	Natriumfluorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaN ₃	Natriumazid
Nfkbie.....	NF-kappa-B inhibitor epsilon
ng.....	Nanogramm
NH ₄ CL.....	Ammoniumchlorid
nm.....	Nanometer

NOD	Nucleotide-Binding Oligomerization Domain
Nox01	NADPH oxidase organizer 1
O ₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PBS.....	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	Programmed Death 1
PD-L	Programmed death 1 ligand
PD-L1	Programmed Death Ligand 1
PD-L2	Programmed death 1 ligand 2, Programmed death ligand 2
PE	Phycoerythrin
PFA.....	Paraformaldehyd
Pglyrp1	Peptidoglycan recognition protein 1
Pigr	Polymeric immunoglobulin receptor
PPAR.....	Peroxisomen proliferator-activated receptor
PRR	Pattern Recognition Receptor
RANTES	Regulated upon activation normal t-cell expressed and presumably secreted
RNA	Ribonucleotide Acid
RNase	Ribonukleotid Endonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSV	Respiratory-Syncytial-Virus

s.u.	siehe unten
SDS.....	Natrium-Dodecyl-Sulfat
Slc26a4.....	Solute carrier family 26, member 4
Slc6a20a.....	solute carrier family 6, member 20A
STAT1.....	Signal Transducer and Activator of Transcription 1
STAT5.....	Signal Transducer and Activator of Transcription 5
STAT6.....	Signal Transducer and Activator of Transcription 6
TAE.....	Tris-Acetat-EDTA
TARC ...	Thymus- and Activation-Regulated Chemokine, Thymus and activation-regulated chemokine
T-bet.....	T-cell specific T Box Transcription Factor
TC.....	T-Zellen
TCR.....	T-cell receptor, T Zellrezeptor
TGF- β	Transforming growth factor β
T _H 1.....	T Helferzellen des Typ 1
T _H 2.....	Typ 2 T Helferzellen, T-Helferzellen Typ 2
TLR3.....	Toll-like Rezeptor 3
TLR4.....	Toll-Like Rezeptor 4
TMB.....	Tetramethylbenzidin
Tnfrsf9.....	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
T _{Reg}	Regulatorische T-Zellen
TSLP.....	Thymal Stromal Lymphopoeitin
™.....	Trademark

U Unit
u.a. unter anderem
UK Vereinigte Königreiche
Upm..... Umdrehungen pro Minute
USA..... Vereinigte Staaten von Amerika
UV Ultraviolett
V Volt
VCAM-1..... Vascular cell adhesion molecule 1
z.B. zum Beispiel
 $\Delta\Delta CT$ Delta-Delta Cycle_{Threshold}

4.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien	38
Tabelle 2: Verwendete Geräte	39
Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmittel.....	41
Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide.....	42
Tabelle 5: Verwendete Antikörper	45
Tabelle 6: Verwendete Isotypkontrollen	45
Tabelle 7: Verwendete Enzymkonjugate.....	46
Tabelle 8: Verwendete Medien und Lösungen.....	46
Tabelle 9: Verwendete Kits.....	47
Tabelle 10: Verwendete Versuchstiere.....	47
Tabelle 11: Verwendete Software	47
Tabelle 12: Auflistung der in der Literatur beschriebenen 2-fach regulierten Gene	84
Tabelle 13: Auflistung der in der Literatur wenig beschriebenen 2-fach regulierten Gene	87
Tabelle 14: Versuchsansätze für die in vitro Ko-Kultur.....	91

4.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Sensibilisierung und Provokation von C3H/HeJ Mäusen	67
Abbildung 2: Zellzahlen und –differenzierung in der bronchoalveolären Lavage (BAL)	72
Abbildung 3: Realtime PCR Analyse der Genexpression von Zytokinen und Chemokinen in der Lunge	74
Abbildung 4: Bestimmung der antigenspezifischen IgE Antikörper im Blutserum.....	75
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Sensibilisierung und Provokation von C3H/HeJ Mäusen	76
Abbildung 6: Zelldifferenzierung in der BALF zu verschiedenen Zeitpunkten während der Sensibilisierungsphase.....	78
Abbildung 7: Bestimmung der relativen Eotaxin-2 Genexpression während der Sensibilisierungsphase	80
Abbildung 8: : Schematische Darstellung der 2-fach regulierten Gene aus der Microarrayanalyse	82
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Genexpression von 10 Sequenzen des Microarray	83
Abbildung 10: Bestimmung der relativen Genexpression von 30 in der Microarrayanalyse identifizierten Zielsequenzen, die eine mindestens 2-fach differenzielle Genexpression zeigten	88
Abbildung 11: Schematische Darstellung des in vitro Ko-Kultursystems	90
Abbildung 12: T-Zellproliferation in der Ko-Kultur.....	92
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Ko-Kulturansätze mit Transwelleinsätzen.....	93
Abbildung 14: T Zellproliferation in Ko-Kulturen mit Transwelleinsätzen	94

Abbildung 15: Vergleich der T-Zellproliferation von Ko-Kulturen mit APC aus der Milz versus knochenmarkgenerierten DC.....	95
Abbildung 16: Modulation der Expression von CD44 und CD62L auf CD4+ Zellen durch APC und LA4 Epithelzellen.....	98
Abbildung 17: Modulation der Expression von CD25 und CD69 auf CD4+ Zellen durch APC und LA4 Epithelzellen.....	100
Abbildung 18: Modulation der Expression von FoxP3 in CD4+ Zellen durch APC und LA4 Epithelzellen.....	102
Abbildung 19: Nachweis der IL-4 Rezeptor α Untereinheit (CD124) in LA4 Zellen auf mRNA und Proteinebene	103
Abbildung 20: Effekt von IL-4 auf die LA4-abhängige Suppression der T-Zellproliferation.	105
Abbildung 21: Dosisabhängigkeit der Effekte von IL-4 auf die LA4-abhängige Inhibition der T-Zellproliferation.....	106
Abbildung 22: Expression von 4-1BB-L, CD80, MHCII, GITR-L und PD-L durch mit IL-4 behandelte LA4 Zellen	107

5. Einleitung

5.1 Adaptive und angeborene Immunität

Das Immunsystem der höheren Lebewesen ist ein Abwehrsystem zum Schutz gegen schädliche Mikroorganismen und Substanzen, wie z.B. schädliche körpereigene Zellen, Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten.

In Vertebraten unterscheidet man zwei verschiedene Teile des Immunsystems. Die Zellen des **angeborenen (innaten)** Immunsystems gewähren sofortigen Schutz gegenüber einer Vielzahl von Krankheitserregern. Die Erkennungsmechanismen, mit denen diese Zellen Krankheitserreger erkennen, sind jedoch sehr unspezifisch und können nur auf allgemeine Muster reagieren, die auf vielen Erregern zu finden sind.

Die spezifischen Reaktionen auf Mikroorganismen und Erreger erfolgen über das **erlernte (adaptive)** Immunsystem. Bei der adaptiven Immunität werden pathogen-spezifische Proteine, Antigene genannt, erkannt und eine gerichtete Immunantwort zur Bekämpfung des Pathogens, die durch Bildung von „Gedächtniszellen“ in einem langen Schutz vor dem Erreger resultiert, vermittelt. Da das adaptive Immunsystem jedoch einige Zeit zur Etablierung einer Immunantwort benötigt, können Infektionen nicht sofort bekämpft werden, wie es durch die angeborene Immunreaktion möglich ist. Beide Teile des Immunsystems zusammen schützen den Organismus bestmöglich vor schädlichen und tödlichen Infektionen. Doch unter bestimmten Bedingungen kann das Immunsystem selbst zur Gefahr werden und schädliche Effekte auf den Körper ausüben. Neben Autoimmunerkrankungen zählen die Allergien zu den Krankheitsbildern, die auf eine Fehlfunktion des Immunsystems zurückzuführen sind.

5.2 Allergie

Unter bestimmten Umständen kann das Immunsystem Abwehrreaktionen gegen ungefährliche Substanzen, wie Pollen oder Nahrungsmittel einleiten. Diese Reaktionen des Immunsystems gegen ein harmloses Antigen, ein Allergen, wird als Hypersensibilität oder Überempfindlichkeit bezeichnet und in 4 Typen eingeteilt (Gell und Coombs 1963):

Nach Coombs und Gell werden die Typ-I-Reaktion (Soforttyp) durch zellständige Immunglobuline des Typ E (IgE) vermittelt, während Typ-IV-Reaktionen (Spättyp) zellvermittelt über T-Helferzellen vermittelt ablaufen. Die Typ-IV-Reaktionen lassen sich in drei Untergruppen einteilen (siehe unten),

die durch die beteiligten T-Helferzellen charakterisiert werden. Die häufigsten allergischen Erkrankungen in der westlichen Welt, die atopische Dermatitis, die allergische Rhinitis, das Asthma bronchiale und der anaphylaktische Schock werden durch Typ-I- und Typ-IV-Reaktionen nach Coombs und Gell hervorgerufen.

Typ-II und Typ-III-Reaktionen werden durch Immunglobuline des Typ G (IgG) vermittelt, die zellgebundene oder lösliche Antigene erkennen und Fresszellen oder das Komplementsystem des angeborenen Immunsystems aktivieren. Für die vorliegende Arbeit sind diese beiden Reaktionen nicht relevant und werden im Weiteren daher nicht weiter diskutiert.

In Abhängigkeit von der Definition zeigen in der westlichen industrialisierten Welt 20-60% der Bevölkerung eine Tendenz zur Typ I Überempfindlichkeit nach Coombs und Gell (Pearce et al., Thorax 1999). Diese Menschen werden als atopisch bezeichnet und haben eine gesteigerte Tendenz an atopischer Dermatitis, allergischer Rhinitis und/oder Asthma bronchiale zu erkranken.

5.2.1 Typ-I-Reaktionen

Die Typ-I-Hypersensibilität wird durch IgE vermittelt. IgE-Antikörper befinden sich gebunden an einen Fcε-Rezeptor auf der Oberfläche von residenten Mastzellen in den peripheren Geweben (Geha et al., Nat.Rev.Immunol. 2003). Durch Kontakt mit dem Antigen werden die Rezeptor-Antigen-Komplexe quervernetzt und die Mastzelle wird aktiviert, so dass chemische Mediatoren wie Histamin, Prostaglandine und Leukotriene freigesetzt werden (Turner and Kinet, J. P., Nature 1999). Diese Sofortreaktion wird auch als Frühphase einer allergischen Reaktion bezeichnet und verursacht eine Zunahme der Gefäßdurchlässigkeit und führt zur Kontraktion der glatten Muskulatur. Nach acht bis zwölf Stunden können bei etwa der Hälfte der Patienten, die eine Sofortreaktion zeigen, eine Spätreaktion oder Spätphase auftreten. Hierbei werden neu synthetisierte Leukotriene, Zytokine und Chemokine von den Mastzellen freigesetzt, was zur Spätphase/-reaktion einer allergischen Reaktion führt. Für die Spätphase einer allergischen Reaktion, die nach 12 bis 16 Stunden auftritt, werden durch Chemokine wie Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), Eotaxin, Regulated upon activation normal t-cell expressed and presumably secreted (RANTES), Interleukin-8 (IL-8) oder Macrophage inflammatory protein 1 alpha (Mip1α) (Kaplan et al., Exp.Dermatol. 1995; Kramer et al., Am.J.Otolaryngol. 2006) weitere Leukozyten, wie Eosinophile und Typ-2-Helferzellen in die entzündeten Gewebe rekrutiert, so dass die Entzündungsreaktion verstärkt wird.

Dies führt zu Ödemen, Hypertrophie und Hyperplasie am Entzündungsherd.

5.2.2 Typ-IV-Reaktionen

Interagieren Allergene direkt mit T-Effektorzellen, führt dies zu Überempfindlichkeitsreaktionen des Typ-IV. Drei Subtypen an Typ-IV-Antworten, werden nach den beteiligten T-Zellen (TC) unterschieden (Pichler, Ann.Intern.Med. 2003), je nach Beteiligung von T-Helferzellen des Typ 1 (T_H1)-, T_H2 - oder zytotoxischen T-Zellen. So können zell-assoziierte Antigene Typ-IV-Reaktionen auslösen, an der zytotoxische T-Lymphozyten beteiligt sind. Lösliche Antigene können T_H1 -Zellen aktivieren, die über die Interaktion mit Makrophagen zu Gewebeschäden führen. Bei atopischen Erkrankungen, wie der allergischen Rhinokonjunktivitis und dem Asthma bronchiale treten vor allem Reaktionen auf, bei denen T_H2 -Zellen eine zentrale Rolle spielen (Busse and Lemanske, R. F., Jr., N.Engl.J.Med. 2001; Kay, N.Engl.J.Med. 2001a; Kay, N.Engl.J.Med. 2001b; Robinson et al., N.Engl.J.Med. 1992). Diese Zellen entwickeln sich im Rahmen von allergischen Reaktionen während der Sensibilisierungsphase (s. u.) durch ein komplexes Zusammenspiel von antigenpräsentierenden Zellen, Chemo- und Zytokinen. Werden solche T_H2 -Zellen durch Antigenkontakt aktiviert, führen sie durch ihre Mediatoren IL-4, Interleukin-5 (IL-5) und Interleukin-13 (IL-13) zu einer charakteristischen Immunreaktion: durch IL-4 erfolgt der Immunglobulinklassenwechsel der B-Zellen zur Bildung von IgE (Stavnezer, Curr.Opin.Immunol. 1996). Durch IL-5 erfolgt eine verstärkte Bildung und Rekrutierung von Eosinophilen in das entzündete Gewebe (Sanderson, Blood 1992). IL-13 spielt eine zentrale Rolle für die Produktion von Mukus und die Atemwegshyperreaktivität.(Wills-Karp, J.Allergy Clin.Immunol. 2001). Eosinophile, die in das entzündete Gewebe rekrutiert und dort aktiviert werden, geben dort, ähnlich wie Mastzellen, zytotoxische und inflammatorische Mediatoren in die Umgebung ab. Mastzellen nehmen durch die Sekretion von Mediatoren, wie Histamin, Serin-Proteasen und Proteoglykane (Metcalf et al., Physiol Rev. 1997; Williams and Galli, S. J., J.Allergy Clin.Immunol. 2000) in der Frühphase von allergischen Erkrankungen eine zentrale Stellung ein. Eosinophile hingegen vermitteln in der Spätphase von allergischen Reaktionen die meisten klinischen Symptome, wie Juckreiz, Rhinorrhoe, Bronchospasmen, Mukussekretion, und Ödeme in den Atemwegen (Bloemen et al., Immunol.Lett. 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde der „asthmatische Phänotyp“ eines Mausmodells durch Analyse von antigenspezifischem IgE und Eosinophilie in den Atemwegen charakterisiert, zwei klassische Merkmale einer Typ-I- bzw. Typ-IV-Reaktion.

5.3 Asthma bronchiale

Mit einer Prävalenz von mehr als 10% in Ländern der industrialisierten Welt und einer steigenden Zahl an Erkrankungen in Entwicklungsländern stellt allergisches Asthma eine weltweite klinische und ökonomische Belastung dar. In West-Europa sind fast 30 Millionen Individuen an Asthma bronchiale erkrankt, wobei die Prävalenzrate sich zwischen 1994 und 2004 verdoppelt hat (Masoli et al., *Allergy* 2004). Obwohl das Verständnis der Krankheit sich in den letzten Jahren stark verbessert hat, sind die Gründe für die steigende Prävalenz noch nicht abschließend geklärt. Neben genetischen Prädispositionen (March et al., *Discov.Med.* 2011) scheinen Umwelteinflüsse (Arruda et al., *Curr.Opin.Allergy Clin.Immunol.* 2005; D'Amato et al., *Clin.Exp.Allergy* 2005), wie der Kontakt zu Umweltverschmutzung, Mikroorganismen oder Allergenen, Einfluss auf das Asthmarisiko zu haben. In der Langfassung der nationalen Versorgungsleitlinie: Asthma aus dem Jahre 2011 wird die Krankheit als eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege beschrieben, die charakterisiert wird durch eine bronchiale Hyperreagibilität und eine variable Atemwegsobstruktion (Bundesärztekammer (BÄK) et al. 2011). In Deutschland leiden 5% der Erwachsenen an Asthma bronchiale und bei Kindern ist die Zahl mit 10% sogar noch höher. So dass Asthma als häufigste chronische Erkrankung im Kindesalter angesehen werden kann.

Das allergische Asthma wird durch andere allergische Erkrankungen, vor allem die saisonale Rhinokonjunktivitis beeinflusst. Die allergische Rhinokonjunktivitis hat einen Effekt auf die Zahl der Asthma-Neuerkrankungen (Pallasaho et al., *Respir.Med.* 2011). Sie erhöht obwohl sie die oberen Atemwege betrifft die Asthmaprävalenz und beeinflusst den Verlauf des Asthma (Brito et al., *Rev.Port.Pneumol.* 2009; Ibanez et al., *J.Investig.Allergol.Clin.Immunol.* 2010; Sole et al., *Clinics.(Sao Paulo)* 2011). Ein wichtiger Schritt in der Pathophysiologie der asthmatischen Erkrankung stellt hierbei die Verbreitung der Entzündung auf die unteren Atemwege dar. Dieser Schritt wird auch als „Etagenwechsel“ beschrieben und bezeichnet die Entzündung der luftführenden bronchialen Atemwege, wie auch des Lungenparenchyms, wo in den Alveolen der Sauerstoff/Kohlendioxid-Gasaustausch stattfindet. Die inflammatorischen Veränderungen der distalen Atemwege stellen charakteristische Veränderungen beim Asthma bronchiale dar. Sowohl die vermehrte Zahl an aktivierten Eosinophilen im Lungenparenchym von Asthmatikern im Vergleich zu Nicht-Asthmatikern (Hamid et al., *J.Allergy Clin.Immunol.* 1997), wie auch die erhöhten Konzentrationen des T_H2 -Zytokins IL-5 in diesen Regionen der Lunge (Minshall et al., *J.Allergy Clin.Immunol.* 1998) belegen die Bedeutung der inflammatorischen Prozesse im Alveolarraum. Atemwegsobstruktionen treten häufig in den „kleinen“ Atemwegen auf und die Produktion verschiedener T_H2 -Zytokine, Chemokine und Mediatoren tragen zur Aufrechterhaltung der Entzündung in diesem Bereich der Lunge bei (Tulic and Hamid, Q., *Clin.Chest Med.* 2006).

Für die Entwicklung und das Voranschreiten des allergischen Asthma spielen Allergien, respektive Sensibilisierungen eine wichtige Rolle, so zeigen klinische Untersuchungen einen eindrücklichen Zusammenhang zwischen einer bereits bestehenden allergischen Sensibilisierung und der Entwicklung von weiteren Sensibilisierungen: mono-sensibilisierte Patienten haben eine deutlich erhöhte Wahrscheinlichkeit weitere Sensibilisierungen zu entwickeln (Des Roches et al., *J.Allergy Clin.Immunol.* 1997; Purello-D'Ambrosio et al., *Clin.Exp.Allergy* 2001). Letztlich kann dieses erhöhte Risiko zur Polysensibilisierung führen, das heißt der Sensibilisierung gegenüber einer Vielzahl von Allergenen. Dabei ist die Polysensibilisierung überproportional häufig bei Patienten mit schwerem Asthma zu finden und führt zu verstärktem Medikamentengebrauch und schlechterer Lebensqualität (Cirillo et al., *Ann.Allergy Asthma Immunol.* 2005). Die immunologischen Vorgänge, die die Sensibilisierung erleichtern und dadurch zur Polysensibilisierung führen können, sind bisher kaum verstanden. Ein tiefer greifendes Verständnis ist jedoch von herausragender Wichtigkeit, um die Entwicklung und Risikofaktoren für die Entwicklung eines schweren Asthmas zu verstehen.

5.4 Sensibilisierungsphase einer Immunreaktion

Ungleich der Abwehrmechanismen durch das angeborene Immunsystem kann das adaptive Immunsystem nicht sofort mit Abwehrmaßnahmen durch Effektorzellen auf ein Antigen oder Pathogen reagieren. So teilt sich die adaptive Immunreaktion in zwei Phasen auf, der Sensibilisierungsphase und der Effektorphase.

Die Sensibilisierungsphase geschieht zum Zeitpunkt des ersten Kontakts mit einem Antigen. In dieser Phase wird das Antigen von dendritischen Zellen (DC) in den peripheren Geweben des Organismus aufgenommen und über das Lymphsystem in die regionalen Lymphknoten transportiert (De Smedt et al., *J.Exp.Med.* 1996). Auf dem Weg zwischen Gewebe und lymphatischen Organ differenziert die DC zu einer professionellen antigenpräsentierenden Zelle (APC), die mit Antigen beladene Major Histocompatibility Komplex Klasse 2 (MHC II) Moleküle und kostimulatorische Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimiert (De Smedt et al., *J.Exp.Med.* 1996). Neben der Aufnahme und Prozessierung eines Antigens muss für die Migration in die Lymphknoten und die Reifung der DC auch ein „Gefahrensignal“ für die Aktivierung der DC vorhanden sein. Dieses Signal erfolgt durch pattern recognition receptors, den PRR's, die Pathogen-associated molecular pattern (PAMP)s erkennen (Janeway, Jr., *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 1989; Janeway, Jr. and Medzhitov, R., *Annu.Rev.Immunol.* 2002). Diese Rezeptoren, zu denen u.a. die Toll-like Rezeptoren (TLR) gezählt werden, erkennen Bestandteile von pro- und eukaryothischen Pathogenen, wie Peptidoglykane, Flagellin, Lipoteichonsäuren oder Lipopolysaccharide, aber auch intrazelluläre Ribonukleinsäure (RNA)- oder Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Moleküle, wie sie für die meisten RNA- und DNA-

Viren typisch sind. Studien in Mausmodellen zeigten z.B., dass für eine inhalative Sensibilisierung, neben der Erkennung des Antigens/Allergens über den T-Zellrezeptor (TCR), Signale des angeborenen Immunsystems über TLRs benötigt werden (Eisenbarth et al., J.Exp.Med. 2002; Piggott et al., J.Clin.Invest 2005). Unter bestimmten Bedingungen können diese essenziellen Signale des angeborenen Immunsystems jedoch auch durch andere Mediatoren, wie z.B. IL-4 umgangen werden (Dittrich et al., J.Immunol. 2008).

Wenn die DC in der T-Zell-Zone der drainierenden Lymphknoten angekommen ist, binden TC mit einem antigenspezifischen TCR das Antigen. Für eine erfolgreiche Aktivierung muss die TC auf ihrer Oberfläche Liganden von kostimulatorischen Molekülen exprimieren, die durch DC exprimiert werden. Zudem müssen die TC über den Ko-Rezeptor CD4 oder CD8 verfügen. Wenn nicht alle diese Bedingungen erfüllt werden, wird die T Zelle nicht aktiviert und geht in einen nicht aktivierbaren Zustand über, der als Anergie bezeichnet wird. Die aktivierten TC schütten Interleukin-2 (IL-2) aus, ein Zytokin, das Wachstum und Differenzierung fördert (Appleman et al., J.Immunol. 2000; Thompson et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1989). Die antigenspezifischen TC proliferieren und differenzieren zu Effektorzellen (Gudmundsdottir et al., J.Immunol. 1999). TC mit dem Ko-Rezeptor CD8 entwickeln sich zu zytotoxischen T Effektorzellen. TC mit dem Ko-Rezeptor CD4 entwickeln sich zu unterschiedlich polarisierten T-Helferzellen mit verschiedenen, spezialisierten Funktionen (Murphy and Stockinger, B., Nat.Immunol. 2010).

5.4.1 T Zellpolarisierung

Die Differenzierung in verschiedene Untergruppen von CD4⁺ T Effektorzellen mit unterschiedlichen Funktionen ist abhängig vom umgebenden Zytokinmilieu und führt zur Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren: T-cell specific T-box transcription factor (T-bet) bei T_H1, GATA Binding Protein 3 (GATA-3) bei T_H2 und FoxP3 bei T_{Reg}. Diese transkriptionellen Signale initiieren und verstärken die Differenzierung in den assoziierten T-Zelltyp.

5.4.1.1 T_H1 Zellen

In Anwesenheit von Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukin-12 (IL-12) entwickeln sich T_H1-Zellen (Szabo et al., Annu.Rev.Immunol. 2003). Phosphorylierung von Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) führt zur Expression des Transkriptionsfaktors T-Bet, so dass die TC IFN- γ und eine Untereinheit des IL-12 Rezeptors produziert (Murphy and Reiner, S. L., Nat.Rev.Immunol. 2002; Szabo et al., Annu.Rev.Immunol. 2003). Die Sekretion von IFN- γ ist das „Leitzytokin“ einer T_H1-Zelle, die aber auch andere Zytokine produzieren kann, wie z.B. IL-2 und

Tumor necrosis factor alpha (TNF- α). Die Hauptaufgaben von T_H1 Zellen liegen in der Abwehr von intrazellulären Erregern.

5.4.1.2 T_H2 Zellen

Das Zytokin IL-4 vermittelt antagonistisch zu IFN- γ /IL-12 die Entwicklung zu T_H2-Zellen (Parronchi et al., J.Immunol. 1992). Durch die Interaktion zwischen IL-4 und seinem Rezeptor wird Signal Transducer and Activator of Transcription 6 (STAT6) phosphoryliert, wodurch GATA-3 aktiviert wird, dem wichtigsten Transkriptionsfaktor für die Produktion von T_H2 Zytokinen, wie IL-4, IL-5, Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10) und IL-13. Zusammen mit aktiviertem Signal Transducer and Activator of Transcription 5 (STAT5) induziert GATA-3 die endogene Produktion von IL-4, so dass die Differenzierung in T_H2-Zellen gleichzeitig eingeleitet und aufrechterhalten wird (Kurata et al., Immunity. 1999; Zhu et al., J.Immunol. 2001; Zhu et al., Immunity. 2003; Zhu et al., Nat.Immunol. 2004; Zhu et al., Cell Res. 2006). IL-4, dessen Effekte auf Epithelzellen zentraler Gegenstand der hier vorliegenden Arbeit sind, stellt dabei das „Leitzytokin“ einer T_H2-polarisierten Immunreaktion dar. IL-4 steuert nicht nur die Differenzierung der T_H2-Zellen, sondern wird auch in der Effektorphase sezerniert. In der Effektorphase hat IL-4, neben der weiteren Differenzierung naiver TC zu T_H2-polarisierten Effektorzellen zusätzliche Funktionen, die weiter unten beschrieben werden. T_H2-abhängige Abwehrmechanismen dienen vor allem dem Schutz vor Parasitenbefall. T_H2-Zellen nehmen dabei eine zentrale Rolle bei der Vermittlung von humoralen Immunantworten ein, da sie die Differenzierung von B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen fördern und einen Klassenwechsel vermitteln, so dass IgE Antikörper gebildet werden (Del Prete et al., J.Immunol. 1988). Wie bereits beschrieben, wirken T_H2-Zellen auch auf Zellen des angeborenen Immunsystems, wie basophile oder eosinophile Granulozyten, die an der Abwehr von Mikroorganismen und multizellulären Organismen beteiligt sind. Die Rekrutierung und Aktivierung dieser Effektorzellen ermöglicht die schnelle und gezielte Bekämpfung von Parasiten, verursacht aber im Zusammenhang mit allergischen Reaktionen erhebliche Gewebeschäden.

5.4.1.3 Regulatorische T Zellen

In den letzten Jahren ist die Zahl der bekannten T-Helfer Subtypen deutlich angewachsen. Von diesen wird im Folgenden noch die Gruppe der regulatorischen TC eingeführt, da diese Gruppe bei pulmonalen allergischen Reaktionen eine wichtige Rolle bei der Induktion von Toleranz spielt. Neben den T-Effektorzellen, die Immunantworten aktiv initiieren, gibt es auch Effektorzellen, die Immunantworten reduzieren oder beenden. Diese regulatorischen TC wurden zuerst im Kontext von Autoimmunerkrankungen beschrieben, bei denen diese Zellen eine Immunreaktion gegenüber körpereigenem Gewebe verhindern (Falkoff and Scavulli, J. F., Ann.Intern.Med. 1978). Inzwischen ist

bekannt, dass T_{Reg} eine zentrale Rolle bei der Drosselung einer Vielzahl von Immunantworten spielen, zu denen auch allergische Reaktionen in den Atemwegen gehören (Chen et al., Science 1994).

Verschiedene Untergruppen T_{Reg} wurden inzwischen beschrieben: Natürliche T_{Reg} stellen eine CD4⁺ CD25⁺ Population von TC dar, die eine hohe Oberflächenexpression von L-Selektin aufweisen (Fu et al., Am.J.Transplant. 2004; Venturi et al., J.Immunol. 2007). Sie werden im Thymus durch die Bindung von MHCII Molekülen, die körpereigene Peptide präsentieren, selektioniert. Diese T_{Reg} machen 5 – 10 % der CD4⁺ T Zellen eines Organismus aus (Sakaguchi et al., J.Immunol. 1995) und produzieren unter dem „Leit-, Transkriptionsfaktor „FoxP3“ hohe Mengen von IL-10 und Transforming growth factor β (TGF- β). Während IL-10 Einfluss auf die Expansion von peripheren CD4⁺ TC hat (Annacker et al., J.Immunol. 2001) inhibiert TGF- β die Produktion von Zytokinen und die Zellteilung (Wan and Flavell, R. A., J.Clin.Immunol. 2008). T_{Reg} beeinflussen die Immunantwort auch über zellkontaktvermittelte Mechanismen, indem sie über Oberflächenmoleküle, wie Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4), inhibitorisch auf die T-Zellaktivierung wirken. CTLA-4 ist, ähnlich wie CD28, ein Ligand für Mitglieder der B7-Familie, wie CD80 und CD86 (Kurtz et al., Blood 2009), wirkt jedoch im Gegensatz zu CD28 inhibitorisch auf die Aktivierung von TC (Sakaguchi and Powrie, F., Science 2007). In der vorliegenden Arbeit untersuchte ich, ob die Kulturbedingungen die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu T_{Reg} fördern. Induzierte T_{Reg} werden auch als adaptive T_{Reg} bezeichnet, da es sich um naive TC handelt, die in den peripheren Geweben erst durch den Einfluss von Zytokinen in T_{Reg} differenzieren. TGF- β nimmt an diesem Vorgang eine zentrale Rolle ein, da es die Expression von FoxP3 in TC induziert (Chen et al., J.Exp.Med. 2003).

5.5 Effektorphase

Nachdem das Antigen aufgenommen, Lymphozyten aktiviert und zu Effektorzellen differenziert sind, beginnt bei einem zweiten Kontakt mit dem gleichen Antigen bzw. bei einer Infektion bei einer ausreichend langen Phase, in der das Antigen im Organismus persistiert, die Effektorphase der Immunantwort. Je nach Art der Infektion beginnt das Immunsystem humorale oder zell-vermittelte Effektormechanismen zur Immunabwehr einzuleiten.

Im Falle einer T_H2 -gerichteten Immunantwort werden bei einem zweiten Antigenkontakt oder bei Antigenpersistenz wiederum Zellen des angeborenen Immunsystems, speziell Mastzellen und eosinophile Granulozyten aktiviert. Die Mastzellen im Bindegewebe unter der Epithelschicht binden über den membranständigen $Fc\epsilon$ -Rezeptor-I-IgE-Moleküle, die unter dem Einfluss von IL-4 von B-Zellen nach Immunglobulinklassenwechsel gebildet werden (Coffman et al., J.Immunol. 1986). Kommt es zu einem erneuten Antigenkontakt, bindet das Antigen an die passenden IgE-Moleküle, die von $Fc\epsilon$ -Rezeptor-I-Molekülen auf der Mastzelloberfläche gehalten werden. Über Bindung eines Antigens an zwei IgE- $Fc\epsilon$ -Rezeptor-I-Komplexe kommt es zur Quervernetzung der Rezeptoren und Initiation einer Signaltransduktionskaskade, die zur Degranulation der Mastzellen führt (Metcalf et al., Physiol Rev. 1997). Dadurch werden in Mastzellgranula gespeicherte Enzyme und toxische Mediatoren, wie Trypsin, Chymase, Histamin oder Heparin freigesetzt. Zudem produzieren Mastzellen Zytokine, wie IL-2, IL-5, IL-13 und GM-CSF (Shirato and Taguchi, F., Virology 2009), die eine T_H2 -Antwort weiter fördern, indem z.B. eosinophile Granulozyten gebildet und aktiviert werden. Die Bildung von Prostaglandinen und Leukotrienen durch Mastzellen und Eosinophile, aber auch andere Effektorzellen einer allergischen Immunantwort induziert im Folgenden die Mukusproduktion und die Kontraktion von Zellen der glatten Muskulatur (Stone et al., J.Allergy Clin.Immunol. 2010) durch die Atemwegsobstruktion entsteht. Durch die Sekretion von toxischen Substanzen, wie Matrixmetalloproteasen, Kollagenasen, kationischen Proteinen, Neurotoxinen und freien Radikalen aus den Granula der Eosinophilen (Hogan et al., Clin.Exp.Allergy 2008) werden multizelluläre Pathogene bekämpft. Dabei sind diese Granulozyten durch ihre gewebstoxischen Mediatoren auch für die Zerstörung von umliegendem Gewebe verantwortlich, wodurch chronische, irreversible Gewebeveränderungen entstehen, wie z.B. im Fall des Asthma bronchiale das sogenannte „Remodelling“, was die Langzeitsymptome und –prognose der Patienten bestimmt (Walsh, Curr.Opin.Hematol. 2001).

Während der Effektorphase einer T_H2 -polarisierten Entzündung steuert IL-4 einerseits den Klassenwechsel und die Sekretion von IgE durch B Lymphozyten. Zudem vermittelt es die Hochregulation des niedrigaffinen Rezeptors für IgE auf der Oberfläche von B-Zellen und

phagozytierenden Monozyten und des hochaffinen Rezeptors auf Mastzellen und Basophilen (Pawankar et al., J.Clin.Invest 1997), wodurch die T_H2-polarisierte Immunreaktion weiter verstärkt wird. Zudem trägt IL-4 zur Atemwegsobstruktion beim allergischen Asthma bei, indem es durch die Induktion der Mucin Genexpression zur Hypersekretion von Mukus führt (Dabbagh et al., J.Immunol. 1999), das in den kleinen Atemwegen zu Verschlüssen führen kann. In Fibroblasten erhöht IL-4 die Expression von Eotaxin (Doucet et al., Int.Immunol. 1998) und induziert die Expression von Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), einem Molekül das auf der Oberfläche von vaskulären Endothelzellen. Beide Mechanismen sind an der Rekrutierung von Entzündungszellen, wie TC, Monozyten, Basophilen und Eosinophilen beteiligt. (Moser et al., J.Immunol. 1992). Zusätzlich fördert IL-4 eosinophilenreiche Entzündungen, indem es die Apoptose von Eosinophilen vermindert und ihre Aktivierung erhöht (Hoontrakoon et al., J.Allergy Clin.Immunol. 1999).

Bei einer allergischen Reaktion werden durch die Mediatoren der zunächst aktivierten Effektorzellen weitere Effektorzellen aktiviert. So schütten aktivierte Mastzellen und Eosinophile verschiedene Mediatoren aus, die die Aktivierung und Rekrutierung von weiteren Leukozyten induzieren. Zu diesen Molekülen zählt einerseits der Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α), ein zentrales Zytokin bei Entzündungsreaktionen. In Bronchialbiopsien von Patienten mit Asthma konnte gezeigt werden, dass die Provokation der Biopsien mit dem Allergen Der p eine verstärkte Expression von TNF- α und ICAM-1 zur Folge hatte (Babu et al., Clin.Immunol. 2011). Die zentrale Rolle von TNF- α und die Beteiligung von Mastzellen zeigten Studien in einem murinen Sensibilisierungsmodell, bei dem die Expression von VCAM-1 und ICAM-1 und die damit verbundene Rekrutierung von Entzündungszellen erst durch die intratracheale Gabe von TNF- α oder die Rekonstitution mithilfe von Mastzellen wieder hergestellt werden konnte (Chai et al., Exp.Mol.Med. 2011). Neben den Mastzellen sind Eosinophile eine wichtige Quelle von TNF- α , da dieser Mediator, wie andere T_H2- oder T_H1-spezifische Mediatoren, wie IL-4, IL-13, IL-6, IL-10, IL-12 oder IFN- γ in ihnen gespeichert ist und in Reaktion auf spezifische Stimuli freigesetzt wird (Spencer et al., J.Leukoc.Biol. 2009). Neben Mastzellen und Eosinophilen wird TNF- α auch von alveolaren Epithelzellen freigesetzt werden. Dies zeigten *in vitro* Untersuchungen an einer humanen alveolaren Epithelzelllinie, in denen die Mediumkonzentration von TNF- α , so wie die Expression verschiedener TNF- α -assoziierter Gene, wie CCL-20, IL-1 α und MUC-5AC in Folge einer Behandlung mit Hausstaubmilben-Extrakt anstieg (Vroling et al., Allergy 2007). In den unteren Atemwegen werden Mediatoren, wie RANTES, MCP-1 und MIP-1 α von bronchialen Epithelzellen freigesetzt. So führt *in vitro* eine Infektion von bronchialen Epithelzellen der unteren Atemwege mit Respiratory Syncytial Virus (RSV) zu einer Freisetzung dieser Chemokine (Olszewska-Pazdrak et al., J.Virol. 1998; Selvan et al., J.Biol.Chem. 1994). RANTES ist ein Chemokin, das chemotaktisch auf humane Monozyten und Eosinophile wirkt (Kameyoshi et al., J.Exp.Med. 1992; Schall et al., Nature 1990) und in der Lunge von Asthmatikern verstärkt in die Atemwege sekretiert wird (Teran et al., J.Immunol. 1996). Im Menschen werden

RANTES und MCP-1 durch Gene codiert, die mit den Genen für Eotaxin und GM-CSF geclustert auf dem Chromosom 17q11 liegen (Luster and Rothenberg, M. E., J.Leukoc.Biol. 1997). Eotaxin-2 ist ein eosinophilen-spezifisches Chemokin und kann in einem murinen Tiermodell durch Allergenprovokation und IL-4 Überexpression induziert werden (Zimmermann et al., J.Immunol. 2000) und von GM-CSF ist bekannt, dass es auch von bronchialen Epithelzellen exprimiert wird (Soloperto et al., Am.J.Physiol 1991). In dieser Arbeit wurde auch gezeigt, dass es das Überleben von Eosinophilen beeinflusst und diese Zellen aktiviert. Zudem wird GM-CSF zusammen mit IL-6 und IL-8 vermehrt in bronchialen Epithelzellen von Patienten mit Asthma exprimiert (Marini et al., J.Allergy Clin.Immunol. 1992).. MCP-1 wirkt chemotaktisch auf Monozyten, Lymphozyten (Carr et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1994; Matsushima et al., J.Exp.Med. 1989) und Basophile (Kuna et al., J.Immunol. 1993). Es konnte gezeigt werden, dass MCP-1 und RANTES nach endobronchialer Provokation mit einem Antigen verstärkt in die Atemwege von Asthmatikern abgegeben werden (Holgate et al., Am.J.Respir.Crit Care Med. 1997).

Neben diesen Vorgängen, die zu einer Verstärkung der Immunantwort führen, werden nach der Beseitigung eines Pathogens Vorgänge eingeleitet, die die Immunantwort beenden. Dies geschieht zum einen durch die Ausschüttung von endogenen anti-inflammatorischen Mediatoren und die Beendigung von pro-inflammatorischen Signalwegen. Hierzu schütten Makrophagen, Granulozyten und auch Epithelzellen anti-inflammatorische Enzyme und Mediatoren, wie IL-10, TGF- β Prostaglandine, sowie Lipoxine, Resolvine und Protectine aus (Lawrence et al., Nat.Rev.Immunol. 2002; Serhan and Savill, J., Nat.Immunol. 2005). Zum anderen exprimieren die Effektorzellen Oberflächenmoleküle, wie Fas, einem Mitglied der TNF Rezeptorfamilie und Mitglieder der B7 Familie von kostimulatorischen Molekülen, wie CTLA-4, programmed death 1 (PD-1) (Greenwald et al., Annu.Rev.Immunol. 2005) oder B- and T-lymphocyte attenuator (BTLA) (Watanabe et al., Nat.Immunol. 2003), die Immunantworten supprimieren. Gleichzeitig mit der Beendigung der Immunreaktion und der Beseitigung der schädlichen Effektorzellen werden in der Lunge Reparaturmechanismen, wie die Differenzierung und die Proliferation von bronchialen Epithelzellen über Transaktivierung des Rezeptors für Epidermal Growth Factor (EGFR) eingeleitet (Sweeney et al., J.Biol.Chem. 2001; Takeyama et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1999).

5.6 Einfluss der Epithelzellen auf die pulmonale Sensibilisierung

Beim Asthma bronchiale gelangen Allergene über die Atemwege in die Lunge. Sowohl bei der allergischen Sensibilisierung, wie bei der Aktivierung von Effektorzellen (Kuipers and Lambrecht, B. N., Curr.Opin.Immunol. 2004) vermitteln sie unter Beteiligung von adjuvanten Mediatoren die allergische Sensibilisierung (Eisenbarth et al., J.Exp.Med. 2002). Die Interaktionen zwischen

strukturellen, sessilen Zellen des Atmungsorgans „Lunge“ und den mobilen Zellen des Immunsystems, die bei obigen Prozessen eine zentrale Rolle spielen, sind allerdings bisher nur unzureichend verstanden.

Die Lunge stellt die größte Oberfläche des Körpers mit kontinuierlichem Kontakt zur Umwelt dar. Über eine Fläche von geschätzten 100 m² werden täglich ungefähr 10.000 L Atemluft inhaliert, mit der eine Vielzahl von potenziell gefährlichen, chemischen oder biologischen Stoffen, wie Krankheitserregern in die Lunge gelangen. Den ersten Kontakt zwischen Umwelt und Organismus stellt das Epithel dar, das gleichzeitig in Form einer physischen Barriere wirkt (Holgate, Trends Immunol. 2007).

Die Lunge ist vollständig von Epithelzellen ausgekleidet, wobei sich diese Gewebe innerhalb der einzelnen Regionen der Atemwege sowohl morphologisch, wie auch in ihrer Funktion stark unterscheiden. Die luftleitenden Bronchien, sowie der Larynx bis hinauf in die Nasenhöhle wird von gestuftem hochprismatischem Flimmerepithel ausgekleidet, das von Becherzellen durchsetzt wird. Diese Zellen sitzen alle einer Basallamina auf, wobei nicht alle Zellen die Oberfläche erreichen. Charakteristisch für diese Zellen sind die Zilien an ihrem apikalen Ende, die durch Geißelbewegungen eine die bronchialen Atemwege auskleidende Mukusschicht in Bewegung halten, so dass Fremdkörper aus der Lunge heraustransportiert werden. Diese Mukusschicht wird vorrangig von den Becherzellen produziert, einem sekretorischen Zelltyp, der diese Epithelschicht durchsetzt. Diese Epithelschicht wird häufig auch irreführend als „respiratorisches“ Epithel bezeichnet, obwohl diese Zellen am Gasaustausch nicht beteiligt sind (Wachtler 2005).

Die Regionen des Lungenparenchyms hingegen werden nicht vom respiratorischen Epithel ausgekleidet, sondern von einem einschichtigen Plattenepithel, das sich aus zwei morphologisch unterschiedlichen Zelltypen zusammensetzt, den Typ 1 und Typ 2 Pneumozyten. Die Unterschiede dieser Zellen, weiter als Alveolarepithelzellen Typ 1 (AECI) und Typ 2 (AECII) genannt, werden bereits klar, wenn man vergleicht wie häufig sie im Alveolus vertreten sind und welche Fläche sie einnehmen. So zeigten Crapo und Mitarbeiter, dass in den Alveolen die Zahl der AECII doppelt so hoch ist, wie die der AECI (Crapo et al., Am.Rev.Respir.Dis. 1982). Im Vergleich hierzu nehmen die Typ 1 Zellen jedoch 96 % der alveolaren Oberfläche ein.

Die ausgebreitete AECI ist sehr dünn und befindet sich in unmittelbarer Nähe zu den, die Alveoli umschließenden Kapillaren. So teilen sich die Typ 1 Zelle und Endothelzellen stellenweise eine Basallamina. Diese räumliche Nähe erklärt sich aus der primären Funktion dieser Epithelzellen, denn sie sind direkt am Gasaustausch zwischen Atemluft und Blut beteiligt. Die AECI reproduziert sich selbst nicht (Harris 1978; Kauffman et al., Anat.Rec. 1974), sondern geht aus der Population der

AECII hervor, die sich durch Differenzierung in Typ 1 Zellen umgestalten (Evans et al., Exp.Mol.Pathol. 1975).

AECII sind sekretorische Zellen, die auch als „Nischenzellen“ bezeichnet werden, da sie sich vorrangig in den Vertiefungen der Alveolarwand befinden. Da die AECII je nach Spezies nur etwa 4-6 % der Oberfläche des Alveolarepithels ausmachen und in den Vertiefungen zwischen den umschließenden Kapillaren liegen, ist es nicht wahrscheinlich, dass diese Zellen am Gasaustausch beteiligt sind. Die Microvilli auf der luminalen Seite der Epithelzelle und die Lage der Zellen deuten darauf hin, dass die AECII an der Resorption von Flüssigkeit im Alveolarraum beteiligt sind. Die wichtigste Funktion liegt in der Sekretion von „surface active agent“ (Surfactant) einem Gemisch aus Phospholipiden, Phosphatidylcholinen und Surfactant-spezifischen Proteinen zur Herabsetzung der Oberflächenspannung an der alveolären Luft-Flüssigkeitsgrenze. Der größte Teil dieser Substanzen wird vor der Sekretion in den Lamellarkörpern der Zelle gespeichert, die bis zu 15 % der AECII ausmachen und auch wieder in diese recycelt (Post et al., Exp.Lung Res. 1982; Robertson et al. 1992; Scarpelli 1988). Surfactant beeinflusst die Stabilisierung der kleinen Atemwege, die Flüssigkeitshomöostase in der Lunge, unterstützt die Reinigung der Atemwege und übt immunmodulatorische Funktionen aus (Hohlfeld et al., Eur.Respir.J. 1997).

Diese verschiedenen pulmonalen Epithelgewebe sind der Umwelt nicht schutzlos ausgesetzt. Durch Tight Junctions verbunden und mit einer 10 µm dicken Schleimschicht bedeckt, die ständig in Richtung der oberen Atemwege bewegt wird, stellt das respiratorische Epithel eine schwer durchdringbare Barriere dar. Die Atemwege sind von einer stetig aufwärtsbewegten Mukusschicht überzogen, die viele antimikrobielle Peptide, Peroxidasen, Lipide, Glycoproteine und Surfactant enthält (Bals and Hiemstra, P. S., Eur.Respir.J. 2004). Neben seiner Funktion als physische Barriere können die verschiedenen Epithelien der Atemwege die Immunantwort modulieren. So tragen z. B. die Epithelzellen der Nasenhöhle auf der Oberfläche PRR, wie TLR und Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) like Rezeptoren über die diese Epithelzellen, die den respiratorischen Epithelzellen der bronchialen Atemwege sehr ähnlich sind, aktiviert werden können (Bogefors et al., Allergy 2010). Durch Bindung von PAMPs werden Signalwege in den bronchialen Epithelzellen aktiviert, wodurch die Sekretion von immunmodulatorischen Molekülen, wie Zytokinen, Chemokinen oder Oberflächenproteinen (Schleimer et al., J.Allergy Clin.Immunol. 2007) eingeleitet wird. So konnte gezeigt werden, dass bronchiale Epithelzellen die Rekrutierung und das Überleben von DC durch die Produktion von C-C motif ligand 20 (CCL20) und GM-CSF verstärken (Reibman et al., Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 2003; Sha et al., Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 2004). Bei der Rekrutierung von verschiedenen Leukozyten durch T-Effektorzellen und der Rekrutierung von T-Effektorzellen selber kann das respiratorische Epithel durch die Sekretion von Chemokinen unterstützend wirken (Nickel et al., J.Allergy Clin.Immunol. 1999). So sezernieren bronchiale Epithelzellen nach Kontakt mit IL-4 und IL-13 Chemokine wie RANTES, MCP-1 (Propst et al., J.Immunol. 2000), Thymus and

activation-regulated chemokine (TARC) (Heijink et al., *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 2007) und Eotaxin (Lilly et al., *J.Clin.Invest* 1997), wodurch T_H2-Zellen und andere Effektorzellen rekrutiert werden.

Sowohl bronchiale Epithelzellen des respiratorischen Epithels, wie AECII der distalen Atemwege nehmen Einfluss auf die Aktivierung von APC und können dadurch indirekt die T-Helferzellpolarisierung beeinflussen. Die Bindung von doppelsträngiger RNA, wie sie z.B. Bestandteil von Viren sein kann, an Toll-like Rezeptor 3 (TLR3) oder T_H2-Zytokine führen in bronchialen Epithelzellen zur Produktion von Thymal Stromal Lymphopoietin (TSLP) (Kato et al., *J.Immunol.* 2007). Der Rezeptor für TSLP wird von DC exprimiert. Nach Bindung von TSLP an den Rezeptor wird die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, OX40 und CD80 heraufreguliert, wodurch die Entwicklung von T_H2-Zellen gefördert wird (Ito et al., *J.Exp.Med.* 2005; Soumelis et al., *Nat.Immunol.* 2002). Auch durch Bindung von Interleukin-1F9 (IL-1F9) und Interleukin-33 (IL-33) durch den ST2-Rezeptor auf TC können Epithelzellen die T_H2-Polarisierung verstärken (Schmitz et al., *Immunity.* 2005).

In den Atemwegen exprimieren sowohl Bronchial-, wie auch Alveolarepithelzellen auf ihrer Oberfläche verschiedene kostimulatorische Moleküle, die die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass humane Epithelzellen der Atemwege die Mitglieder der B7:CD28 Familie Programmed death ligand 1 (PD-L1 und Programmed death ligand 2 (PD-L2) von der Trachea bis in die Alveolen exprimieren (Stanciu et al., *J.Infect.Dis.* 2006). Der Rezeptor für diese beiden Liganden wird unter anderem von TC exprimiert. Die Interaktion mit PD-L1 und -L2 reguliert die Aktivierung, die Funktion, das Überleben und die Differenzierung der TC (Greenwald et al., *Annu.Rev.Immunol.* 2005); (Wang and Chen, L., *Microbes.Infect.* 2004).

Diese Auswahl neuerer Erkenntnisse zur Interaktion von verschiedenen bronchialen, und alveolaren Epithelien mit Zellen des Immunsystems zeigen, dass diese Zellen neben ihrer Barrierefunktion wichtige immunmodulierende Funktionen in den bronchialen und distalen Atemwegen ausüben können, die die Immunantwort in den Atemwegen beeinflussen. Während verschiedene Untersuchungen eine immunmodulatorische Rolle von bronchialen und alveolaren Epithelzellen während der Effektorphase allergischer Erkrankungen aufzeigen, ist die Rolle der Epithelzellen beider Lungenkompartimente, der oberen, wie den unteren in der Sensibilisierungsphase des Asthma bronchiale weniger untersucht.

Obwohl sich viele Untersuchungen zum Asthma bronchiale mit bronchialen Epithelzellen beschäftigen, zeigen Publikationen in denen AECII im distalen Lungenkompartiment untersucht wurden, dass die Epithelzellen der unteren Atemwege mit dem Immunsystem interagieren. Wie zuvor beschrieben ist eine Beteiligung der AECII an immunmodulatorischen Prozessen wahrscheinlicher als

die von AECl, da diese Epithelzellen sich stark auf den Vorgang des Gasaustauschs spezialisiert haben. Zudem übernehmen AEcII in verschiedenen Modellen der Atemwegsentzündung immunmodulatorische Wirkungen (Dittrich et al., Clin.Exp.Allergy 2010; Gereke et al., Am.J.Respir.Crit Care Med. 2009; Zhao et al., Respir.Med. 2010), so dass ich vermutete, dass diese Zellen einen Einfluss auf den Sensibilisierungsprozess haben könnten.

5.7 Ziele der vorliegenden Arbeit

Das T_H2-Zytokin IL-4 spielt eine wichtige Rolle bei der Sensibilisierung gegen neue Antigene im Zuge einer bereits bestehenden T_H2-gerichteten pulmonalen Entzündung (Eisenbarth et al., Curr.Opin.Pediatr. 2004). In einem murinen Modell, in dem die pulmonale Sensibilisierung abhängig vom Kontakt mit Antigen und IL-4 ist, was weiter als „IL-4 abhängige pulmonale Sensibilisierung“ bezeichnet wird, zeigten Untersuchungen mit Knochenmarkschimären für den IL-4 Rezeptor, dass die α -Untereinheit des IL-4 Rezeptors sowohl auf hämatopoetischen Zellen, wie auf strukturellen Zellen exprimiert sein muss, damit es zur Ausbildung des asthmatischen Phänotyps kommt. (Dittrich et al., J.Immunol. 2008). Aufgrund der Vielzahl von Untersuchungen, die wichtige immunmodulatorische Funktionen von bronchialen Epithelzellen und AECII aufzeigen, scheint die Beteiligung der Epithelzellen bei der „IL-4 abhängigen pulmonalen Sensibilisierung“ möglich.

In der hier vorliegenden Arbeit soll die Rolle von pulmonalen AECII in der Sensibilisierungsphase des allergischen Asthma bronchiale untersucht werden. Die Arbeit gliedert sich in zwei Teilprojekte:

A) Anhand eines murinen Asthmodells, bei dem TLR4-defiziente Tiere mit oder ohne IL-4 gegen OVA sensibilisiert werden, wollte ich die Wirkung von IL-4 in der pulmonalen Sensibilisierungsphase genauer untersuchen. Es galt zu untersuchen, welchen Einfluss IL-4 auf die Zellzahl und -differenzierung sowie die Synthese von Eotaxin-2 im Bronchoalveolarraum der Tiere hatte. Anschliessend sollte in einem hypothesefreiem Ansatz mithilfe einer Microarrayanalyse von isolierten AECII untersucht werden, welche Änderungen die Gegenwart von IL-4 in diesen Zellen während der Sensibilisierungsphase hervorruft.

B) In einem zweiten Ansatz sollten in einem in vitro Ko-Kultursystem untersucht werden, welche Wirkung AECII auf die T Zellaktivierung haben und inwiefern die Behandlung von Epithelzellen mit IL-4 diese Interaktion beeinflusst. Der Einfluss von Epithelzellen und IL-4 sollte anhand der Änderungen der T Zellproliferation und der Messung verschiedener Aktivierungs- und Differenzierungsmarker mittels Durchflusszytometrie untersucht werden. In diesem System sollten somit mögliche Mechanismen einer Interaktion zwischen IL-4, AECII und Immunzellen identifiziert werden.

6. Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
2-Propanol	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
4', 6-Diamin-2-phenylindol (DAPI)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Acrylamid	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose NEEO Ultra	Carl-Roth , Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumchlorid (NH ₄ CL)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Assay Diluent	BD Biosciences, San Jose, USA
BioMag® goat- anti-rat IgG	Polyscience Inc., Eppelheim, Deutschland
BioMag® goat-anti-mouse IgG	Polyscience Inc., Eppelheim, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Carboxyfluorescein Succinimidyl Esther (CFSE)	eBiosciences, Frankfurt, Deutschland
Complete™ Proteaseinhibitor	Roche, München, Deutschland
Desoxyribonukleotidphosphate (dNTP)	Fermentas, Sankt Leon-Rot, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dispase	BD Biosciences, San Jose, USA
DMEM Medium	Lonza, Köln, Deutschland
DNase Typ I	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Eosin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol; Rotipuran® ≥ 99,8 %	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
F12K Nutrient Mixture	Lonza, Köln, Deutschland
Fötales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Giemsa Stammlösung	Carl-Roth , Karlsruhe, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Glycin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
GM-CSF	Sekretiert von in unserem Labor kultivierten Hybridoma: clone J558L
Hematoxylin Lösung, modifiziert nach Gill III	Merck, Darmstadt, Deutschland
HEPES	PAA, Pasching, Deutschland
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat(KHCO ₃)	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Mass Ruler DNA ladder (low range)	Fermentas, Sankt Leon-Rot, Deutschland
May-Grünwald-Lösung	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Mitomycin C	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS), UltraPure	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumfluorid (NaF)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ovalbumin grade IV	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ovalbumin Peptid	Biosynthan, Berlin, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Phosphat-gepufferte Saline (PBS) Tabletten	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
rekombinantes murines Interleukin-4	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
Rnase-freie Dnase	Qiagen, Hilden, Deutschland
Rnase-freies Wasser	Fermentas, Sankt Leon-Rot, Deutschland
Rotiophorese® 10 x TAE-Puffer	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640	Lonza, Köln, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sauerstoff (O ₂) (10 L)	Linde Gas, Hannover, Deutschland
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Stickstoff, flüssig	Linde Gas, Hannover, Deutschland
Taq Polymerase	Fermentas, Sankt Leon-Rot, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
TEMED	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tissue Tek, O.C.T™ compound	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
TMB Substrat	Biotrend, Köln, Deutschland
Tris, UltraQuality	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton-X-100	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA	PAA, Pasching, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

6.1.2 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
ABI PRISM ® 7500 fast real time PCR system	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Anästhesieapparat	Drägerwerk Ag & Co KGaA, Lübeck, Deutschland
BioMag® Flask Separator	Polysciences Inc., Eppelheim, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
CO ₂ Inkubator MCO-18AC	Sanyo E&E Europe BV, Loughborough, UK
Cytospin 3	Shandon Life Science International, Cheshire, UK
Flow cytometer (FACS) BD™Calibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Flow cytometer (FACS) BD™LSRII	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Fluidics Station 450	Affymetrix, Santa Clara, USA
GCS3000 Scanner	Affymetrix, Santa Clara, USA
Gelelektrophoresekammer und Zubehör	Thermo Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland
Gene Genius Bioimaging System	Syngene, Cambridge, UK
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Heraeus Multifuge 3Plus	Thermo Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland
HeraSafe Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Infinite M200 Multiwell Reader	Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland
Kühl-, Gefrierkombinationsgeräte CP 3523 comfort	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Magnetrührer, RTC basic	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Mastercycler epGradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Microwell Plattenständer	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Mikrodismembrator Ionomix®	Ionos, Seefeld, Deutschland
Mikroliter Pipetten	Gilson Inc., Middleton, USA
Mikroskop Olympus CX41RF	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikrowelle	Severin, Sundern, Deutschland
MoFlow Cell Sorter	Cytomation, Fort Collins, USA
Multipipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Operationsbesteck	FST, Heidelberg, Deutschland
pH-Meter	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Pipette boy, Pipetus®	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Plexiglas® chamber	Medical engineering MHH, Hannover, Deutschland
Tank-Blot-System	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Tissue processor, Citadel 1000	Shandon, Frankfurt, Deutschland
Vortex Genie 2 Scientific Industries	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Waage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 2: Verwendete Geräte

6.1.3 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
0,2 µl Reagenzgefäß	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
0,5 ml sterile Polypropylengefäße	Greiner BioOne, Frickenhausen, Deutschland
0,5 ml sterile Polystyrolgefäße	Greiner BioOne, Frickenhausen, Deutschland
1,3 ml Polypropylengefäße	Greiner BioOne, Frickenhausen, Deutschland
1,5 ml Reagenzgefäße	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
12-Well Zellkulturplatte	TPP, Trasadingen, Switzerland
15 ml Reagenzröhrchen	TPP, Trasadingen, Switzerland

Bezeichnung	Hersteller
24-Well Zellkulturplatte	TPP, Trasadingen, Switzerland
50 ml Reagenzröhrchen	TPP, Trasadingen, Switzerland
96-Well Maxisorp ELISA Platte	NUNC A/S, Roskilde, Denmark
96-Well PCR Platte	AB Applied Bioscience, Cheshire, UK
96-Well Zellkulturplatte	TPP, Trasadingen, Switzerland
Abbotath®-T20Gx32	Abbott, Ludwigshafen, Deutschland
Affymetrix GeneChip MOE430 2.0	Affymetrix, Santa Clara, USA
Amersham™ Nitrozellulosemembran	GE Healthcare, München, Deutschland
Cryo Box	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Cryo Box Einsätze	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Cryo Röhrchen™	NUNC A/S, Roskilde, Denmark
FACS Röhrchen	BD, Heidelberg, Deutschland
FastPrep Lysing Matrix D	MP biomedical, Eschwege, Deutschland
Glasflaschen	Schott, Mainz, Deutschland
Kanülen	Braun, Melsungen, Deutschland
Klebefolie für 96-Well Platten	ABgene, Surrey, UK
Klinisches Nahtmaterial, 3.5metric floss	Resorba, Nürnberg, Deutschland
Latex Handschuhe	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Nitril Handschuhe	Kimberly-Clark, Weinheim, Deutschland
Nitrozellulosemembran	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Objektträger	Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland
Parafilm®M	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Peripherer Venenkatheter (16 G)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Pipettenspitzen für Mikropipetten	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Röntgenfilm	Kodak, Stuttgart, Deutschland
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Serum Gel Z Mikro-Probengefäß 1,1 mL	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Shandon Filter für die Cytospin	Shandon Life Science International, Cheshire, UK

Bezeichnung	Hersteller
Spritze (10 ml)	BD Biosciences, Heidelberg Deutschland
Spritze (1 ml)	BD Biosciences, Heidelberg Deutschland
Spritze (5 ml)	BD Biosciences, Heidelberg Deutschland
Sterile Nuklease-freie Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Steriler Spritzenvorsatzfilter 0,2 µm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturflaschen T-25, T-75, T-125	TPP, Trasadingen, Switzerland
Zellzählkammer nach Neubauer	Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmittel

6.1.4 Oligonukleotide

Zielgen	Sequenz Primer 1	Sequenz Primer 2	Amplifikat
4-1BB-L	5' GGA GCC CAG GAT GCA TAC AGA GA 3'	3' CCC ATA AAA CAT AGC AGC TTG AGG AC 5'	154 bp
β -Actin	5' GTT TGA GAC CTT CAA CAC CCC A 3'	3' GAC CAG AGG CAT ACA GGG ACA 5'	71 Bp
CCL20	5' GGC AGA AGC AGC AAG CAA CTA 3'	3' GGC CAT CTG TCT TGT GAA ACC 5'	94 Bp
CD80	5' AGT GGC TTT TGC TCT TTG GAT A 3'	3' CAT TTC TTT GGG GCA CAT TGA T 5'	108 bp
CD124	5' TGT GCC ACA TGG AAA TGA AT 3'	3' CAT TGG TGT GGA GTG TGA GG 5'	150 bp
CXCL1	5' GCA CCC AAA CCG AAG TCA TA 3'	3' AGG TGC CAT CAG AGC AGT CT 5'	150 bp
Eotaxin-2	5' CTG TGA CCA TCC CCT CAT CT 3'	3' TAT GTG CCT CTG AAC CCA CA 5'	182 bp
GITR-L	5' GCC AGC TTG TGA GTT CTT GT 3'	3' CCT ATG GCA ATT CAG CAA GT 5'	190 bp
GM-CSF	5' GAA GCA TGT AGA GGC CAT CA 3'	3' GAA TAT CTT CAG GCG GGT CT 5'	139 Bp
I-A α	5' GGC TCC TCA AGC GAC TGT GT 3'	3' GGG GCT GGA ATC TCA GGT TC 5'	300 Bp
IL-33	5' GAT GGG AAG AAG GTG ATG GGT G 3'	3' TTG TGA AGG ACG AAG AAG GC 5'	140 bp
MCP-1	5' CCC ACT CAC CTG CTG CTA CT 3'	3' TTC TTG GGG TCA GCA CAG A 5'	150 bp
PD-L	5' GTG TCC ACG GTC CTC CTC TTC TTG 3'	3' TCC CAT GGG CCC TTT CTT TCA 5'	182 bp
RANTES	5' GAA GAT CTC TGC AGC TGC CCT 3'	3' GCT CAT CTC CAA ATA GTT GA 5'	271 bp
TARC	5' AGT GGA GTG TTC CAG GGA TG 3'	3' GGC CGT TTT ATG TTG AAA CC 5'	184 bp
TSLP	5' CCA GGC TAC CCT GAA ACT GA 3'	3' TCT GGA GAT TGC ATG AAG GA 5'	125 bp

Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide (synthetisiert von Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland)

6.1.5 Antikörper

Name	Spezifität	Herkunft/Klon	Konjugat	Anwendung	Hersteller
mCD11c	α Maus/Monoklonal	Hamster (HL3)	Alexa Fluor® 488	FACS	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
mCD4	α Maus/Monoklonal	Ratte (RM4-5)	APC	FACS	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
mCD62L	α Maus/Monoklonal	Ratte (MEL-14)	APC	FACS	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
mFoxP3	α Maus/Monoklonal	Ratte (FJK-16s)	APC	FACS	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
mIgE	A Maus/Monoklonal	Ratte (R35-72)	unkonjugiert	ELISA	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
mIgG1	α Maus/Monoklonal	Ratte (LO-MG1-2)	biotinyliert	ELISA	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
mIgG2a	α Maus/Monoklonal	Ratte (R19-15)	biotinyliert	ELISA	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
mKJ-26	α Maus	Maus (KJ1-26)	biotinyliert	FACS	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
mCD124	α Maus/Polyklonal	Ziege	biotinyliert	WB	RnD Systems, Wiesbaden, Deutschland
mTCR Valpha2	A Maus/Monoklonal	Ratte (B20.1)	biotinyliert	FACS	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
mTCR Vbeta 5.1/5.2	α Maus/Monoklonal	Maus (MR9-4)	biotinyliert	FACS	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
mCD4	α Maus/Monoklonal	Ratte (RM4-5)	eFluor450	FACS	eBioscience, Frankfurt, Deutschland

Name	Spezifität	Herkunft/Klon	Konjugat	Anwendung	Hersteller
mCD4	α Maus/Monoklonal	Ratte (RM4-5)	FITC	FACS	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
mI-A/I-E	α Maus/Monoklonal	Ratte (2G9)	FITC	FACS	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
mMHCII	α Maus/Monoklonal	Ratte (2G9)	FITC	FACS	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
F4/80	α Maus/Monoklonal	(BM8)	PE	FACS	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
mCD11b	α Maus/Monoklonal	(M1/70)	PE	FACS	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
mCD16/C D32	α Maus/Monoklonal	(2.4G2)	PE	FACS	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
mCD25	α Maus/Monoklonal	Ratte (PC61.5)	PE	FACS	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
mCD45	α Maus/Monoklonal	(30-F11)	PE	FACS	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
mCD44	α Maus/ α Human/Monoklonal	Ratte (IM7)	PerCP-Cy5.5	FACS	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
mCD69	α Maus/Monoklonal	H1.2F3	PerCP-Cy5.5	FACS	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
mCD4	α Maus/Monoklonal	Ratte (GK1.5)		CD4 ⁺ Präparation	Selbst produziert
mCD45R	α Maus/CD45R	Hybridoma/TIB164		CD4 ⁺ Präparation	Selbst produziert
mCD8	Mouse/CD8	Hybridoma/TIB105		CD4 ⁺ Präparation	Selbst produziert
mFcR	Mouse/FcR	Hybridoma/2.4G2		CD4 ⁺ Präparation	Selbst produziert
mIgE	α Maus/Monoklonal	Ratte (R35-72)		ELISA	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
mMHC-II, I-Ad	α Maus/Monoklonal	Hybridoma (212.A1)		CD4 ⁺ Präparation	Selbst produziert

Name	Spezifität	Herkunft/Klon	Konjugat	Anwendung	Hersteller
mNK1.1	α Maus/Monoklonal	Maus (HB191)		CD4+ Präparation	Selbst produziert

Tabelle 5: Verwendete Antikörper

4.1.6 Isotypkontrollen

Isotyp	Herkunft/Klon	Konjugat	Anwendung	Hersteller
mouse IgG2a	Maus (KJ1-26)	biotinyliert	FACS	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
mouse IgG1,k	Maus (MR9-4)	biotinyliert	FACS	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
hamster IgG1, I2	Hamster (G235-2356)	Alexa Fluor® 488	FACS	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
rat IgG2a, k	Ratte (R35-95)	APC	FACS	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
rat IgG2a, k	Ratte	eFluor450	FACS	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
rat IgG2a, k	Ratte	APC	FACS	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
rat IgG2a, k	Ratte (R35-95)	FITC	FACS	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
rat IgG1, k	Ratte (R3-34)	PE	FACS	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
rat IgG2b	Ratte (eB149/10H5)	PerCP-Cy5.5	FACS	eBioscience, Frankfurt, Deutschland

Tabelle 6: Verwendete Isotypkontrollen

6.1.7 Enzymkonjugate

Bezeichnung	Hersteller
Streptavidin-horse radish peroxidase (HRP)	RnD Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Streptavidin Alexa 647	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
anti-DIG-HRP (poly-Fab fragments)	Roche, Mannheim, Deutschland

Tabelle 7: Verwendete Enzymkonjugate

6.1.6 Lösungen und Medien

Bezeichnung	Hersteller
6x DNA Probenpuffer	50 % Glycin, 10 mM EDTA, 3 % Bromphenolblau
6x SDS-Probenpuffer	250 mM Tris, 1,92 M Glycin, 1 % SDS
Carbonatpuffer	15 mM Na ₂ CO ₃ + 35 mM NaHCO ₃ add 1 L Aqua bidest
FACS Fixierungslösung	500 ml PBS + 5 g PFA, pH≈7.0
FACS Puffer Zellsortierung	PBS + 0.5 % BSA + 2 mM EDTA
FACS Sheathflüssigkeit	500 ml PBS + 5 % FBS + 0,1 % NaN ₃
Hämolysepuffer	150 mM NH ₄ Cl + 10 mM KHCO ₃ + 0.1 mM EDTA add 1 L Aqua bidest
LA4 Vollmedium	F12K Nutrient Mixture + 10 % FBS + 2 mM L-Glutamin + 100 U/ml Penicilin 0,1 mg/mL Streptomycin + 71,5 mM β-Mercaptoethanol
Lysispuffer	20 mM Tris (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton-X-100, 20 mM NaF, 0,1 mM Na ₃ VO ₄ , Complete™ Proteaseinhibitor
RPMI 1640 mit 5 % FBS	RPMI 1640 + 5 % FBS
RPMI 1640 Vollmedium	RPMI 1640 + 10 % FBS + 2 mM L-glutamine + 100 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml + Streptomycin + 71,5 mM β- Mercaptoethanol

Tabelle 8: Verwendete Medien und Lösungen

6.1.7 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Amersham™ ECL Kit	GE Healthcare, München, Deutschland
Bradford Proteinassay Kit	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland

DIG-Kit	Roche, München, Deutschland
First strand cDNA synthesis kit	Fermentas, St. Leon Roth, Deutschland
GeneChip® 3' IVT Express Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
Maxima SYBR Green/Rox Mastermix	Fermentas, St. Leon Roth, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

Tabelle 9: Verwendete Kits

6.1.8 Versuchstiere

Tierart	Interne Laborbezeichnung	Offizielle Nomenklatur
Maus	BALB/c	Wildtyp
Maus	C57BL/6	Wildtyp
Maus	C3H/HeJ	C3H/HeJ
Maus	Calpha/DO11.10	C.Cg-Tcratm1Mom-Tg(DO11.10)10Dlo
Maus	BALB/c-DO11.10	C.Cg-Tg(DO11.10)10Dlo/J
Maus	OT-II	C57BL/6-Tg(TcraTcrb)425Cbn

Tabelle 10: Verwendete Versuchstiere

6.1.9 Software

Bezeichnung	Hersteller
CellQuest Pro	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS DIVA software	BD, Heidelberg, Deutschland
Flow Jo software	TreeStar Inc., Ashland, USA
GCOS1.2	Affymetrix, Santa Clara, USA
Microsoft Office Suite 2003-2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Prism	Graphpad Software Inc., La Jolla, USA
Tecan i-control Invinite 200	Tecan Group Ltd., Männedorf, Deutschland

Tabelle 11: Verwendete Software

6.2 Methoden

6.2.1 Molekularbiologische Methoden

6.2.1.1 Isolation von RNA

Gewebe nahm ich in 350 μ L RLT-Puffer mit 3,5 μ L β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) auf und überführte sie in FastPrep Lysing Matrix Rörchen (MP BioMedicals, Eschwege, Deutschland), die Keramikkugeln (1,4 mm) enthielten. Durch wiederholtes Schütteln mit einem Mikrodismembrator Ionomix® (Ionos, Seefeld, Deutschland) wurden Gewebe und Zellen aufgeschlossen.

Das Zellpellet einer Zellkultur wurde nach Zentrifugation bei 13000 Umdrehungen pro Minute (Upm) in 350 μ L RLT-Puffer mit β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) aufgenommen und für 1 Minute gevortext. Nach der Lyse mischte ich die Probe mit 70 % Ethanol Rotipuran® (Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und trug sie auf eine RNeasy Mini Spin Säule (Qiagen, Hilden, Deutschland) auf, so dass die denaturierte RNA an die Silica-Membran der Säule band. In mehreren Waschschritten befreite ich die Probe von Zelltrümmern, Nukleinsäuren, Proteinen und Salzen. Um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, wurde die Probe auf der Säule mit RNase-freier Desoxyribonukleotid Endonuklease (DNase) (Qiagen, Hilden, Deutschland) verdaut. Die aufgereinigte RNA eluierte ich mit Ribonukleotid Endonuklease (RNase)-freiem Wasser (Fermentas, Sankt Leon- Roth, Deutschland) von der Säule.

Die erhaltene RNA-Konzentration bestimmte ich mit einem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) spektralphotometrisch bei 260 Nanometer (nm), wobei eine optische Dichte (OD)₂₆₀ von 1 einer Konzentration von 40 Microgramm pro Milliliter (μ g)/mL entspricht. Die Reinheit der Probe konnte ich durch Bildung des Quotienten der OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ errechnen. Bei OD₂₈₀ liegt das Absorptionsmaximum von Proteinen, insbesondere von aromatischen Aminosäuren. Um eine Kontamination mit Phenolaten oder Thiocyanaten auszuschließen errechnete ich zudem den Quotient zwischen OD₂₃₀ und OD₂₆₀. Ausschließlich Proben mit einer ausreichend hohen Reinheit (Quotient 1,8-2) wurden weiter verwendet.

6.2.1.2 Synthese von komplementärer DNA (cDNA) durch Reverse Transkription von RNA

Die isolierte RNA schrieb ich mithilfe des First Strand cDNA Synthese Kit (Fermentas, Sankt Leon-Rot, Deutschland) um. Hierfür setzte ich nach Angaben des Herstellers 0,8 bis 4 µg Template-RNA in einem Reaktionsansatz mit Oligo(dT)18 Primer ein.

1x Reaktionsansatz:

1x	Reaktionspuffer
1mM	Desoxynukleotriphosphate (dNTP)
5µM	Oligo(dT)18Primer
20U	RiboLock™ RNase Inhibitor
40U	M-MuLV Reverse Transkriptase
0,8-4 µg	Template RNA
auf 40 µL	nuklease-freies Wasser

Der Ansatz wurde für 60 Minuten bei 37 Grad Celsius (°C) im Heizblock Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Die Reaktion wurde beendet, indem die Proben für 15 Minuten auf 70°C erhitzt wurden.

Um eine Kontamination der Template RNA mit genomischer DNA auszuschließen, setzte ich eine Synthese ohne Reverse Transkriptase an. Eine Verunreinigung der Reagenzien konnte ich durch eine Reaktion ausschließen, bei der keine Template RNA eingesetzt wurde. Als Positivkontrolle diente mir eine vom Hersteller mitgelieferte Template-RNA. Hierbei kann in einer PCR eine Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) Sequenz durch ein mitgeliefertes Primerpaar amplifiziert werden.

6.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Spezifische Sequenzen von Zielgenen wurden mithilfe der PCR amplifiziert. Hierzu setzte ich cDNA in einer Reaktion zusammen mit dNTP (Fermentas, Sankt Leon-Rot, Deutschland), einem für das Zielgen spezifischen Primerpaar (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland) und Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Fermentas, Sankt Leon-Rot, Deutschland) ein.

1x Reaktionsansatz:

1x	10x Reaktionspuffer
2,5 mM	Magnesiumchlorid
0,2 mM	dNTPs
0,2 µM	Forward Primer
0,2 µM	Reverse Primer
1,25 U	Taq-Polymerase
100 ng	Template cDNA
auf 25 µL	Nuklease-freies Wasser

Das verwendete Thermocyclerprogramm im Mastercycler epGradient (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) war folgendermaßen eingestellt:

- 1.) 10 Minuten bei 95°C
- 2.) 15 Sekunden bei 95°C
- 3.) 60 Sekunden bei 60°C
- 4.) 30 Sekunden bei 72°C
- 5.) 60 Sekunden bei 72°C

Die Schritte 2.) bis 4.) wurden in 40 Zyklen wiederholt.

Die Amplifikate wurden bei 4°C gelagert.

6.2.1.4 Relative Quantifizierung von Zielgenen mittels RealTime-PCR

Zielgene wurden in einer RealTime-PCR-Reaktion amplifiziert und in einem ABI PRISM ® 7500 fast real time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) quantifiziert. Zur Detektion der Sequenzen nutzte ich den Maxima SYBR Green/Rox Mastermix (Fermentas, Sankt Leon-Rot, Deutschland). Der Cyanin-Farbstoff SYBR Green interkaliert mit doppelsträngiger DNA, so dass die amplifizierten Fragmente Licht einer Wellenlänge von 521 nm emittieren. In den Reaktionsansätzen setzte ich zielgenspezifische Primerpaare (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland) ein.

1x Reaktionsansatz:

1x	Maxima SYBR Green Mastermix
0,2µM	Forward Primer
0,2µM	Reverse Primer
100ng	Template cDNA
auf 25µL	Nuklease-freies Wasser

Das verwendete Thermocyclerprogramm im ABI PRISM ® 7500 fast real time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) war wie folgt angelegt:

- 1.) 10 Minuten bei 95°C
- 2.) 15 Sekunden bei 95°C
- 3.) 60 Sekunden bei 60°C
- 4.) 15 Sekunden bei 95°C
- 5.) 30 Sekunden bei 60°C
- 6.) 15 Sekunden bei 95°C

Die Schritte 2.) bis 3.) wurden in 40 Zyklen wiederholt. Während Schritt 3.) wurde die Amplifikatmenge photometrisch bestimmt. In den Schritten 4.) bis 6.) wurde die DNA zur Erstellung einer Schmelzkurve dissoziiert.

Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Proben wurden zu dem Referenzgen β -Actin normalisiert und mittels Delta-Delta Cycle_{Threshold} ($\Delta\Delta C_T$) Methode (Pfaffl, Nucleic Acids Res. 2001) relativ zueinander quantifiziert. Die Amplifikate wurden bei 4°C gelagert.

6.2.1.5 Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Zur Kontrolle der Amplifikatgrößen nach PCR- und RealTime-PCR-Reaktionen wurden DNA-Proben auf einem Agarosegel aufgetrennt. Hierzu löste ich 2 % (w/V) Agarose NEEO Ultra (Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland) in Rotiophorese® 10x TAE-Puffer (Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland) durch Aufkochen. Ich versetzte das Gel mit 0,75 µg/ml Ethidiumbromid (Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland), das in doppelsträngige DNA interkaliert und Licht bei 300 nm Wellenlänge emittiert. Die 25 µl PCR-Ansätze wurden mit 5 µl 6x DNA Probenpuffer versetzt. In die Geltasche pipetierte ich 25 µL. Die Amplifikate wurden in TAE-Puffer (Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland) bei einer Stromstärke von 90 bis 120 Volt für 30 bis 45 Minuten aufgetrennt. In einem Gene Genius Bio Imaging System (Syngene, Cambridge, UK) fotografierte ich das UV-Licht bestrahlte Gel und speicherte eine digitales Bild des Gels, um mittels Vergleich zu der ebenfalls aufgetrennten MassRuler DNA Ladder (Fermentas, Sankt Leon-Rot, Deutschland) die Größe der amplifizierten RNA zu bestimmen und mit den bekannten Größen der Zielgene zu vergleichen.

6.2.1.6 Herstellung eines Gesamt-Proteinextrakt aus tierischen Zellen

LA4 Zellen, eine murine Epithelzelllinie mit Charakteristika von AECII (beschrieben in Abschnitt 6.2.2.1), nahm ich in 0,1 bis 1 mL Lysispuffer auf. Der Lysisverdau wurde 5 Sekunden gevortext und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend bestimmte ich die Proteinmenge (beschrieben in Abschnitt 6.2.1.7).

6.2.1.7 Proteinmengenbestimmung mit Bicinchinonsäure (BCA)-Kit

In 96-Well Microwell-Platten wurde die Proteinmenge mithilfe des Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) bestimmt. Bei diesem Assay werden zweiwertige Kupferionen in alkalischem Milieu durch Proteine reduziert. BCA bildet mit den einwertigen Kupferionen einen Komplex, der bei einer Wellenlänge von 562 nm spektralphotometrisch detektiert werden kann. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe aus 0-2000 µg/ml BSA (Sigma-Aldrich, München, Deutschland). Ich führte alle Messungen der Proben und des Standards jeweils als Doppelbestimmungen durch. Dazu gab ich jeweils 200 µl einer 50:1-Mischung BCA-Reagenz mit 4 % Kupfersulfat zu 25 µl Probe oder Standard und inkubierte die Ansätze bei 37°C für 30 Minuten. Die Messung erfolgte im Infinite M200 Multiwell-Reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) bei 562 nm. Die Konzentration ermittelte ich mittels linearer Regression der Standardreihe.

6.2.1.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen nach Größe nutzte ich die Elektrophorese in einem SDS-Polyacrylamidgel. Ich versetzte 20 µL Zellysat mit 4 µL 6x SDS-Probenpuffer, denaturierte die Probe für 15 Minuten bei 70°C im Heizblock Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und lagerte sie anschließend auf Eis. 50-150 µg des Proteins trennte ich in einem diskontinuierlichen SDS-Acrylamidgel der Größe nach auf. Das Acrylamidgel setzte sich aus einem engmaschigen Trenngel, das von einem weitporigen Sammelgel überschichtet wurde, zusammen.

Zusammensetzung:

Sammelgel (3,75 %)

125 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
0,1 %	SDS
3,75 %	Acrylamid
0,1 %	APS
2,5 µL	TEMED

Trenngel (8%)

375 mM	Tris-HCl (pH 8,8)
0,1 %	SDS
8 %	Acrylamid
0,2 %	APS
6 µL	TEMED

An das Gel legte ich eine Spannung von 100 Volt (V) an, bis die Proben das Sammelgel passiert hatten. Danach wurden die Proben bei 200 V im Trenngel 60 Minuten aufgetrennt.

6.2.1.9 Western Blot

Zum Transfer von Proteinen aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) nutzte ich ein Tank-Blotting Verfahren. Mittels eines Spannungsfelds senkrecht zu Gel und Membran wurden die Proteine innerhalb von 60 Minuten bei einer Stromstärke von 1,2 V pro cm^2 (V/cm^2) auf die Nitrozellulosemembran (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) übertragen. Die Proteine binden durch hydrophobe Wechselwirkungen an der Oberfläche der Nitrozellulosemembran (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland). Um freie Bindungsstellen zu blockieren, schwenkte ich die Membran für 1 Stunde in TBS-T mit 5 % SlimFast. Die Inkubation mit dem biotin-konjugierten Primärantikörper α -CD124 (RnD Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) erfolgte über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln. Nachdem ungebundener Primärantikörper gründlich von der Membran gewaschen wurde, erfolgte die Inkubation mit Peroxidase gekoppeltem Streptavidin (RnD Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) für 1 Stunde. Mithilfe eines ECL-Kit (Amersham, München, Deutschland) und einem Röntgenfilm (Kodak, Stuttgart, Deutschland) detektierte ich die Proteine auf dem Gel.

6.2.1.10 Mikroarrayanalyse

Am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH wurden AECII, wie in Abschnitt 6.2.3.4 beschrieben, mittels Durchflusszytometrie isoliert. Hier wurde aus den isolierten Zellen die Gesamt-RNA isoliert (beschrieben in Abschnitt 6.2.1.1). Die Qualität und Integrität der RNA wurde mithilfe eines Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies; Waldbronn) überprüft. 500 ng RNA wurden mit dem GeneChip® 3' IVT Express Kit (Affymetrix, Santa Clara, USA) in biotinylierte komplementäre RNA (cRNA) umgeschrieben, die fragmentiert mit dem Affymetrix GeneChip MOE430 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, USA) hybridisiert wurde. Hierfür synthetisierte man zuerst in einer Reversen Transkriptionsreaktion ein Einzelstrang cDNA. In einer Reaktion mit einer DNA Polymerase und einer RNase H wurde gleichzeitig der Zweitstrang DNA synthetisiert und die RNA im Ansatz degradiert. Die doppelsträngige DNA schrieb man durch *in vitro* Transkription in biotin-modifizierte cRNA um. Nicht gebundene Nukleotide, Salze, Enzyme und anorganische Phosphate wurden vom cRNA Ansatz abgetrennt. 7,5 µg der aufgereinigten cRNA wurde nach Angaben des Herstellers bei 94°C fragmentiert und zusammen mit 4 biotinylierten Hybridisationskontrollen (BioB, BioC, BioD, Cre) in einem Hybridisations-Cocktail eingesetzt. Die Proben hybridisierte man 16 Stunden mit Affymetrix GeneChips MOE430 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, USA) der gleichen Lots bei 45°C. Wasch- und Streptavidin-PE-Färbeschritte wurden automatisch an einer Fluidics Station 450 nach dem Protokoll mini_euk2v3_FS450 (Affymetrix, Santa Clara, USA) durchgeführt. Die Bildanalyse erfolgte an einem GCS3000 Scanner mit der Software GCOS1.2 (Affymetrix, Santa Clara, USA). Alle hier beschriebenen Arbeitsschritte führte Dr. Robert Geffers am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH in Braunschweig durch.

Für die Genexpressionsanalyse mittels Microarray-Technologie wurden AECII aus Tieren isoliert, die aus zwei unabhängigen Studien stammen, die ich an der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt habe. Zuerst wurde eine Voranalyse nach bereits etablierten Algorithmen durch Dr. rer. nat. Hellmuth Meyer, Urologie, Charité Berlin durchgeführt (Dittrich et al., Eur.Respir.J. 2010; Dittrich et al., Clin.Exp.Allergy 2010). Anschließend zog ich für die weitere Analyse nur Gene heran, die in beiden Versuchen mindestens 2-fach reguliert waren.

6.2.2 Zellkultur

6.2.2.1 Kultivierung primärer muriner Zellen und muriner Zelllinien

Alle Zelllinien und primäre Zellen kultivierte ich bei 37°C, 5 % CO₂ im CO₂-Inkubator MCO-18AC (Sanyo E&E Europe BV, Loughborough, UK). Primäre Splenozyten, CD4⁺ TC, knochenmarkgenerierten DC sowie LA4 Zellen im Ko-Kultur-System wurden in RPMI 1640 (Lonza, Köln, Deutschland) mit 10 % FCS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), 2 mM L-Glutamin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), 100 U/mL Penicillin, 0,1 mg/mL Streptomycin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) und 71,5 µM β-Mercaptoethanol (Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland) kultiviert.

Die Zelllinie LA4 kultivierte ich in F12K Nutrient Mixture (Lonza, Köln, Deutschland) mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), 100 U/mL Penicillin und 0,1 mg/mL Streptomycin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland). Diese in den Kulturen verwendete Epithelzelllinie zeigen Charakteristika von AECII (Stoner et al., Cancer Res. 1975). Zwei bis dreimal pro Woche passagierte ich die LA4 Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:3. Hierzu wurden das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 10-30 mL PBS (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) gewaschen. Nach Entfernen des PBS (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) gab ich 0,03 bis 0,04 ml/cm² Trypsin/EDTA (PAA, Pasching, Deutschland) auf die Zellen und inkubierte für 3 Minuten im Brutschrank. Durch Zugabe von vier Volumen Kulturmedium inaktivierte ich das Trypsin/EDTA (PAA, Pasching, Deutschland). Die Zellen teilte ich anschließend auf 2 oder 3 Flaschen auf und füllte sie mit 10 mL (T-25) bis 60 mL (T-175) Kulturmedium auf. Zur Kultivierung in Multiwell-Platten (TPP, Trasadingen, Schweiz) bestimmte ich die Zellzahl und säte 1x10⁵ Zellen/1,8 cm² aus.

6.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von LA4 Zellen

Zum Einfrieren zentrifugierte ich die LA4 Zellen nach Ablösen 5 Minuten bei 1200 Upm. Das Zellpellet resuspendierte ich in 1 mL Einfriermedium (FCS mit 10 % DMSO (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)) und überführte sie in Cryo Röhrchen (NUNC A/S, Roskilde, Denmark). Die Gefrier Röhrchen wurden für 12 Stunden bei -20°C aufbewahrt und dann in flüssigem Stickstoff (Linde Gas, Pullach, Deutschland) oder einer -150°C Kühltruhe gelagert.

Zum Auftauen gab ich die Gefrierröhrchen in ein 37°C warmes Wasserbad (GFL, Burgwedel, Deutschland). Die Zellen wurden in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt und mit F12K Nutrient Mixture (Lonza, Köln, Deutschland) mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), 100 U/mL Penicillin und 0,1 mg/mL Streptomycin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) gewaschen. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 1200 Upm nahm ich die Zellen in F12K Nutrient Mixture (Lonza, Köln, Deutschland) mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), 100 U/mL Penicillin und 0,1 mg/mL Streptomycin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) auf und kultivierte sie in einer Zellkulturflasche.

6.2.2.3 Generierung von dendritischen Zellen aus murinem Knochenmark

Zur Entnahme des Knochenmarks aus Tibia und Femur der hinteren Extremitäten der Maus trennte ich das Bein im Hüftgelenk ab und löste Sehnen und Muskelfasern vom Knochen. Mit einer sterilen Kanüle (24G x 1'') (Braun, Melsungen, Deutschland) wurde das Knochenmark mit RPMI 1640 mit 5 % FCS vom distalen und proximalen Ende des Knochen aus der Markhöhle herausgespült. Die Zellen wurden in RPMI 1640 mit 5 % FCS gewaschen. Anschließend kultivierte ich 4×10^5 Zellen/mL in Petrischalen mit unbehandelter Oberfläche. Das Kulturmedium war Vollmedium, das 2,5-5 % (in Vorexperimenten anhand der CD11c-Expression austitriert) eines Zellkulturüberstands einer GM-CSF sezernierenden B-Zelllinie (J558L, (Qin et al., J.Immunol. 1997)) enthielt. Nach 3 Tagen setzte ich den Kulturen 1 Volumen RPMI 1641 Vollmedium mit GM-CSF in identischer Konzentration zu. Nach weiteren 3 Tagen gewann ich die nicht-adhärenenten Zellen durch Abnehmen des Überstands und anschließendem Waschen mit 10 mL eiskaltem PBS (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), zentrifugierte und zählte sie.

6.2.2.4 Herstellung von Einzel-Zellsuspensionen aus murinen Lungen

Am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH wurden Einzelzellsuspensionen für die fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung mittels eines MoFlow CellSorter nach einem etablierten Protokoll (Gereke et al., Am.J.Respir.Crit Care Med. 2009) hergestellt. Die Mäuse wurden hierfür nach CO₂-Narkose ausgeblutet, indem die Vena cava und die linke renale Arterie durchtrennt wurde. Man legte die Trachea frei und punktierte sie anschließend mit einer Kanüle (Braun, Melsungen, Deutschland). Durch die Pulmonararterie perfundierte man die Lunge mit 10 bis 20 mL PBS (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), um kontaminierende Zellen aus der Blutzirkulation zu entfernen. Durch die Kanüle in der Trachea wurden 2 mL Dispase (BD Biosciences, San Jose, USA) gegeben, gefolgt von 0,5 mL einer 1 % Low-melt Agaroselösung (Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland), die

zuvor auf 45°C erwärmt wurde. Damit die Agarose sofort polymerisiert, wurden die gefüllten Lungen für 2 Minuten auf Eis gelegt. Anschließend wurden die Lungen in 1 mL Dispase gegeben und für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lungen wurden in eine Kulturschale gegeben und in 7 mL serum-freiem DMEM-Medium (Lonza, Köln, Deutschland), das 25mM HEPES (GIBCO, Eggenstein, Deutschland) und 100 U/mL DNase I (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) enthielt, aufgenommen. Mit einer Pinzette zupfte man das Gewebe vorsichtig auseinander, bevor die Zell-Gewebe-Lösung für 10 Minuten auf einem Schüttler gemischt wurde. Den Gewebeaufschluss erreichte man, indem die Lösung mehrmals durch Nylongaze mit geringer werdender Maschengröße (100 µm, 45 µm, 30 µm) gefiltert wurde. Durch Zentrifugation für 12 Minuten bei 130 x g wurden die Zellen pelletiert. Diese Schritte wurden alle durch Dr. Marcus Gerecke und Andrea Autengruber in den Örtlichkeiten der Arbeitsgruppe Bruder am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH durchgeführt.

6.2.2.5 Isolation von murinen Splenozyten

Ich tötete Mäuse nach CO₂-Narkose durch zervikale Dislokation. Den Tieren entnahm ich die Milz, die in RPMI-Medium mit 5% FCS aufgenommen wurde. Zwischen zwei Objektträgern wurde die Milz vorsichtig zerdrückt, um eine Einzel-Zellsuspension herzustellen. Durch aufeinanderfolgende Behandlungen mit DNase I und Inkubation in Hämolyse-Puffer entfernte ich DNA und Erythrozyten, ließ die Zellen anschließend pelletieren und zählte sie nach Aufnahme in RPMI-Medium mit 5% FCS.

6.2.2.6 Zellzahlbestimmung vitaler Zellen

Die Zellzahl von Zellsuspensionen bestimmte ich, indem Aliquots in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:10 mit Trypanblau (Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland) verdünnt und mithilfe einer Neubauer-Zählkammer (Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland) gezählt wurden. Die Zellzahl bestimmte ich mathematisch anhand des Kammerfaktors.

6.2.3 Immunologische Methoden

6.2.3.1 Anreicherung von CD4⁺ Primärzellen aus murinen Splenozyten

CD4⁺ TC reinigte ich aus Splenozyten der Mausstämmen DO11.10 oder OT-II durch Negativselektion auf. In der Zellsuspension, die gemäß 6.2.2.5 gewonnen wurde, markierte ich zunächst alle Zellen mit Antikörpern gegen MHCII(212.A1), CD8 (TIB 105), CD45R (TIB 164) und FcR (2.4G2) durch 30 Minuten Inkubation auf Eis. Bei der Aufreinigung von Zellen aus der Milz von C57BL/6 wurde zudem mit Antikörper gegen NK1.1 (HB191) behandelt. Alle genannten Antikörper waren entweder IgG aus Maus oder Ratte. Die Zellsuspension wurde anschließend 30 Minuten mit magnetischen BioMag[®] Ziege anti-Maus IgG und BioMag[®] Ziege anti-Ratte IgG (Polysciences Inc., Eppelheim, Deutschland) Partikeln inkubiert, die an (Zweit-) Antikörper gebunden sind, die spezifisch IgG aus Maus oder Ratte binden. Aufgrund der Magnetpartikelmarkierung der Zweitantikörper können die Zellen, die mit den Antikörpern markiert wurden, durch eine nachfolgende 15-minütige Inkubation auf einer BioMag[®] Flask Separator Platte (Polysciences Inc., Eppelheim, Deutschland) selektiv an die Platte binden. Zellen, die nicht an die Platte gebunden hatten, entfernte ich durch Abnahme des Überstands. Durch Entfernung der Platte wurden die antikörperbindenden Zellen erneut frei. Sie wurden einem Waschschrift mit RPMI unterzogen und dann erneut auf die Magnetplatte gegeben, von der man den Überstand erneut entfernte. Beide gewonnenen Überstände wurden vereint, pelletiert und gezählt. Die Reinheit der CD4⁺ Zellen in der Zellsuspension bestimmte ich durchflusszytometrisch. Ein Aliquot der Zellen wurde mit fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt und auf den Anteil von CD4⁺ Zellen und spezifischen TCR hin untersucht. Erfolgte die Aufreinigung aus DO11.10 Tieren, so erfolgte die Anfärbung mit biotinylierten mKJ1-26 (KJ1-26), einem Antikörper, der spezifisch ist für den transgenen TCR dieser Mäuse und FITC-konjugierten mCD4 (RM4-5), um den Anteil transgener OVA-spezifischer CD4⁺ TC zu bestimmen. Bei Aufreinigungen aus OT-II Tieren wurde die Ausbeute an OVA-spezifischen CD4⁺ Zellen durch Färbung mit einem Antikörper spezifisch für die V β -Untereinheiten 5.1 und 5.2 des TCR (MR9-4) und die V α 2-Untereinheit des TCR (B20.1) gemessen, da die transgenen TC diese V-Ketten Kombination exprimieren. Nach der Messung zeigte sich, dass typischerweise 55-70 % aller aufgereinigten Zellen sowohl CD4 und den OVA-spezifischen T Zellrezeptor trugen. Die Reinheit der Zellsuspension an OVA-spezifischen T Zellen lag entsprechend bei insgesamt 55-70 %. Alle für die Anreicherung und Färbung verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5 aufgelistet.

6.2.3.2 Anreicherung von antigenpräsentierenden Zellen aus murinen Splenozyten

Zur Antigen-Präsentation in einem Kultursystem, das unabhängig von DC ist, verwendete ich Splenozyten aus Wildtyp BALB/c oder C57Bl6. Für die Kultur mit CD4⁺ TC aus DO11.10 Mäusen wurden kongene Splenozyten aus Wildtyp BALB/c Tieren gewonnen. Für die Kultur mit TC aus OT-II-Tieren reinigte man die Splenozyten aus kongenen C57BL/6 auf.

Die Splenozyten befreite ich von TC, indem ich sie zunächst 30 Minuten mit Antikörpern gegen CD4 (GK1.5) und CD8 (TIB 105) markierte. Die derart markierten Zellen lysierte ich durch Zugabe von Hasenkomplement. Zeitgleich erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit 0,05 mg/mL Mitomycin C (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), um die Proliferation der Splenozyten zu verhindern. Die Reinheit der TC-depletierten Splenozyten bestimmte ich durchflusszytometrisch. Hierfür färbte ich ein Aliquot der aufgereinigten Zellen mit Antikörpern gegen CD4 und MHCII und untersuchte sie auf den Anteil von CD4⁻ und MHCII⁺ Zellen. Typischerweise trugen bei dieser Analyse 60-70 % aller Zellen in der Suspension nach Aufreinigung MHCII und kein CD4. Ich konnte somit CD4-depletierte Splenozyten mit einer Reinheit von 60-70 % aufreinigen. Alle für die Anreicherung und Färbung verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5 aufgelistet.

6.2.3.3 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)

Die Expression von Oberflächen- oder intrazellulären Proteinen in Einzelzellsuspensionen untersuchte ich mittels Durchflusszytometrie.

Für die Färbung zentrifugierte ich $0,3-1 \times 10^5$ Zellen in FACS Analyseröhrchen (BD Biosciences, San Jose, USA). Inkubationsschritte wurden ausschließlich bei 4°C unter Lichtabschluss durchgeführt. Unspezifische Antikörperbindungen an Fc-Rezeptoren blockierte ich, indem ich die Zellen vor der Antikörperinkubation 20 Minuten mit 50 µL anti-Fc-Rezeptor-Antikörper (2.4G2, = Fc-Block) in FACS-Puffer inkubierte. Zwischen der Inkubation mit Fc-Block (2.4G2) und der nachfolgenden Antikörperinkubation wurde nicht gewaschen, sondern die Zellen lediglich bei 1200 U/pm zentrifugiert und der Fc-Block abgegossen.

Für die Anfärbung von Oberflächenmarkern erfolgte anschließend die Inkubation mit entsprechenden in FACS-Puffer verdünnten Antikörpern für 20 Minuten. Die darzustellenden Epitope markierte ich direkt durch Antikörper, die an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt waren. Alternativ markierte ich Oberflächenproteine indirekt mit biotin-gekoppelten Antikörpern, die in einem weiteren Schritt durch streptavidin-konjugierte Fluoreszenzfarbstoffe sichtbar gemacht wurden. Zwischen den einzelnen

Arbeitsschritten wusch ich die Zellen jeweils zweimal mit 200 µL FACS-Puffer, zentrifugierte sie bei 1200 Upm für 5 Minuten und verwarf den Überstand.

Für die Färbung von intrazellulären Proteinen mussten die Zellen nach Färbung der Oberflächenmarker permeabilisiert und fixiert werden, bevor ich sie mit Antikörpern gegen intrazelluläre Proteine inkubierte. Hierfür wurde das Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience, Frankfurt, Deutschland) verwendet. Die Färbung führte ich nach Angaben des Herstellers durch. Hierfür wurden die Zellen nach der Färbung von extrazellulären Molekülen für 30 Minuten in Fixations/Permeabilisierungs-Puffer (eBioscience, Frankfurt, Deutschland) bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die unspezifischen Fc-Rezeptorbindungsstellen, wie bei der extrazellulären Färbung mit Antikörper des Klons 2.4G2 blockiert. FoxP3 wurde intrazellulär gefärbt durch 30 Minuten Inkubation mit Allophycocyanin-konjugierten Antikörper spezifisch für FoxP3 (FJK-16s). Wie beschrieben wurden die Zellen zwischen den Arbeitsschritten zweimal gewaschen. Bei den intrazellulären Färbeschritten wusch ich in 200 µL Wash/Perm-Puffer (eBioscience, Frankfurt, Deutschland). Fc-Block und Antikörperverdünnung setzte ich auch in diesem Puffer an. Alle für die Färbung verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Alle Antikörper wurden vor Verwendung titriert, um optimale Färbeergebnisse zu erhalten. Um die Spezifität der Antikörperbindung an ein Antigen zu kontrollieren und die unspezifische Autofluoreszenz von Zellen zu berücksichtigen, wurden Färbungen mit unspezifisch bindenden Isotypkontrollen der verwendeten Antikörper durchgeführt. Diese stimmen in Immunglobulin-Isotyp und konjugiertem Fluoreszenzfarbstoff mit dem verwendeten Antikörper überein.

Die Messung erfolgte an den Durchflusszytometern LSRII oder FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, USA) unter Verwendung der Aufnahme-Software FACSDiVa (LSRII) oder CellQuest Pro (FACSCalibur). Die Auswertung wurde mit dem Softwareprogramm FlowJo Version 8.8.7 (TreeStar Inc., Ashland, USA) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch die Angabe des prozentualen Anteils positiver Zellen für ein bestimmtes Antigen oder über die geometrische mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), als Maß für die Expressionsstärke eines Antigens.

6.2.3.4 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung zur Isolation von AECII

In Zusammenarbeit mit unserer Kooperationspartnerin Prof. D. Bruder am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) wurde aus Einzelzellsuspensionen von murinen Lungen mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung AECII isoliert. Hierfür wurden die Einzelzellsuspensionen von murinen Lungen (Isolation s. 6.2.2.4) mit serumfreiem DMEM mit 25 mM HEPES gewaschen und anschließend mit Antikörpern gegen die Oberflächenproteine CD45 (30-F11), CD32/CD16 (2.4G2), CD11b (M1/70), F4/80 (BM8) (alle Antikörperklone aus der Ratte gewonnen) und einem PE-konjugierten Sekundäntikörper aus der Ziege markiert, der spezifisch Immunglobuline aus der Ratte bindet. Nach der Färbung nahm man die Zellen in PBS mit 2% fötalem Kälberserum (FCS) und 2 mM EDTA auf. Die Zellen wurden mit einem MoFlow Cell Sorter (Cytomation, Fort Collins, USA) sortiert. Als AECII wurde eine granuläre Population durch die starke Seitenstreuung des Lichts definiert. PE (CD45, CD32/CD16, CD11b, F4/80)-positive Zellen wurden mittels einem Argon Ionen Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und das emittierte Licht wurde mit einem Bandpassfilter von 580 nm \pm 30 nm gemessen. In einem Analysefenster trug man die Seitenstreuung gegen die Fluoreszenzintensität von Phycoerythrin (PE) auf, um eine PE-negative Population mit hoher Seitenstreuung als AEC II zu identifizieren. Die Zellen wurden in einer Flusskammer mit einer 100 μ m Düsen Spitze unter einem Druck von $1,7237 \times 10^5$ Pa getrennt. Mit diesem Protokoll konnte eine Suspension an AECII aufgereinigt werden, in der ausgehend von Granularität und Oberflächenmolekülen 97-99 % der aufgereinigten Zellen AECII waren. Die Zellen verfügen über eine Vitalität von 90%. Die Zellen wurden für die Isolation von Gesamt-RNA genutzt. Alle Arbeiten wurden in der Arbeitsgruppe Bruder am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH durch Dr. Marcus Gerecke und Andrea Autengruber durchgeführt.

6.2.3.7 Messung der T-Zell Proliferation

Um die Proliferation einer TC-Kultur mit einem Durchflusszytometer zu messen, markierte ich angereicherte CD4⁺ Zellen mit CFSE (eBiosciences, Frankfurt, Deutschland). Hierfür wurden die Ausgangszellen, die gemäß 6.2.3.1. gewonnen wurden, zunächst mehrmals in PBS mit 0,1% BSA gewaschen. Die Zellen wurden in PBS/ 0,1% BSA mit 5 μ M CFSE (eBiosciences, Frankfurt, Deutschland) für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Das CFSE (eBiosciences, Frankfurt, Deutschland) wird in die Zellen aufgenommen und bindet kovalent an Moleküle im Zytoplasma, die über eine Amin-Gruppe verfügen. Die Markierung der Zellen stoppte ich durch Zugabe von eiskaltem LA4 Vollmedium. Durch mehrmaliges Waschen entfernte ich nichtgebundenes CFSE im Überstand. Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden in Kulturen mit antigenpräsentierenden Zellen eingesetzt. Bei einer Zellteilung werden die carboxyfluorescein-markierten Moleküle auf die Tochterzellen

aufgeteilt, so dass die Fluoreszenzintensität abnimmt. Diese Abnahme der Fluoreszenzintensität lässt sich bei einer Wellenlänge von 518 nm durchflusszytometrisch bestimmen.

6.2.3.5 Nachweis von Zytokinen und Immunglobulinen mittels ELISA

Zum quantitativen Nachweis von Zytokinen und antigen-spezifischen Immunglobulinen in Zellkulturüberständen oder Blutseren wurde die ELISA genutzt. Für den Nachweis von OVA-spezifischem IgE, -IgG1 und -IgG2a verwendete ich unterschiedliche Protokolle, die hier aufgeführt werden. Bei allen Protokollen wurden die Proben zwischen den Arbeitsschritten dreimal mit 300 µL PBS mit 0,05 % Tween 20 gewaschen. Zwischen der Blockierung unspezifischer Bindungen auf der Platte und dem Auftragen der Proben und dem Standard wusch ich jedoch nicht, sondern verwarf nur den Blockierungspuffer. Alle Standards und Proben trug ich in Doppelbestimmungen auf.

Für den Nachweis von antigenspezifischen Immunglobulinen der Isotypen IgG1 und IgG2a in Blutseren beschichtete ich 96-Well Multiwellplatten MaxiSorp (NUNC A/S, Roskilde, Denmark) mit 100 µL (5 µg/Vertiefung) OVA (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) in Carbonatpuffer bei 4°C über Nacht. Freie Bindungsstellen sättigte ich mit 1 % BSA (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) in PBS für 1 Stunde bei 37°C ab. Nach dem Verwerfen des Blockingpuffers trug ich 100 µL Proben und Standards auf. Von den Proben wurde in PBS mit 1 % BSA und 0,1 % Tween 20 eine 1:100-, 1:1000-, 1:10000- und 1:100000-Verdünnung hergestellt. Der Standard von IgG1 und IgG2a wurde 1:1000 verdünnt (entspricht bei IgG1: 20 ng/mL und IgG2a: 1000 U/mL) Durch 1:2-Verdünnungen wurde eine 8-Punkt Verdünnungsreihe erstellt. Proben und Standard inkubierte ich für 1 Stunde bei 37°C unter Lichtausschluss. Anschließend gab ich 100 µL einer 1:1000 Verdünnung eines Antikörpers α -IgG1 (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) oder α -IgG2a (BD Biosciences, San Jose, USA) in die Vertiefungen und ließ sie für 1 Stunde bei 37°C binden. Abschließend inkubierte ich mit einer Streptavidin-konjugierten Meerrettich-Peroxidase (RnD Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) für 30 Minuten bei 37°C.

Zur Quantifizierung von antigenspezifischen Immunglobulinen des Typ E im Blutserum beschichtete ich 96-Well Multiwellplatten MaxiSorp (NUNC A/S, Roskilde, Denmark) mit 100 µL α -IgE Antikörper (BD Bioscience, San Jose, USA) in Carbonatpuffer über Nacht bei 4°C. Freie Bindungsstellen sättigte ich mit Assay Diluent (BD Biosciences, San Jose, USA) für 3 Stunden bei Raumtemperatur ab, bevor in 100 µL in Assay Diluent (BD Biosciences, San Jose, USA) verdünnte Proben und der Standard auf die Platte aufgetragen wurden. Die Proben trug ich in 1:10-, 1:20-, 1:40- und 1:80-Verdünnungen auf. Der Standard von IgE wurde 1:100 verdünnt (entspricht pro mL 500 Einheiten IgE einer laborinternen relativen Größe, die jeweils immer wieder neu in hyperimmunisierten Tieren am alten Standard orientierend determiniert wird.) Durch

1:2-Verdünnungen wurde eine 8-Punkt Verdünnungsreihe erstellt. Proben und Standard ließ ich für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss binden. Anschließend wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 50µL digoxygeniertes OVA (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) inkubiert. Zur Detektion wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 50µL einer 1:2000-Verdünnung eines α -DIG-OVA Antikörper (Roche, Mannheim, Deutschland), an den eine Meerrettich-Peroxidase gebunden ist, inkubiert. Alle verwendeten Antikörper werden in Tabelle 5 aufgeführt.

Die quantitative Analyse der obigen Assays basierte jeweils auf einer kolorimetrischen Reaktion zwischen einer Meerrettich-Peroxidase (HRP) und 100 µL Tetramethylbenzidin Substrat (TMB) (Biotrend, Köln, Deutschland). Die Reaktion fand 30 Minuten unter Lichtausschluss statt und wurde anschließend durch Zugabe von 50 µL 2 normaler (N) Schwefelsäure (Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland) gestoppt. Die Extinktion des entstandenen Farbstoffs, welcher proportional zur gebundenen Antikörpermenge und damit auch proportional zum Analyt ist, wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzfilter: 540 nm) in einem Infinite M200 Multiwell-Reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) bestimmt.

Die gemessenen OD-Werte wertete ich zuerst mithilfe des Programms Office Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) aus. Anhand der OD-Werte von Vertiefungen, die mit Diluent an Stelle von Probe inkubiert wurden (Null-Wert) konnte das Detektionslimit festgelegt werden. Alle OD-Werte, die niedriger als der Leerwert plus die dreifache Standardabweichung zwischen zwei Leerwerten lagen, wurden nicht ausgewertet.

Mit den Proben wurde titriertes Serum von hyperimmunisierten Tieren als Standard aufgetragen. Im Fall von OVA-spez. IgG1 und IgG2a wurde die Menge der enthaltenen IgG1- und IgG2a-Antikörper initial durch Vergleich mit einem kommerziell erhältlichen Standard verglichen. Neue Hyperimmunseren wurden jeweils mit dem ersten Standard verglichen, um Absolutwerte berechnen zu können. Im Fall von OVA-spez. IgE erfolgte mangels kommerziell erhältlichen Standards lediglich eine Angabe in relativen Einheiten, die allerdings durch Vergleiche der Hyperimmunseren einen laborinternen Standard darstellen. Die Seren wurden in 1:2 Schritten verdünnt, so dass eine Standardkurve mit 8 Messpunkten erstellt werden konnte. Anhand dieser Standardkurve wurden die OD-Werte mithilfe des graphischen Auswertungsprogramms Prism (Graphpad Software Inc., La Jolla) durch nicht-lineare Regression in Konzentrationsangaben oder relative Einheiten transformiert.

6.2.4 Tierexperimentelle Methoden

6.2.4.1 Haltung und Behandlung von Versuchstieren

Für die Experimente, die dieser Arbeit zugrunde liegen, verwendete ich Mäuse der in Tabelle 10 aufgeführten Stämme. Die Tiere wurden entweder über die Firma Charles River, Köln, Deutschland bezogen (Stämme BALB/c, C57BL/6, BALB/c-DO11.10, C3H/HeJ) oder von der Arbeitsgruppe selbst gezüchtet (Stämme Calpha/DO11.10, OT-II). Die Tiere hielt unsere Arbeitsgruppe in den tierexperimentellen Einrichtungen des zentralen Tierlabors der Medizinischen Hochschule Hannover in Gruppen von 4-6 Tieren pro Käfig. Sie waren einem 12-stündigen Tag-Nacht-Zyklus unterworfen und hatten freien Zugang zu Wasser und ovalbumin-freiem kommerziellen Mäusefutter. Die Behandlung der Tiere erfolgte im Rahmen des vom niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) Dezernat 33 / Tierschutz genehmigten Tierversuchsvorhabens „in Vitro und in Vivo Analyse der Rolle von IL-4 und IL-17 bei der erleichterten Zweitsensibilisierung“ (AZ 07-1369). Verwendet wurden 8-12 Wochen alte weibliche Tiere.

6.2.4.2 Betäubung durch Isofluran-Narkose

Die Versuchstiere wurden für die intranasale Applikation von Antigen durch ein 3-5 % Isofluran/Sauerstoff-Gemisch (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) anästhesiert. Hierzu begaste ich die Mäuse in einer 2 L Induktionskammer durch einen Vaporisator. Diese Methode anästhesiert die Tiere für 1-3 Minuten.

6.2.4.3 Tötung der Tiere

Zur Entnahme von Gewebeflüssigkeiten (Blutserum, Bronchoalveolare Lavage) und Organen (Lungen, Milz) wurden die Tiere mit CO₂-Gas betäubt und durch zervikale Dislokation getötet.

6.2.4.4 Intranasale Verabreichung von Antigen

Während die Tiere anästhesiert in meiner Hand lagen, verabreichte ich mithilfe einer 200 µL Gilsonpipette (Gilson Inc., Middletown, USA) die Antigenlösung tröpfchenweise in die Nasenlöcher der Tiere. Innerhalb von 10 bis 30 Sekunden atmeten die Tiere die Flüssigkeit ein. Anschließend legte ich die Tiere in den Käfig zurück und beobachtete sie, bis sie aus der Narkose erwachten. Die

verwendeten Konzentrationen sind im Abschnitt „Sensibilisierung und Provokation von C3H/HeJ Mäusen“ aufgeführt.

6.2.4.5 Sensibilisierung und Provokation von C3H/HeJ Mäusen

Um einen asthmatischen Phänotyp durch „IL-4 abhängige pulmonale Sensibilisierung“ hervorzurufen, wurden 8-12 Wochen alte Weibchen des Mausstamms C3H/HeJ an drei aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 0,1,2) mit OVA (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) (100 µg/Tier) in Verbindung mit 1 µg IL-4 (ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland) durch intranasale (i.n.) Instillation sensibilisiert. Aufgrund einer natürlichen Punktmutation im TLR4-Gen lassen sich diese Tiere durch intranasale Gabe von OVA alleine nicht sensibilisieren, da sie Signale via dem TLR4 nicht weitergeben können, die für eine intranasale Immunisierung mit OVA notwendig sind (Eisenbarth et al., J.Exp.Med. 2002). Eine Umgehung dieser Signale der angeborenen Immunität durch Zytokine, wie IL-4 ist jedoch möglich (Dittrich et al., J.Immunol. 2008)). An den Tagen 14, 15, 18 und 19 nach der letzten Gabe von OVA mit IL-4 wurden die Tiere durch intranasale Gabe von OVA (25 µg/Tier) provoziert. Zur weiteren Untersuchung wurden Tiere 12 (Untersuchungszeitpunkt „A“, s. untenstehende Abbildung 1) und 24 („B“, s. unten stehende Abbildung 1) Stunden nach der ersten Antigengabe, 24 („C“, s. unten stehende Abbildung 1) Stunden nach der zweiten Antigengabe, 24 („D“, s. unten stehende Abbildung 1) Stunden nach der dritten Antigengabe und 48 („E“, s. unten stehende Abbildung 1) Stunden nach der letzten Provokation geopfert und Gewebeflüssigkeiten und Organe entnommen. Als Kontrolltiere dienten Mäuse, die lediglich das Antigen OVA erhielten und aus den oben dargelegten Gründen nicht auf das Antigen reagieren können.

mit chirurgischem Faden fixiert. Anschließend spülte ich die Lunge drei Mal mittels einer Spritze mit je 1 mL eisgekühltem PBS (Sigma-Aldrich, München, Deutschland). Diese Technik wird als Bronchoalveolare Lavage (BAL) bezeichnet und unter anderem im Rahmen der Bronchoskopie auch für die Gewinnung von bronchoalveolärem Schleim genutzt. Die zurück gewonnene Flüssigkeit kann als Bronchoalveolare Lavage Flüssigkeit (BALF) bezeichnet werden. Die gewonnenen 3 mL BALF wurden bei 1200 Upm für 5 Minuten zentrifugiert. Nach 5 Minuten Inkubation in 2 mL Hämolysepuffer wurde die Hämolyse mit 2 mL PBS gestoppt und bei 1200 Upm 5 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden in 500 μ L PBS aufgenommen und in Trypanblau gezählt. Die Zellzahl wurde eingestellt und 5×10^4 bis 1×10^5 Zellen wurden mithilfe der Cytospin 3 (Shandon Life Science International, Cheshire, UK) für 5 Minuten bei 800 Upm auf 76 x 26 mm Glasobjektträger (Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgetragen.

6.2.4.8 Pappenheim-Färbung und Differenzierung von BALF-Zellen

Zur Differenzierung der Zellen in der BALF wurden die Cytospots (siehe 6.2.4.7) 5 Minuten in May-Grünwald-Lösung gefärbt. Nach zweiminütiger Waschung in PBS wurden die Zellen für 20 Minuten in einer 20-fach verdünnten Giemsa-Lösung gefärbt, bevor sie unter Leitungswasser gespült wurden. Die gefärbten Cytospots wurden unter dem Lichtmikroskop nach morphologischen Kriterien in Makrophagen, Eosinophile, Neutrophile und Lymphozyten differenziert. Es wurden je Cytospot 300 Zellen differenziert. Zur Bestimmung der absoluten Zellzahlen der einzelnen Zelltypen wurde der errechnete Anteil mit der zuvor bestimmten Gesamtzellzahl multipliziert.

6.2.4.9 Entnahme der Lungenflügel für die RNA-Isolation

Nach der Tötung der Tiere wurde die Brusthöhle und der Pleuralraum geöffnet. Mit einer Pinzette und einer Schere entfernte ich die zwei linken Lungenlappen und gab sie in ein Lysing Matrix D Röhrchen (MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland), das mit 350 μ L RLT-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) gefüllt war. Die Röhrchen wurden in flüssigen Stickstoff (Linde Gas, Hannover, Deutschland) gegeben und somit schockgefroren und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

6.2.4.10 Entnahme der Milz

Für die Gewinnung von Splenozyten öffnete ich nach der Tötung der Mäuse die Bauchhöhle der Tiere und legte die Milz frei. Die Milz wurde mit einer Pinzette angehoben und mit einer Schere herausgetrennt. Anschließend bewahrte ich das entnommene Organ in RPMI 1640 mit 5 % FCS auf Eis, bis das Organ zur Splenozytenisolation (siehe 6.2.2.5) verwendet werden konnte.

6.2.5 Statistische Methoden

Mithilfe des Mann-Whitney-U-Test und dem ungepaarten t Test mit Welch Korrektur wurde untersucht, ob zwei Gruppen signifikant unterschiedlich voneinander sind, wobei der ungepaarte t Test nur dann zur Anwendung kam, wenn die Gruppengröße kleiner als 3 war ($n < 3$). Bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurden zwei Proben als unterschiedlich betrachtet. In individuellen Studien wurden 4 bis 5 Tiere pro Gruppe für die Analyse herangezogen. In in vitro Experimenten wurden, sofern nicht anders angegeben, Dreifachbestimmungen betrachtet. Die Studien wurden, sofern nicht ausdrücklich angegeben, jeweils mindestens 3x unabhängig voneinander durchgeführt (Microarrayanalysen 2x).

7. Ergebnisse

7.1 Charakterisierung der „IL-4 abhängigen pulmonalen Sensibilisierung“

Ausgehend von der Beobachtung, dass im Modell einer „IL-4-abhängigen pulmonalen Sensibilisierung“ muss die IL-4R α -Untereinheit des IL-4 Rezeptors sowohl auf hämatopoetischen, wie auf strukturellen Zellen exprimiert sein, um eine T_H2-gerichtete Entzündung der Atemwege hervorzurufen (Dittrich et al., J.Immunol. 2008). Ausgehend von dieser Beobachtung sollte die Wirkung von IL-4 auf AECII während der Sensibilisierung genauer charakterisiert werden.

Obwohl in systemischen murinen Sensibilisierungsmodellen, bei denen Tiere durch intraperitoneale Gabe des Antigens in Verbindung mit dem Adjuvanz Alum sensibilisiert werden, die Provokation mit Antigen zu einer robusten Atemwegsentzündung führt, stellt es jedoch ein sehr unphysiologisches Sensibilisierungsmodell dar. Die verabreichte Allergendosis korreliert nicht mit den Antigenkonzentrationen, die bei einer natürlichen Antigenaufnahme im Intraperitonealraum vorkommen. Zudem kann man bei einer physiologischen Sensibilisierung nicht von der Gegenwart des starken Adjuvanz Allum ausgehen und die Aufnahme eines Allergens bei einer pulmonalen Sensibilisierung findet über die Atemwege statt. Aus diesen Gründen entschied ich mich dazu ein intranasales Sensibilisierungsprotokoll zu wählen. Bei einer intranasalen Applikation wird das Antigen auf eine Weise verabreicht, die den natürlichen Gegebenheiten sehr nahe kommt. So konnte in diesem Modell bereits 2000 gezeigt werden, dass IL-4 eine zentrale Rolle bei der pulmonalen Sensibilisierung spielt (Herrick et al., J.Clin.Invest 2000). Acht Jahre später nutzten Dittrich et al. eine modifizierte Form dieses Sensibilisierungsprotokolls für ihre Untersuchungen zur Wirkung von IL-4 während der Sensibilisierungsphase (Dittrich et al., J.Immunol. 2008). Im zu untersuchenden murinen Asthmodell sensibilisierte ich Mäuse des Stamms C3H/HeJ an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit OVA in Verbindung mit IL-4, die Kontrollgruppe erhielt lediglich OVA. Zwei Wochen nach der Sensibilisierung wurden die Mäuse mit OVA alleine provoziert und zwei Tage nach der letzten Provokation analysiert. Die Mäuse des Stamms C3H/HeJ exprimieren keine funktionelle Form des TLR4 auf ihren Zellen und können infolgedessen nicht den TLR4-Liganden Lipopolysaccharid (LPS) binden. Die Sensibilisierung über die Atemwege mit OVA in diesem Modell ist komplett abhängig von der Expression des TLR4 damit es nach Sensibilisierung und Provokation zu einer Atemwegsentzündung kommt. Tiere, wie der C3H/HeJ-Stamm, die keinen funktionellen TLR4

exprimieren, lassen sich mit OVA alleine nicht gegen dieses Antigen sensibilisieren (Eisenbarth et al., J.Immunol. 2004).

In ersten Untersuchungen hatte man den bereits bekannten Phänotyp der Entzündung anhand einer Messung der Zellzahl in Bronchoalveolarraum und der Differenzierung dieser Zellen nachvollzogen. (Dittrich et al., J.Immunol. 2008). Anschließend hatte ich Zeitkinetiken der Entzündung und ihrer Mediatoren während der Sensibilisierungsphase untersucht, um die Veränderungen der Sensibilisierungsphase, die bisher noch nicht näher untersucht worden war, näher zu charakterisieren. Diese Untersuchungen dienten dazu, einen Zeitpunkt festzulegen, an dem bereits deutliche phänotypische Veränderungen durch den Kontakt mit IL-4 und Protein eintreten. Zu diesem Zeitpunkt wurden in Folgeexperimenten AECII durchflusszytometrisch isoliert und ihr RNA-Expressionsprofil mittels Microarray und RealTime-PCR näher untersucht.

7.1.1 Infiltration von Eosinophilen in den Bronchoalveolarraum nach Sensibilisierung und Provokation mit OVA und IL-4

Wie bereits vorbeschrieben (Dittrich et al., J.Immunol. 2008), kommt es in Tieren, die während der Sensibilisierung OVA und IL-4 erhielten, nach der Provokation zu einer starken Infiltration von Zellen in die BALF im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe, die OVA allein erhielten (Abbildung 2 a).

Zur weiteren Charakterisierung wurden die infiltrierenden Zellen ihrer Zellmorphologie nach mikroskopisch differenziert. Es zeigte sich, dass in den mit OVA und IL-4 sensibilisierten Mäusen 70,3 % \pm 15,2 % der infiltrierenden Zellen eosinophile Granulozyten waren. 26,51 % \pm 12,5 % der Zellen zeigten eine Morphologie von Makrophagen und 2,9 % \pm 3,3 % wurden als Lymphozyten eingeordnet. Während sich keine Zellen mit der Morphologie von neutrophilen Granulozyten in der BALF von OVA + IL-4 behandelten Tieren fanden, konnten 0,4 % \pm 0,9 % der Zellen in der BALF der Kontrollgruppentiere als Neutrophile identifiziert werden (Abbildung 2 b). Die Zellen in der BALF der Kontrolltiere zeigten zu 86,5 % \pm 6,1 % Makrophagenmorphologie und 7,7 % \pm 8,3 % der Zellen wurden als eosinophile Granulozyten identifiziert. Auch in den Kontrolltieren machten Lymphozyten den geringsten Anteil in der BALF mit 4,3 % \pm 3,8 % aus. Bezogen auf die Zellzahl fand ich in den mit OVA und IL-4 behandelten Tieren eine höhere Zahl an Makrophagen, Lymphozyten und Eosinophilen, als in den Kontrolltieren (Abbildung 2 c, e, f). Jedoch unterschied sich nur die Zahl der Eosinophilen signifikant in den beiden Gruppen (Abbildung 2 f).

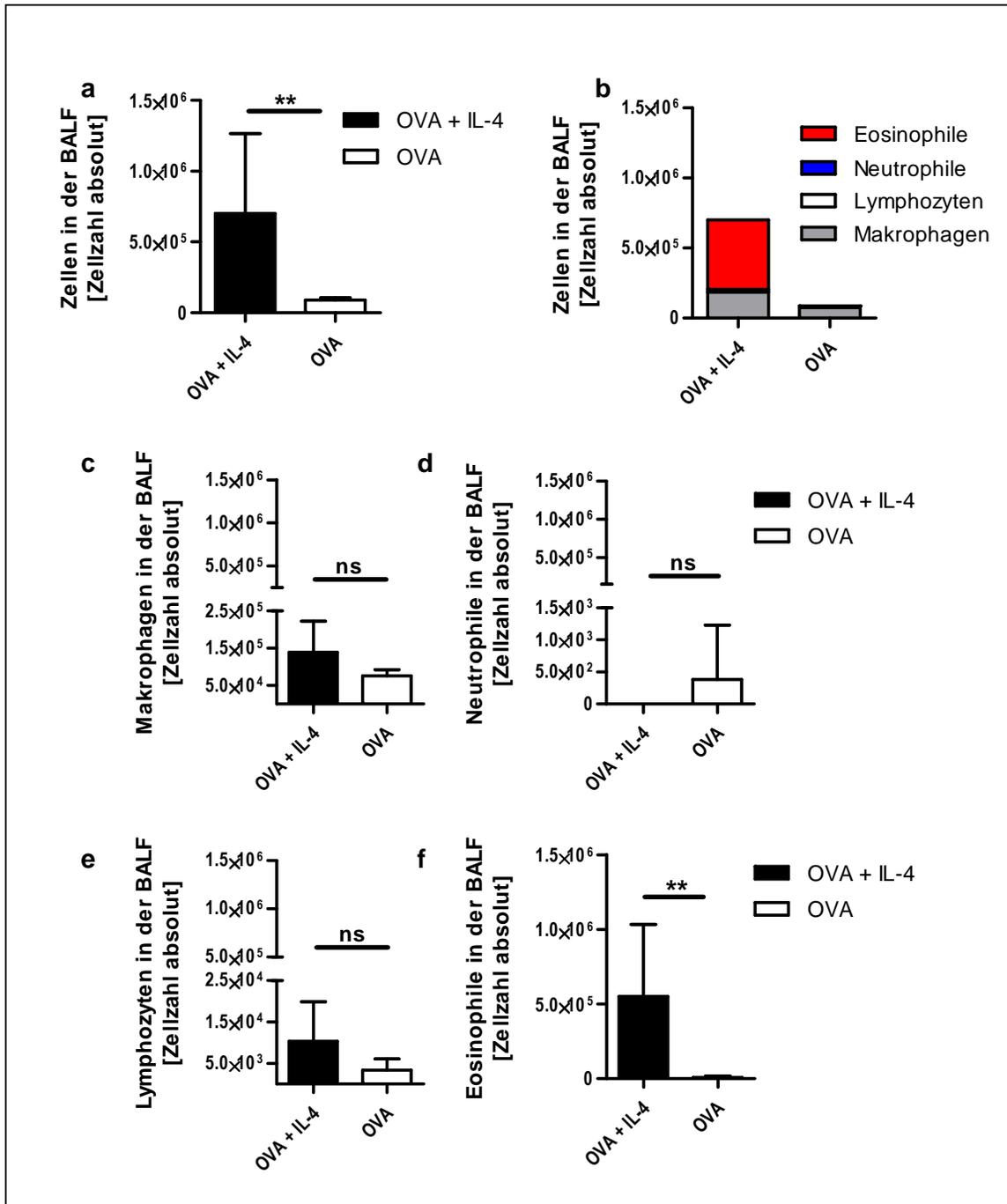


Abbildung 2: Zellzahlen und -differenzierung in der bronchoalveolären Lavage (BAL)

Zellzahlen in der BALF von Tieren, die mit OVA und IL-4 (schwarz), oder mit OVA allein (weiß), sensibilisiert wurden. BALF wurde 48 Stunden nach der letzten Provokation gewonnen. a) Vergleich der Zellzahlen in der BALF. b-f) Lichtmikroskopische Differenzierung anhand der Zellmorphologie nach Pappenheim-Färbung von Zytospots von Zellen der BAL. c-f) Zellzahl der Makrophagen (c), Neutrophilen (d), Lymphozyten (e) und Eosinophilen (f) in der BALF (repräsentative Studie von 5 Studien mit n=5 Tieren, Mann-Whitney-U-Test, ** entspricht Signifikanzniveau P<0,01)

Anhand der erhöhten Zellzahl und dem hohen Anteil an eosinophilen Granulozyten konnte ich bestätigen, dass durch die Behandlung mit OVA und IL-4 im Vergleich zur Behandlung mit OVA alleine eine deutliche Atemwegentzündung induziert wird, die durch eosinophile Granulozyten

dominiert ist. Eine T_H2-gerichtete Entzündung der Atemwege kann zudem anhand des vorherrschenden Zyto- und Chemokinprofils beschrieben werden, so dass ich im Weiteren die Expression verschiedener inflammatorischer Mediatoren mittels Realtime-PCR- Analyse untersucht habe.

7.1.2 Induktion von Zyto- und Chemokinen nach Sensibilisierung und Provokation mit OVA und IL-4

Aus den Lungen der obigen Tiere wurde Gesamt-RNA isoliert und durch RealTime-PCR Analyse die relative Expression verschiedener Mediatoren, wie TSLP, GM-CSF, IL-33, MCP-1 (CCL2), RANTES (CCL5), TARC (CCL17), CXCL1, Eotaxin-2 (CCL24) und Mip-3 α (CCL20) untersucht. Diese Moleküle sind im Zusammenhang mit allergischen Immunreaktionen der Atemwege bereits beschrieben (Cao et al., Cytokine 2011; Holgate et al., Am.J.Respir.Crit Care Med. 1997; Marini et al., J.Allergy Clin.Immunol. 1992; Schmitz et al., Immunity. 2005; Sekiya et al., J.Immunol. 2000; Soumelis et al., Nat.Immunol. 2002; Weckmann et al., Nat.Med. 2007; Zimmermann et al., J.Immunol. 2000). Die Expression der verschiedenen Mediatoren wurde zunächst auf die Expression von β -Actin normalisiert. In einem zweiten Schritt wurde die Expressionsstärke der mit OVA und IL-4 behandelten Tiere mit der Expressionsstärke der nur mit OVA behandelten Tiere verglichen.

Es zeigte sich, dass die Sensibilisierung mit OVA und IL-4 im Vergleich zur Sensibilisierung mit OVA alleine zu einer deutlichen Heraufregulation der Expression von MCP-1, Eotaxin-2 und CXCL1 führte. Die MCP-1 Expression von Tieren, die mit OVA und IL-4 behandelt worden waren, war durch Gabe von IL-4 160-fach höher als in Tieren, die nur mit OVA behandelt wurden. Eotaxin-2 und CXCL1 waren in IL-4 behandelten Tieren 50-fach höher exprimiert, als in den Kontrolltieren. Auch die IL-33-, GM-CSF- und TARC-Expression waren höher als in den Tieren, die mit OVA allein sensibilisiert wurden (5-13-fach höher). Die Genexpression von RANTES, CCL20 und TSLP wurden von IL-4 nicht beeinflusst ($\leq 1,5$ fach) (Abbildung 3).

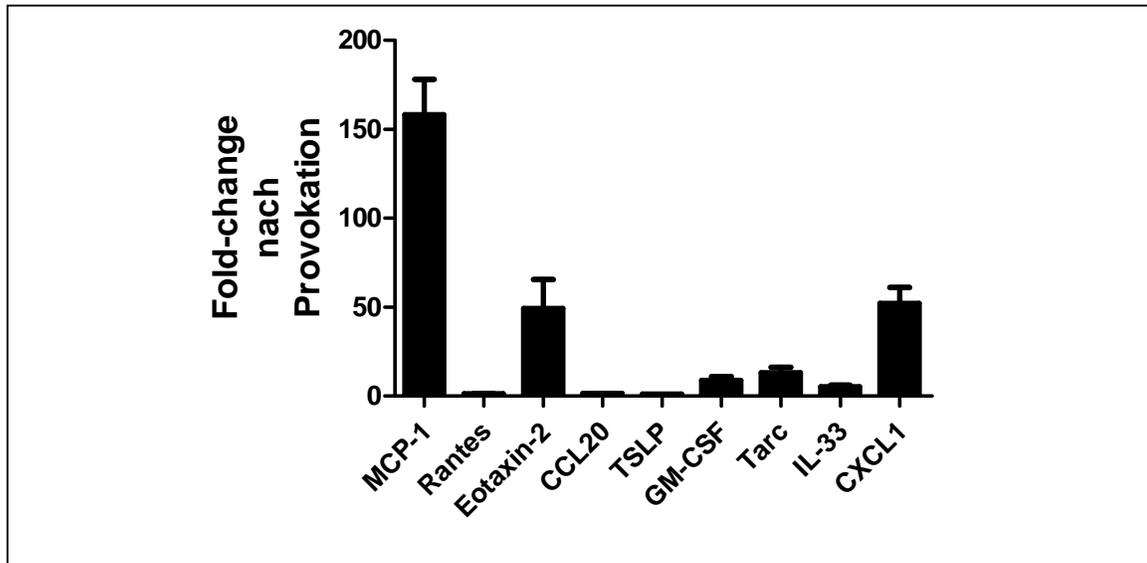


Abbildung 3: Realtime PCR Analyse der Genexpression von Zytokinen und Chemokinen in der Lunge

Relative Genexpression verschiedener Zyto- und Chemokine aus der Lunge von Mäusen, die mit OVA und IL-4 behandelt wurden, verglichen mit Tieren die mit OVA behandelt wurden. Die Lunge wurde 48 Stunden nach der letzten Provokation mit OVA entnommen. Es wurde die relative Expression der Gruppe OVA + IL-4 zu OVA (fold-change) durch Analyse via semiquantitativer RT-PCR bestimmt. Die Expression wurde normalisiert zur Expression des Referenzgens β -Actin. Alle Werte wurden aus Dreifachbestimmungen errechnet anhand der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. (Repräsentative Studie von 5 Studien, bei der pro Gruppe n=3 Tiere analysiert wurden.)

Neben den Daten der Zelldifferenzierung bestätigen auch die gemessenen Regulationen der Chemokine, dass eine T_H2 -gerichtete Atemwegsentzündung durch die Sensibilisierung mit OVA und IL-4 hervorgerufen wurde. Um eine atopische Immunreaktion nachzuweisen galt es jedoch, antigenspezifische IgE Antikörper im Serum der Tiere nachzuweisen (siehe 5.2 und 5.5). Hierfür wurde das Serum der Tiere mittels eines antigenspezifischen ELISAs für IgE untersucht.

7.1.3 Induktion von antigenspezifischem IgE nach Sensibilisierung und Provokation mit OVA und IL-4

In der mit OVA und IL-4 behandelten Gruppe konnte nach der Provokation im Vergleich zur nur mit OVA behandelten Kontrollgruppe mithilfe eines antigenspezifischen ELISAs für IgE ein signifikanter Anstieg von antigenspezifischen IgE Antikörpern im Serum gemessen werden. (Abbildung 4).

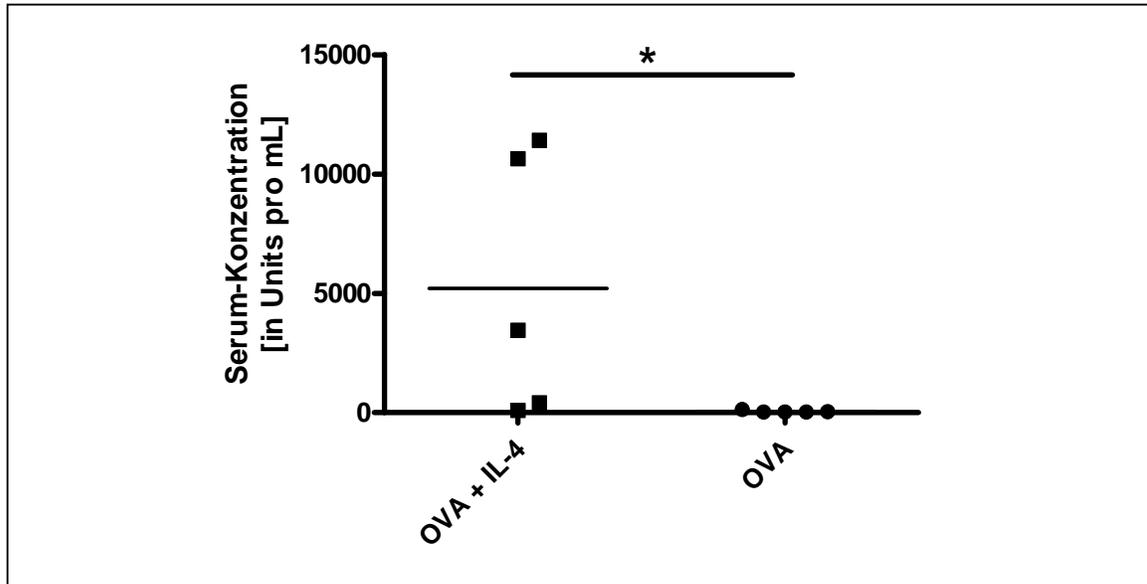


Abbildung 4: Bestimmung der antigenspezifischen IgE Antikörper im Blutserum

Bestimmung der antigenspezifischen IgE Antikörper im Blutserum der Tiere mittels ELISA. Die Konzentrationen wurden in Doppelbestimmungen anhand einer 1:40 Verdünnung des Serums in Assay Diluent (BD Biosciences, San Jose, USA) errechnet. (In der repräsentativen Studie von 5 Studien wurden n=5 Tiere analysiert, Mann-Whitney-U-Test, * entspricht Signifikanzniveau $P < 0,05$)

Die Ergebnisse der ELISA-Messung zeigen, dass ich durch die „IL-4 vermittelte pulmonale Sensibilisierung“ einen Klassenwechsel zu Immunglobulinen des Isotyp E auslösen konnte.

7.1.4 Charakterisierung des BALF-Phänotyps in der Sensibilisierungsphase der „IL-4 abhängigen Sensibilisierung“

Um einen genaueren Einblick in die Sensibilisierungsphase zu gewinnen, habe ich nach Bestätigung des Phänotyps nach der Provokation (Zeitpunkt „E“), an vier Zeitpunkten während der Sensibilisierungsphase Tiere aus den beiden Versuchsgruppen analysiert. Diese Analysen erfolgten 12 und 24 Stunden nach der ersten Antigengabe (Zeitpunkt „A“ und „B“), sowie 24 Stunden nach der zweiten (Zeitpunkt „C“) und dritten Antigengabe (Zeitpunkt „D“). Dabei wurden erneut die Zelldifferenzierung in der BALF und die Expression von Eotaxin-2 mRNA als zentralem Mediator für die Rekrutierung von Eosinophilen in der Lunge der Versuchstiere untersucht (Abbildung 5).

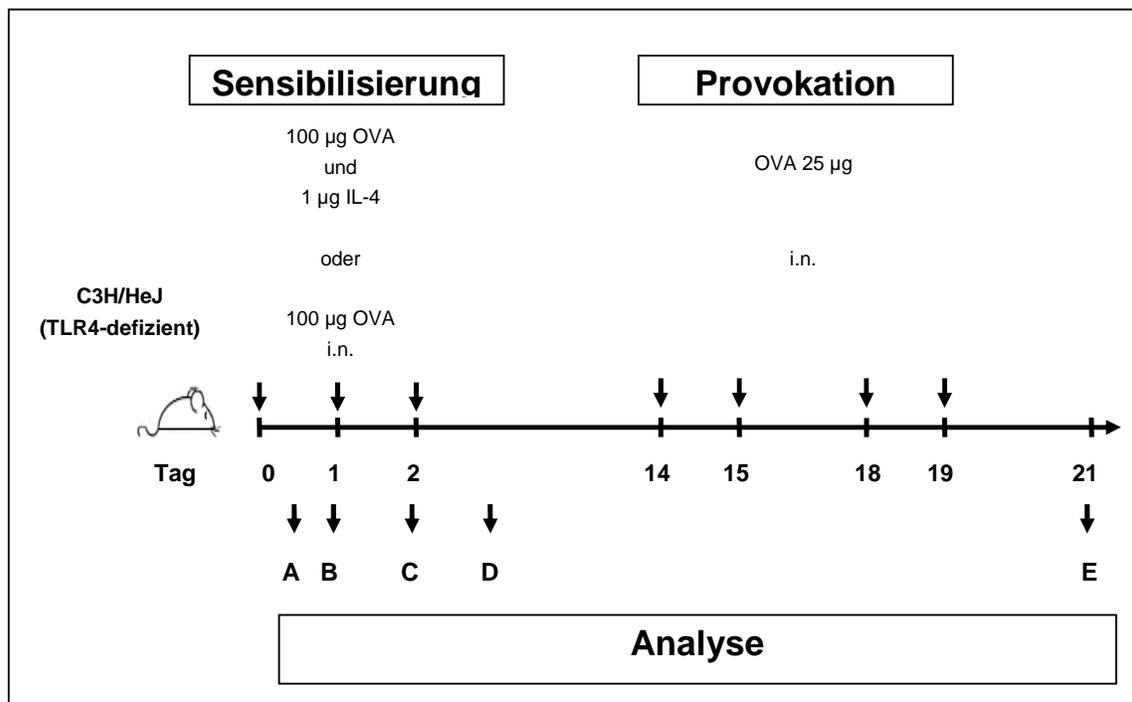


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Sensibilisierung und Provokation von C3H/HeJ Mäusen

Murines Modell einer intranasalen Sensibilisierung, bei dem während der Sensibilisierungsphase (Zeitpunkt A-D) Tiere 12 bzw. 24 Stunden nach Antigengabe geopfert wurden, so dass eine BAL zur Gewinnung der BALF durchgeführt und die zwei linken Lungenlappen entnommen werden konnten. Zu Zeitpunkt E wurde zusätzlich das Serum der Tiere entnommen. (Repräsentative Studie von 5 Studien mit n=3 Tiere pro Gruppe)

7.1.4.1 Eosinophile Granulozyten infiltrieren die BALF bereits während der Sensibilisierungsphase

Es zeigte sich, dass während der Sensibilisierungsphase zu den ersten drei Analysezeitpunkten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Zellzahlen zwischen den Tieren, die nur OVA erhielten, im Vergleich zu den Tieren, die OVA und IL-4 erhielten auftraten. Erst 24 Stunden nach der dritten Antigengabe, zum Zeitpunkt „D“ konnte in den mit OVA und IL-4 behandelten Tieren ein signifikanter Unterschied der Zellzahl gegenüber den OVA behandelten Tieren gemessen werden. Insgesamt stieg die Zellzahl während dieses Behandlungszeitraums mit durchschnittlich $1,2 \times 10^5$ Zellen/Tier jedoch nicht an (Abbildung 6 a). Erst nach der Provokationsphase konnte in den Tieren der Versuchsgruppe (OVA und IL-4) eine 10-fach höhere Zellzahl als in den Tieren der Kontrollgruppe (nur OVA) gemessen werden (Abbildung 6 a).

Hinsichtlich der zellulären Zusammensetzung des Infiltrats fand ich bereits während der Sensibilisierungsphase deutliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. In jener Phase verhielt sich der Anteil an Makrophagen, Neutrophilen und Lymphozyten in den beiden Versuchsgruppen ähnlich (Abbildung 6 b-d). Während die Zahl der Lymphozyten über die Zeit gleich blieb (Abbildung 6 d), konnte ich zeigen, dass die Zahl der Makrophagen und Neutrophilen in der Sensibilisierungsphase über die Zeit abnahm (Abbildung 6 b und c). Die Abnahme der Neutrophilenzahl war zum Zeitpunkt „D“ in der Kontrollgruppe (nur OVA) jedoch stärker, als in der Versuchsgruppe (OVA und IL-4), da in der Versuchsgruppe eine signifikant höhere Zahl an Neutrophilen messbar war. Gleichzeitig zeigte sich ab Zeitpunkt „D“ in den Tieren, die mit OVA und IL-4 behandelt wurden ein signifikanter Anstieg an eosinophilen Granulozyten gegenüber der Kontrollgruppe (Abbildung 6 e). Nach der Provokationsphase kam es in den Tieren, die mit OVA und IL-4 behandelt wurden zu einem Anstieg von Makrophagen, Lymphozyten und Eosinophilen (Abbildung 6 b, d, e). Jedoch war lediglich im Falle der Eosinophilen ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen (Abbildung e). Bei der Zahl an Neutrophilen in der BALF konnte nach der Provokation ein Anstieg in der Kontrollgruppe gemessen werden. Der Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen war jedoch nicht signifikant.

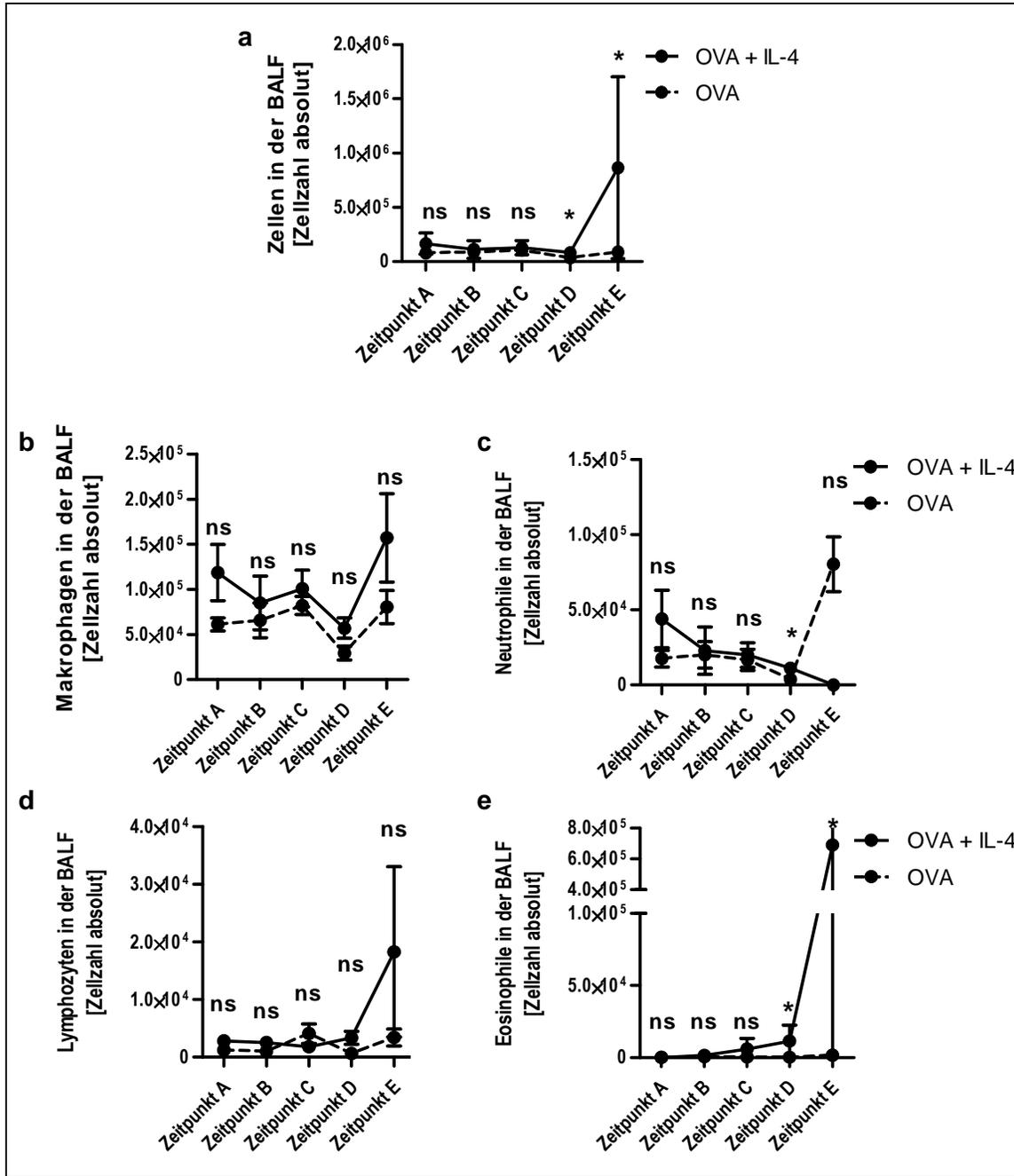


Abbildung 6: Zeldifferenzierung in der BALF zu verschiedenen Zeitpunkten während der Sensibilisierungsphase

Zellzahlen in der BALF von C3H/HeJ Tieren, die mit OVA und IL-4, oder mit OVA allein sensibilisiert wurden. BALF wurde 12 Stunden (Zeitpunkt A) und 24 Stunden (Zeitpunkt B) nach der ersten Antigengabe, 24 Stunden nach der zweiten Antigengabe (Zeitpunkt C), 24 Stunden nach der dritten Antigengabe (Zeitpunkt D) und 48 Stunden nach der letzten Provokation (Zeitpunkt E) entnommen. In dieser repräsentativen Studie wurden pro Gruppe 4 bis 5 Tiere untersucht. a) Zellzahlen in der BALF. b) Makrophagen in der BALF. c) Neutrophile in der BALF. d) Lymphozyten in der BALF. e) Eosinophile in der BALF. (In der repräsentativen Studie von 5 Studien wurden n=4-5 pro Gruppe analysiert, nicht signifikant bei Mann-Whitney-U-Test, * entspricht Signifikanzniveau P<0,05.)

Zusammengefasst zeigte die Untersuchung der BALF während der Sensibilisierungsphase, dass IL-4 in diesem Zeitraum die absolute Zellzahl im Bronchoalveolarraum nicht beeinflusst, aber sich die Zusammensetzung der Zellen in diesem Kompartiment durch die Einwanderung von eosinophilen Granulozyten ändert.

Um die Einwanderung von Eosinophilen in den Bronchoalveolarraum genauer zu untersuchen, bestimmte ich die relative Expression von Eotaxin-2 mRNA in der Lunge der Tiere zwischen den beiden Versuchsgruppen an allen Analysezeitpunkten mittels Realtime-PCR Analyse.

6.1.4.2 Die Expression des Eotaxin-2 Gens in der Sensibilisierungsphase wird durch IL-4 beeinflusst

Zu jedem Analysezeitpunkt, an dem die Zellzusammensetzung der BALF untersucht wurde, entnahm ich den linken Ober- und Unterlappen, wie auch den rechten Mittellappen der Mauslunge zur Isolation von Gesamt-RNA. Mittels Reverser Transkription wurde die RNA in cDNA umgeschrieben und die Expression von Eotaxin-2 mRNA in einer quantitativen Realtime-PCR bestimmt. Die relative Genexpression in den beiden Versuchsgruppen wurde relativ zu einer Standard-RNA quantifiziert, die aus Lungen von unbehandelten Tieren gewonnen wurde.

Während in der Kontrollgruppe die Expression von Eotaxin-2 über den Studienzeitraum unverändert blieb, zeigte sich 24 Stunden nach der zweiten Antigengabe, in den mit OVA und IL-4 behandelten Tieren ein Anstieg in der Expression des Eotaxin-2 Gens (Zeitpunkt „C“, Abbildung 7). Diese Menge an Eotaxin-2 Messenger wurde bis 24 Stunden nach der dritten Antigengabe aufrechterhalten (Zeitpunkt „D“) und auch nach Provokation mit OVA (Zeitpunkt „E“) konnte eine erhöhte Eotaxin-2 Expression nachgewiesen werden (Abbildung 7).

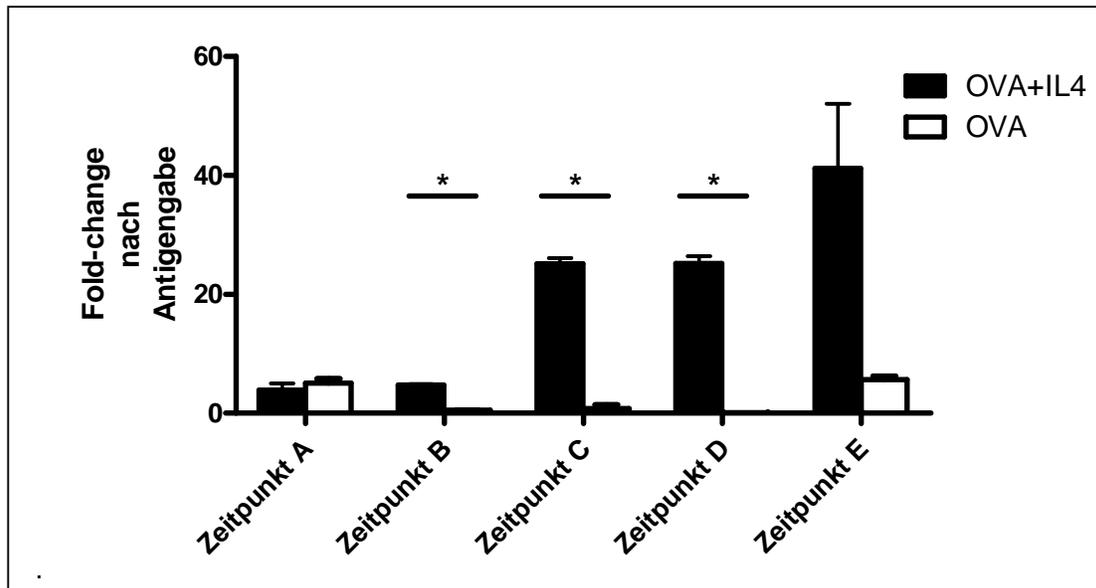


Abbildung 7: Bestimmung der relativen Eotaxin-2 Genexpression während der Sensibilisierungsphase

Mittels Sybr Green Realtime-PCR Analyse wurde die Expression von Eotaxin-2 mRNA in Tieren, die OVA oder OVA und IL-4 bekamen relativ zu PBS behandelten Tieren bestimmt. Die cDNA aus 3 Versuchstieren pro Gruppe wurde gepoolt und die Expression wurde in Zweifachansätzen bestimmt. (n=3 Tiere/Gruppe). Es wurden die Zeitpunkte (A) 12 Stunden nach 1. Antigengabe, (B) 24 Stunden nach 1. Antigengabe, (C) 24 Stunden nach 2. Antigengabe, (D) 24 Stunden nach 3. Antigengabe und (E) 48 Stunden nach letzter Provokation untersucht. (Repräsentative Studie von 5 Studien mit n=3 Tieren pro Gruppe, Ungepaarter t Test mit Welch Korrektur, * entspricht Signifikanzniveau $P < 0,05$)

Rückblickend auf die Untersuchung der Zellzusammensetzung im Bronchoalveolarraum konnte ich eine zeitliche Korrelation zwischen der Kinetik der Eotaxin-2 Genexpression und der Einwanderung von eosinophilen Granulozyten in die BALF messen (vergleiche Abbildung 6). Der Unterschied von 24 Stunden zwischen der Induktion von Eotaxin-2 mRNA und dem Anstieg an Eosinophilen erklärt sich aus den weiteren Syntheseschritten, bis aktives Eotaxin-2 Protein hergestellt wurde. Zudem beansprucht eine Einwanderung der Eosinophilen infolge einer Rekrutierung durch Eotaxin-2 eine bestimmte Zeit.

Aufbauend auf den Analysen der Sensibilisierungsphase, den Untersuchungen der Zellmorphologie im Bronchoalveolarraum und der Eotaxin-2 Expression während der Sensibilisierungsphase entschied ich mich respektive der initialen Fragestellung die Wirkung von IL-4 auf parenchymatöse Epithelzellen der Lunge zu untersuchen, um neue Mediatoren zu identifizieren, die den Sensibilisierungsprozess beeinflussen und weitere Einblicke in die Mechanismen während dieser Phase einer allergischen Erkrankung zu erhalten. Daher sollten im Zuge der nächsten Untersuchungen AECII aus der Lunge von C3H/HeJ Mäusen, die mit OVA allein, oder mit OVA in Verbindung mit IL-4 intranasal

sensibilisiert wurden isoliert werden. Die RNA aus diesen Zellen gewonnene RNA wurde mittels Microarray in einem hypothesefreien Ansatz analysiert.

7.2 Genexpressionsanalysen mittels Microarray von AECII während der Sensibilisierungsphase der IL-4 abhängigen Sensibilisierung

Die Untersuchungen der Sensibilisierungsphase zeigten, dass IL-4 bereits 24 Stunden nach dem zweiten Antigenkontakt die Transkription von Eotaxin-2 mRNA und die Einwanderung von eosinophilen Granulozyten induziert. Eine Einwanderung dieser Zellen in das Lungenparenchym in der Effektorphase konnte bereits beschrieben werden (Hamid et al., *J.Allergy Clin.Immunol.* 1997). AECII übernehmen in verschiedenen Modellen der Atemwegsentzündung immunmodulatorische Wirkungen (Dittrich et al., *Clin.Exp.Allergy* 2010; Gereke et al., *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2009; Zhao et al., *Respir.Med.* 2010), so dass ich vermutete, dass dieser Zelltyp ein Zielzelltyp des IL-4 im strukturellen Kompartiment sein könnte, da eine Sekretion von T_H2-Zytokinen in den Alveolen bereits für die Effektorphase gezeigt werden konnte (Minshall et al., *J.Allergy Clin.Immunol.* 1998). Um die Wirkung von IL-4 auf das Epithel der unteren Atemwege während der Sensibilisierungsphase näher zu untersuchen, behandelte ich C3H/HeJ Mäuse mit OVA in Verbindung mit IL-4 oder nur mit OVA (siehe Methoden 6.2.4.4 und 6.2.4.5) und isolierte AECII 24 Stunden nach der zweiten Antigengabe (Zeitpunkt „C“ in obigen Untersuchungen). Die AECII wurden als granuläre Zellen identifiziert, die keine Marker für TC, B-Zellen, natürliche Killerzellen, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten oder DC trugen. Diese Zellen wurden in Zusammenarbeit mit der AG Bruder am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung anhand von Oberflächenmolekülen, wie der Tyrosin Phosphatase CD45 (B220), CD32/CD16, CD11b, F4/80 und der Granularität gemäß einem etablierten Protokoll isoliert (Gereke et al., *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2009).

In einem hypothesefreien Ansatz sollten Zielgene identifiziert werden, die von AECII 24 Stunden nach 2. Antigengabe in den mit OVA und IL-4 versus die ausschließlich mit OVA behandelten Tiere differenziell exprimiert wurden. Diesen Ansatz wählte ich, um ein möglichst breites Spektrum an Folgen der Behandlung mit IL-4 als Basis für weitere Untersuchungen nutzen zu können. Die Wirkung von IL-4 auf den Sensibilisierungsprozess ist weitestgehend unbekannt.

Da ich im Hinblick auf diese Anforderungen eine möglichst große Bandbreite an regulierten Sequenzen untersuchen wollte, entschied ich mich dafür, die mRNA der isolierten AECII mittels Microarray-Technologie mit dem GeneChip MOE430 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, USA) der Firma Affymetrix zu untersuchen. Dieser GeneChip trägt Sequenzen des gesamten murinen Genoms auf seiner Oberfläche.

Ich analysierte zwei voneinander unabhängige Isolationen von AECII. Im ersten Versuch waren (472 und 76) Gene mindestens zweifach reguliert, im zweiten Versuch (279 und 76) Gene. Es ergab sich eine Schnittmenge von 76 gemeinsam differenziell regulierten Genen in beiden Versuchen (Abbildung 8).

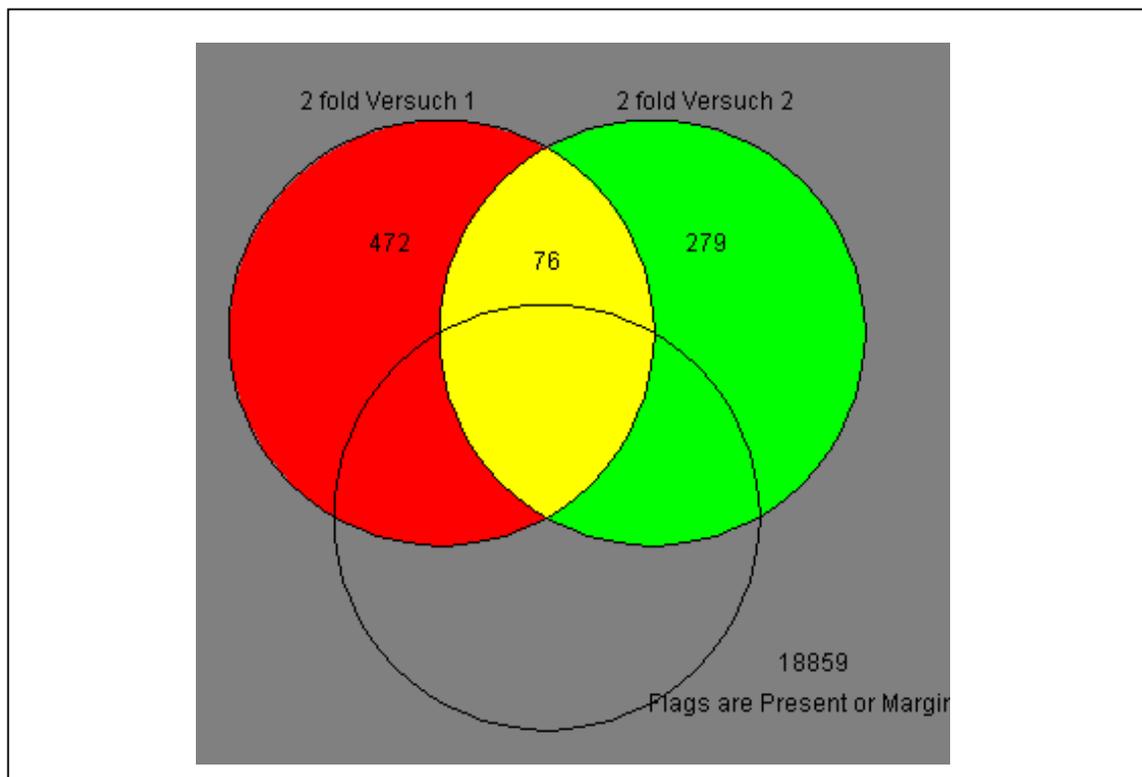


Abbildung 8: : Schematische Darstellung der 2-fach regulierten Gene aus der Microarrayanalyse

Schematische Darstellung der 2-fach regulierten Gene aus der Microarrayanalyse aus 2 Sensibilisierungsstudien (n=5 Tiere pro Gruppe wurden gepoolt und analysiert.) Rote und Gelbe Segmente bilden die 2-fach regulierten Gene von Studie 1 und die grünen und gelben Segmente bilden die regulierten Gene der Studie 2. Gelb kodierte Gene stellen die Schnittmenge beider Versuche dar.

Diese 76 differenziell regulierten Gene wurden durch drei Softwareprogramme weiter analysiert, wodurch die Anzahl weiter zu charakterisierender Gene reduziert wurde. Mithilfe der „DAVID Bioinformatics Resources 6.7“ des National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID,NIH) gruppierten wir die Gene funktionell. Durch Verwendung der Software „Pubmatrix“ und „iHOP“ konnten die Gene mit den englischen Begriffen „asthma“, „allergy“, „airway hyperreactivity“, „lung“ und „epithelium“ in Verbindung gesetzt werden. Durch diese Analysen konnte die Zahl der Zielgene auf 30 Sequenzen, die eine funktionelle Rolle bei Atemwegsentzündungen spielen könnten eingegrenzt werden,

Zehn dieser Sequenzen sind in der Literatur bereits im Zusammenhang mit Asthma bronchiale, Epithelzellen oder Entzündungen der Atemwege beschrieben. Dabei waren acht dieser zehn Gene in den beiden Studien hochreguliert, zwei waren herunterreguliert (Abbildung 9 und Tabelle 12).

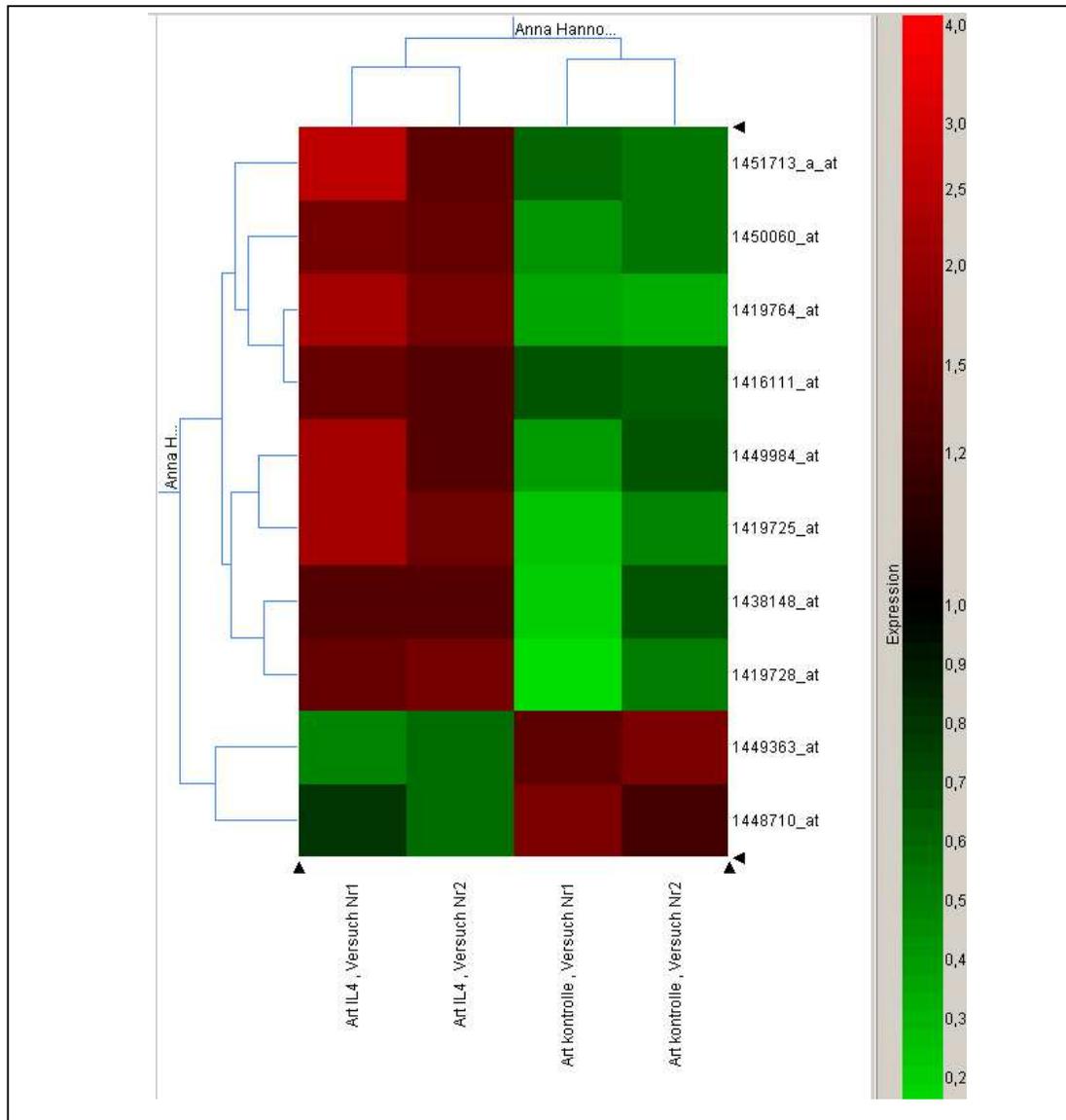


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Genexpression von 10 Sequenzen des Microarray

Schematische Darstellung der Ergebnisse für die 10 Sequenzen, die in der Literatur im Zusammenhang mit Asthma bronchiale, Epithel und Atemwegsentzündungen bereits beschrieben sind. In den Spalten sind von links nach rechts zuerst die IL-4 behandelten Gruppen aus Studie 1 und 2 aufgeführt, dann folgen die Kontrollgruppen der Studie 1 und 2. In den 10 Zeilen sind die Codebezeichnungen der Firma Affymetrix für die entsprechenden Sequenzen auf dem Genchip angegeben. Die relative Expression wird in unterschiedlicher Farbgebung zwischen rot und grün angegeben. Die entsprechende Expression ist der Skala rechts zu entnehmen.

Mithilfe des „DAVID - Functional Annotation Tool“ untersuchten man die 10 Gene auf Gemeinsamkeiten hin. Unter diesen Sequenzen befanden sich C-X-C Chemokinligand 2 (Cxcl-2), -3 (Cxcl-3) und -5 (Cxcl-5), die der C-X-C Chemokinfamilie angehören. Diese Moleküle werden, wie auch Chitinase 3-like 3 (Chi3l3) und Polymeric immunoglobulin receptor (Pigr), von Zellen sezerniert und sind beteiligt an entzündlichen Prozessen. Weiterhin fanden sich in dieser Gruppe Chemokinrezeptoren, wie C-X-C Chemokinrezeptor 4 (Cxcr4) und andere Rezeptoren, deren Funktion für das Immunsystem bereits umfassend beschrieben wurde, wie der Fc Rezeptor für IgE (Fcer2a) und

der Transkriptionsfaktor Activating transcription factor 3 (Atf3), der allergeninduzierte Entzündungen der Atemwege abschwächt, fanden sich unter den zehn regulierten Genen. Der Anionen Transporter Solute carrier family 26, member 4 (Slc26a4) ist auch bekannt als Pendrin, wird in bronchialem Epithel durch T_H2-Zytokine, wie IL-4 induziert und in der Lunge von Patienten mit Asthma bronchiale oder Chronical obstructive pulmonary disease (COPD) verstärkt produziert (Nofziger et al., Cell Physiol Biochem. 2011). Auch das Molekül CD83, das charakteristisch für gereifte DC ist und die Reifung von B- und T-Zellen beeinflusst (Breloer and Fleischer, B., Trends Immunol. 2008; Fujimoto and Tedder, T. F., J.Med.Dent.Sci. 2006), wurde durch die Behandlung mit IL-4 reguliert (Tabelle 12).

Gensymbol	Bezeichnung	Regulation Microarray	Regulation qPCR
Slc26a4	solute carrier family 26, member 4	10,94	10,99
Chi3l3	chitinase 3-like 3	6,65	14,55
Cxcl2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	5,92	3,80
Pigr	polymeric immunoglobulin receptor	3,93	3,67
Fcgr2a	Fc receptor IgE, low affinity II, alpha	4,28	11,71
Cxcl3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	7,59	4,52
CD83	CD83 antigen	2,15	2,21
Cxcl5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	11,04	9,57
Cxcr4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	0,44	1,12
Atf3	activating transcription factor 3	0,35	1,98

Tabelle 12: Auflistung der in der Literatur beschriebenen 2-fach regulierten Gene

Auflistung von mindestens 2-fach regulierten Genen, die durch die Programme iHOP und Pubmatrix mit den Begriffen Epithelzellen, Asthma und Atemwegsentzündungen assoziiert werden konnten. Aufgeführt wird neben den Gensymbolen die vollständige englische Genbezeichnung. Die letzten beiden Spalten zeigen die relative Genexpression der Sequenzen im Microarray und in der Realtime-PCR-Analyse.

Die restlichen 20 Gene (Tabelle 13) sind im Zusammenhang mit allergischen Erkrankungen der Atemwege oder pulmonalen Epithelzellen bisher nicht beschrieben und stellten daher Kandidaten für weitere (funktionelle) Analysen dar. Die Analyse mit „DAVID Functional Annotation Tool“ zeigte, dass ein Teil der Gene in dieser Gruppe mit dem Begriff Signalpeptid in Verbindung gebracht werden konnten und mit dem Begriff Immunantwort (englisch: immune response) assoziiert sind. Vier der Moleküle konnten hingegen nur jeweils einem der beiden Begriffe zugeordnet werden, so konnte man CD52 und FXYD domain-containing ion transport regulator 4 (FXYD4) dem Begriff Signalpeptid zuordnen, während C-type lectin domain family 4, member a2 (Clec4a2) und Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1 (Malt1) im Zusammenhang mit Immunantworten stehen. Die Sequenzen für Interleukin-4 induced 1 (IL4i1), Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9 (Tnfrsf9), C-C Chemokinligand 9 (Ccl9), Fetuin β (Fetub), Insulin-like growth factor binding protein 4 (Igfbp4), und Peptidoglycan recognition protein 1 (Pglyrp1) waren in beiden Gruppen vertreten. Bei Ccl9, Fetub, Igfbp4 und Pglyrp1 handelte es sich um Moleküle, die von Zellen sezerniert werden, während andere regulierte Gene, wie FXYD4, NADPH oxidase organizer 1 (Noxo1), Solute carrier family 6, member 20A (Slc6a20a), C-C Chemokinrezeptor-like 1 (Ccr11, CD52, Tnfrsf9, Clec4a2 und C-type lectin domain family 4, member a3 (Clec4a3) für membranständige Moleküle kodieren. Allerdings konnten nicht alle regulierten Sequenzen gemeinsamen Begriffen zugeordnet werden, da es sich insgesamt um eine sehr heterogene Gruppe von Molekülen mit unterschiedlichsten Funktionen handelt. So fanden wir z.B. auch Transkriptionsfaktoren, wie Fosfomycin resistance protein (FosB) oder NF-kappa-B inhibitor ϵ (Nfkbie), aber auch Proteine der Kernhülle, wie LEM domain containing 1 (Lemd1).

Gensymbol	Bezeichnung	Regulation Microarray	Regulation qPCR
Ccl9	C-C motif Chemokine Ligand 9	2,56	3,43
FXYP4	FXYP domain-containing ion transport regulator 4	7,95	25,39
IL4i1	Interleukin 4 induced 1	4,36	13,35
Noxo1	NADPH oxidase organizer 1	3,09	1,77
Clec4a2	C-type lectin domain family 4, member a2	2,59	4,04
Slc6a20a	Solute carrier family 6, member 20A	3,90	3,53
Clec4a3	C-type lectin domain family 4, member a3	2,83	3,81
Igfbp4	Insulin-like growth factor binding protein 4	2,87	0,60
Ccr1	C-C motif Chemokine receptor-like 1	2,14	1,39
Lemd1	LEM domain containing 1	2,91	3,12
Pglyrp1	Peptidoglycan recognition protein 1	3,36	1,89
Malt1	Mucosa associated lymphoid tissue 1 lymphoma	2,62	3,55
Nfkbie	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene	2,78	1,65
CD52	CD52 antigen	3,42	2,81
Tnfrsf9	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	4,64	12,00
Fetub	Fetuin beta	3,71	5,91
Fabp1	Fatty acid binding protein 1, liver	0,28	0,19
Hsph1	Heat shock protein 1	0,35	1,70
Mat2a	Methionine adenosyltransferase II, alpha	0,37	1,25

Gensymbol	Bezeichnung	Regulation Microarray	Regulation qPCR
FosB	FBJ osteosarcoma oncogene B	0,37	1,00

Tabelle 13: Auflistung der in der Literatur wenig beschriebenen 2-fach regulierten Gene

Auflistung von mindestens 2-fach regulierten Genen, die nach Datenbankanalyse mit iHOP und Pubmatrix bisher nicht detailliert im Zusammenhang mit Epithelzellen, Asthma und Atemwegsentzündungen beschrieben sind. Aufgeführt werden neben den Gensymbolen die vollständige englische Genbezeichnung. Die letzten beiden Spalten zeigen die relative Genexpression der Sequenzen im Microarray und in der Realtime-PCR-Analyse.

Nach Abschluss der Microarrayanalyse führte ich drei weitere unabhängige Experimente der „IL-4 abhängigen pulmonalen Sensibilisierung“ durch, in denen ich 24 Stunden nach 2. Antigengabe erneut die AEC II durchflusszytometrisch isolierte. Durch RealTime-PCR Analyse konnte ich in diesen Untersuchungen die Ergebnisse der Microarrayanalyse für 80 % der 30 identifizierten Sequenzen bestätigen, das heißt in der RealTime-PCR Untersuchung zeigte sich eine gleichläufige Regulation. (Abbildung 10 a und b, sowie Tabelle 12 und 13 „Regulation qPCR“). Für die Sequenzen von Igfbp4, Heat shock protein 1 (Hsp1), Methionine adenosyltransferase II α (Mat2a), FosB, Cxcr4 und Atf3 ließen sich die Ergebnisse der Microarrayanalysen jedoch nicht via RealTime-PCR bestätigen, da diese 6 Sequenzen in Microarray und RealTime-PCR gegenläufige Regulationen zeigten, weshalb diese Sequenzen nicht als Kandidaten für weitere funktionelle Untersuchungen herangezogen werden können. Dabei war die Bestätigung in den 10 Genen, die bereits im Zusammenhang mit Asthma, Allergie, Atemwegsentzündung, Atemwegshyperreagibilität (AHR) und Lunge gut charakterisierten Genen mit 80 % durch RealTime-PCR bestätigter Gene identisch mit den 20 Genen aus der Gruppe, die im Zusammenhang mit diesen Erkrankungsprozessen bisher noch nicht beschrieben waren.

Insgesamt zeigte sich eine gute Korrelation von Microarray und RealTime-PCR der identifizierten Zielgene, die in nachfolgenden Arbeiten auf Proteinebene verifiziert und anschließend in funktionelle Untersuchungen eingeschlossen werden sollen.

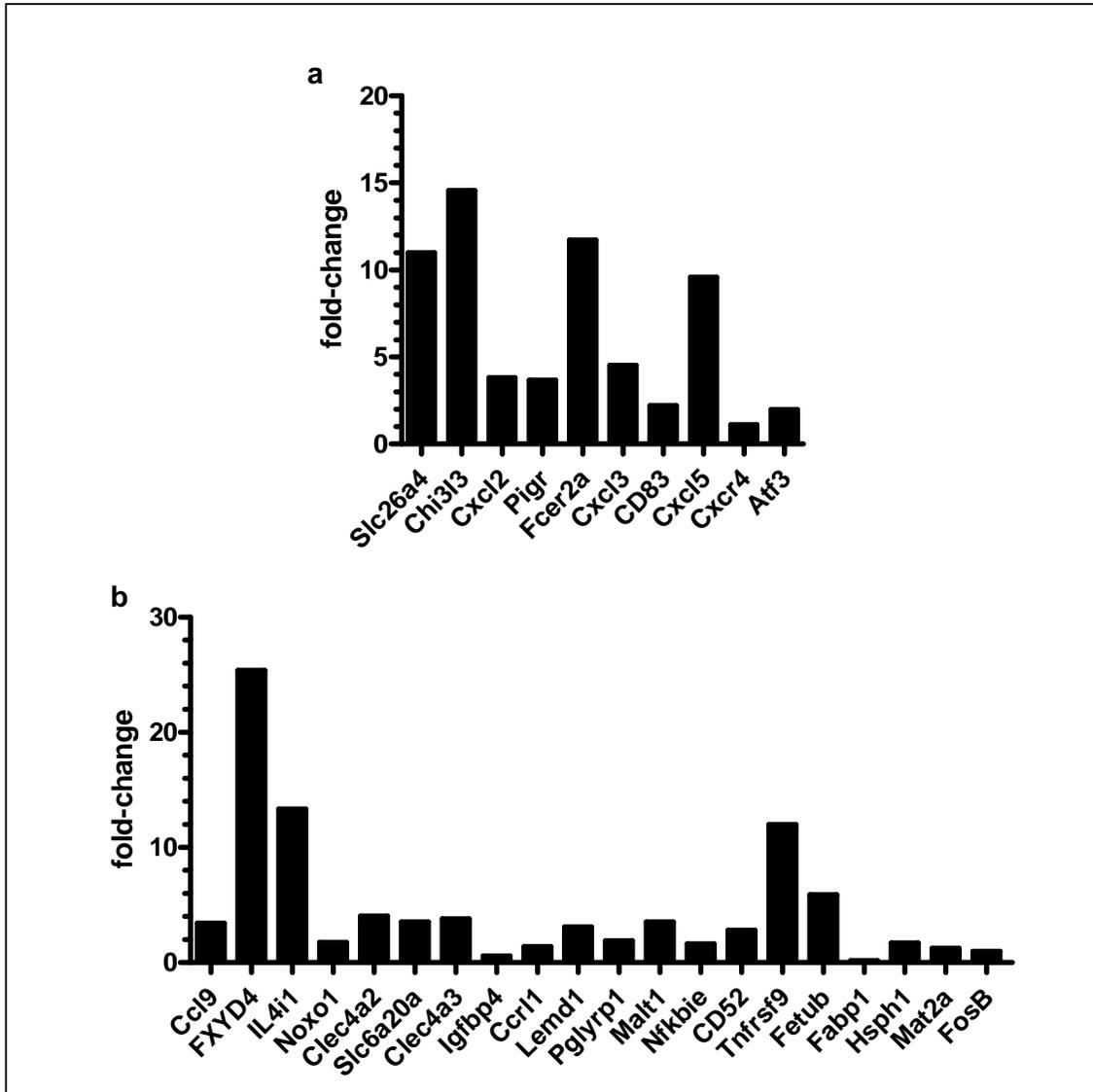


Abbildung 10: Bestimmung der relativen Genexpression von 30 in der Microarrayanalyse identifizierten Zielsequenzen, die eine mindestens 2-fach differenzielle Genexpression zeigten

Mittels Sybr Green RealTime-PCR Analyse wurde die Expression der 30 Sequenzen aus AECII von Tieren, die mit OVA+/-IL-4 behandelt worden waren im Verhältnis zur RNA aus Tieren, die nur mit OVA behandelt wurden, bestimmt. Die Expression wurde pro Gen in Dreifachansätzen bestimmt. Es wurden AECII von je 5 Tieren/Gruppe nach Isolation zusammengefasst a) RealTime-PCR Analyse von 10 Genen, die in der Literatur im Zusammenhang mit Asthma, Allergie, Atemwegsentzündung, AHR und Lunge beschrieben sind. b) Realtime PCR Analyse von 20 Genen, die in der Literatur bisher nicht mit den Begriffen Asthma, Allergie, Atemwegsentzündung, AHR und Lunge assoziiert werden konnten.(gemeinsame Darstellung der Ergebnisse von 3 Studien mit n=5 Tieren pro Gruppe)

7.3 Wirkung von Alveolarepithelzellen Typ 2 ähnlichen LA4 Zellen auf die Aktivierung von TC

Um den Einfluss von AECII auf die Sensibilisierung funktionell zu untersuchen, entwickelte ich ein in vitro Ko-Kultur-System, in dem der Einfluss einer AECII ähnlichen Epithelzelllinie namens LA4 auf die Proliferation, den Aktivierungszustand und die Expression kostimulatorischer Oberflächenproteine von TC analysiert werden kann. Hierfür wurden OVA-spezifische TC zusammen mit APC oder knochenmark-generierten DC aus Wildtyp-Tieren auf einer Einzel-Zellschicht einer murinen Epithelzelllinie, den LA4 Zellen kultiviert. Die APC oder DC induzieren bei Hinzugabe des spezifischen Antigens OVA oder des OVA-Peptids₃₂₃₋₃₃₇ die Aktivierung der OVA-spezifischen TC. Durch Ko-Kultur dieses Systems mit den LA4 Zellen, die phänotypisch am ehesten AECII entsprechen (Stoner et al., Cancer Res. 1975), kann der Einfluss dieser Zellen auf die T-Zellaktivierung untersucht und überprüft werden. Änderungen dieses Effekts durch Behandlung der Epithelzellen vor Kulturbeginn mit IL-4 konnten in diesem System beschrieben werden. Ich verglich Kulturen, in denen die AECII zuvor mit IL-4 behandelt wurden mit Kulturen, die unbehandelte Epithelzellen überschichten.

7.3.1 LA4 Epithelzellen supprimieren die Proliferation von TC

Um die Kinetik der Einflussnahme von AECII auf die T-Zellaktivierung zu untersuchen, bestimmte ich zunächst die T-Zellproliferation von TC/DC Kulturen (Abbildung 11), die auf LA4 Zellen kultiviert wurden, an den Tagen 3, 4, 5, 6 und 7 nach Ansetzen der Kultur. Die Versuchsansätze sind in Tabelle 14 aufgeführt. Als Maß für die T-Zellproliferation untersuchte ich durchflusszytometrisch die Verdünnung von CFSE, einem Farbstoff, der bei Zellteilung gleichmäßig auf die zwei Tochterzellen verteilt wird, so dass sich seine Fluoreszenz mit jeder Zellteilung halbiert. Die Proliferation wird durch Antigenpräsentation von DC stimuliert, die 24 Stunden vor der Kultur mit OVA beladen wurden. Im Rahmen dieser Messungen bestimmte man den prozentualen Anteil der Zellen, die eine niedrige CFSE-Fluoreszenz zeigten (Abbildung 12 b) und somit mehrere Zellteilungen durchlaufen hatten. Als Kontrolle wird der Anteil der CFSE-hohen Zellen bestimmt (Abb. 12 a), jeweils zu Beginn der Kulturen und zu den folgenden Zeitpunkten, die eine stabile, hohe Fluoreszenzintensität zeigen, da sie keine Zellteilungen durchgemacht haben und somit kein CFSE „verdünnt“ haben.

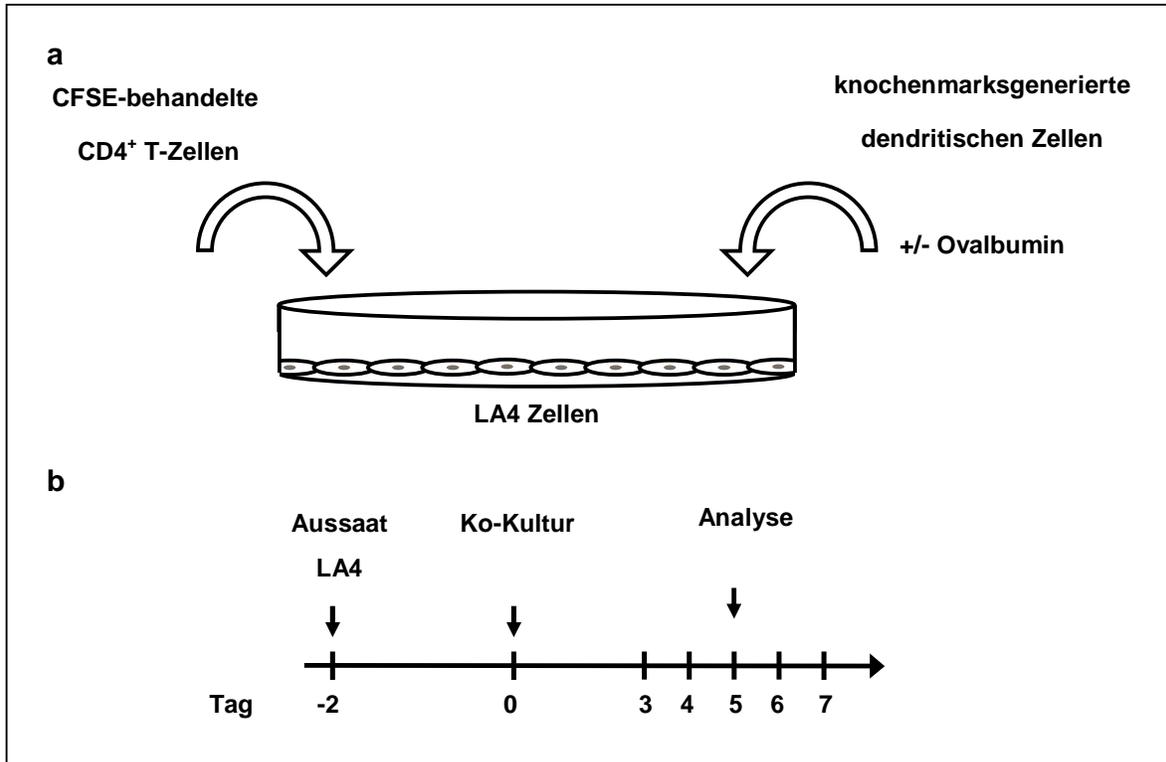


Abbildung 11: Schematische Darstellung des in vitro Ko-Kultursystems

- (a) Schematische Darstellung des Ko-Kultur-Systems, bei dem CFSE-behandelte OVA-spezifische CD4⁺ TC zusammen mit knochenmarksgenerierten antigenpräsentierenden DC auf einer Schicht von LA4 Zellen kultiviert werden.
- (b) Darstellung der Zeitachse der Kultur. Zwei Tage vor der Kultur wurden die LA4 Zellen ausgesät. Nach 3 bis 7 Tagen wurden die Zellen auf ihre Proliferation hin untersucht.

Versuchsansatz	Antigen	Bezeichnung
1. TC + DC	OVA	Positivkontrolle
2. TC + DC	-	Negativkontrolle
3. TC + DC + LA4	OVA	Versuchsgruppe

Tabelle 14: Versuchsansätze für die in vitro Ko-Kultur

Versuchsansätze für die in vitro Ko-Kultur von TC, knochenmarkgenerierten DC und einer murinen, alveolaren Epithelzelllinie (LA4). Das verwendete Antigen in den Kulturen war OVA. 1.) Kultur von TC mit knochenmarksgenerierten DC und OVA (Positivkontrolle). 2.) Kultur von TC und DC ohne Antigenpräsentation (Negativkontrolle). 3.) Kultur von TC mit DC und OVA auf einer Schicht LA4 Zellen (Versuchsgruppe).

Die Analysen zeigten, dass bereits am dritten Tag eine verstärkte Proliferation von TC stattfindet, wenn diese mit DCs und OVA kultiviert werden (Abbildung 12 c, rote Linie, =Positivkontrolle). Zu diesem Zeitpunkt zeigen 28 bis 42 % der Zellen eine Abnahme an intrazellulärem CFSE. Nach 6 Tagen erreicht die Zellproliferation ein Plateau bei 90 %. Die Kulturen, in denen TC mit DCs kokultiviert wurden, aber kein Antigen enthalten war, zeigten kaum Proliferation (1%, blaue Linie, Abbildung 12 c). Die Kultur der TC mit DCs und Antigen auf LA4 Epithelzellen führte zu einer deutlichen Unterdrückung der Proliferation (schwarze Linie, Abbildung 12 c) im Vergleich zu den Kulturen, in denen keine Epithelzellen enthalten waren (rote Linie, Abbildung 12 c). Die Proliferation der TC wurde derart unterdrückt, dass der prozentuale Anteil der CFSE-niedrigen Zellen mit 1,8 bis 13,3% während aller Analysezeitpunkte in einem Bereich lag, der dem der Kulturen ohne Antigen (blaue Linie, Abbildung 12 c) entsprach.

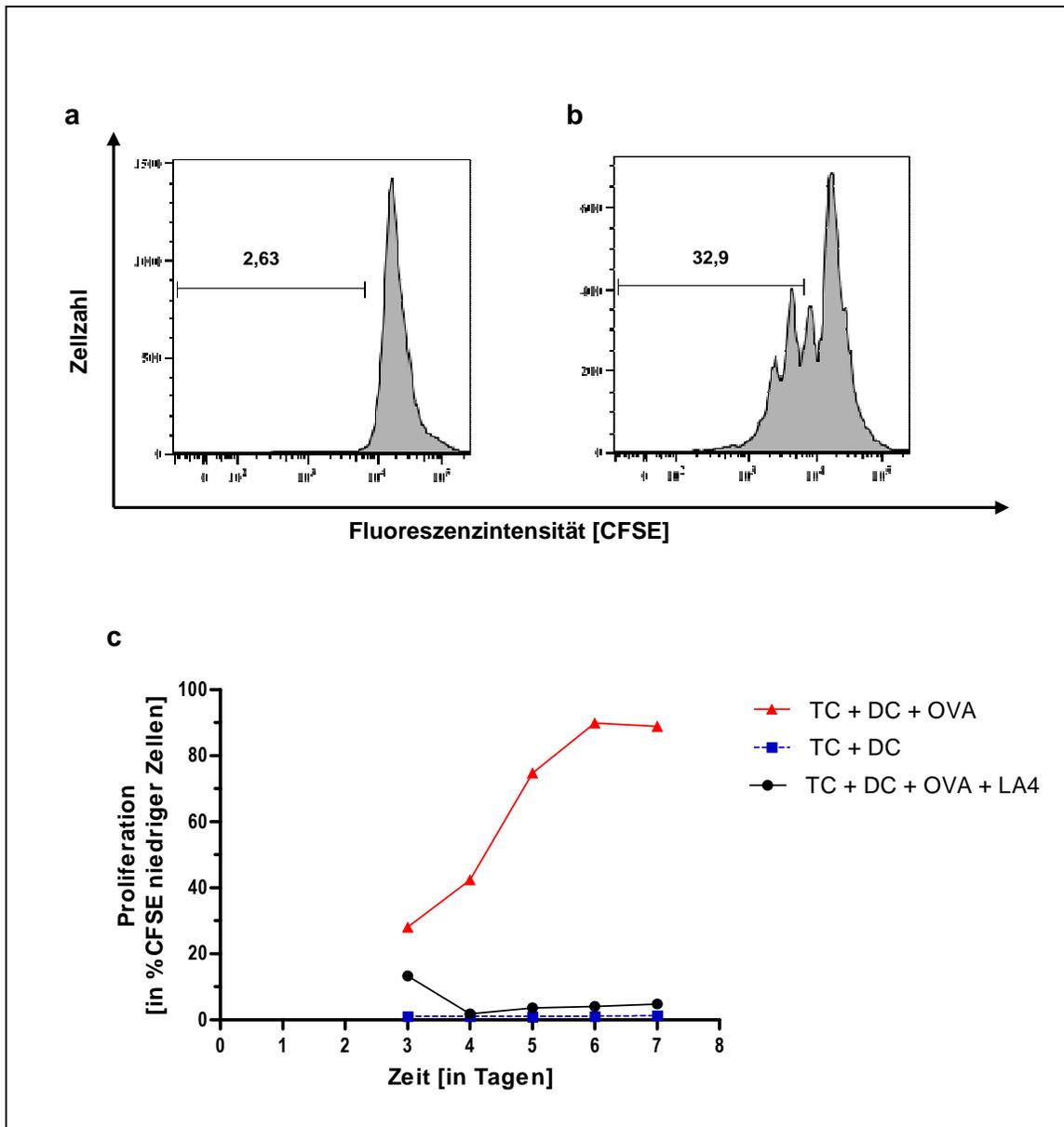


Abbildung 12: T-Zellproliferation in der Ko-Kultur

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden $CD4^+$ /OVA-TCR-transgene TC in den Kulturen durchflusszytometrisch durch Anfärbung mit Antikörpern gegen CD4 und den transgenen TCR (Klon KJ1-26) identifiziert und auf den intrazellulären CFSE-Gehalt hin untersucht. a) unproliferierte Zellen zeigen eine Zellpopulation mit starkem CFSE-Fluoreszenzsignal. b) Proliferierende Kulturen weisen mehrere Populationen mit unterschiedlich starken CFSE-Fluoreszenzintensitäten auf. c) Vergleich von Ko-Kulturen von TC und DCs versus TC und DCs und LA4 Zellen. Blaue Kurve: TC + DC in Abwesenheit von Antigen. Rote Kurve: TC + DC+ OVA (OVA = präsentiertes Antigen). Schwarze Kurve: TC + DC+ LA4 + OVA = Kultur von TC und DCs, die Alveolarepithelzellen überschichtet. (Experiment von n=1 Ansätzen)

Für die weiteren Kulturen entschied ich mich dafür, die Zellen nach 4 Tagen Kultur zu analysieren. Zu diesem Zeitpunkt zeigte die Positivkontrollen bereits eine deutliche Proliferation, hatte aber noch nicht das Maximum der Proliferation erreicht, so dass Veränderungen der LA4-abhängigen Unterdrückung der T-Zellproliferation gut identifizierbar sein sollten.

7.3.2 LA4 Epithelzellen wirken über Zellkontakt auf die T-Zellaktivierung ein

Für eine genauere Untersuchung des inhibitorischen Effekts von AECII wurden die TC/DC Kulturen durch Transwell® Einsätze räumlich von den Epithelzellen getrennt, so dass die Epithelzellen nur noch über Mediatoren, die in das Medium sezerniert werden, mit den Leukozyten interagieren konnten, nicht aber über direkten Zellkontakt (Abbildung 13).

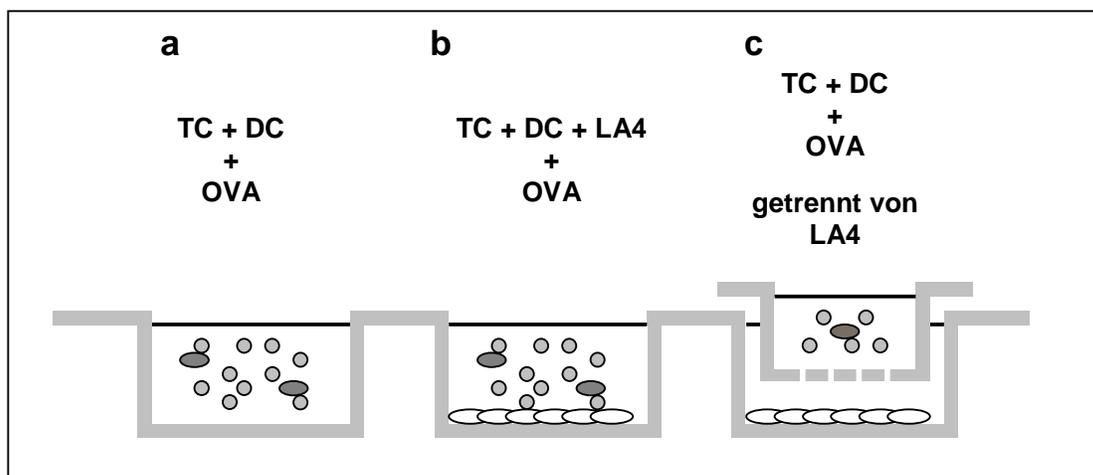


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Ko-Kulturansätze mit Transwelleinsätzen

Schematische Darstellung der Ko-Kulturansätze. (a) TC/DC Kultur in der OVA präsentiert wird. (b) TC/DC Kultur mit OVA, die LA4 Zellen überschichtet. (c) TC/DC Kultur mit OVA, die durch Transwell® Einsätze von LA4 Zellen getrennt sind. Die hellgrauen Kreise stellen TC, die dunkelgrauen Ellipsen, DC und die weißen Ellipsen stellen LA4 Zellen dar. Der Mediumspiegel wird durch einen dünnen schwarzen Strich und das Probengefäß mit dicken hellgrauen Linien dargestellt.

Es zeigte sich, dass die räumliche Trennung der TC/DC-Kulturen von den LA4 Zellen einen signifikanten Effekt auf die T-Zellproliferation hat. Die LA4-Epithelzellen reduzierten die von DCs induzierte Proliferation der TC von 77 % auf 2 %. Wurden die Alveolarepithelzellen von den DCs und TC getrennt, wurde diese Suppression nahezu aufgehoben: es kam zu einer signifikanten Steigerung der T-Zellproliferation auf 72 % (Abbildung 14). Somit schien es, dass in dem System der inhibitorische Effekt der LA4 Zellen vorrangig durch kontaktabhängige Mechanismen und nicht über lösliche Mediatoren vermittelt wurde.

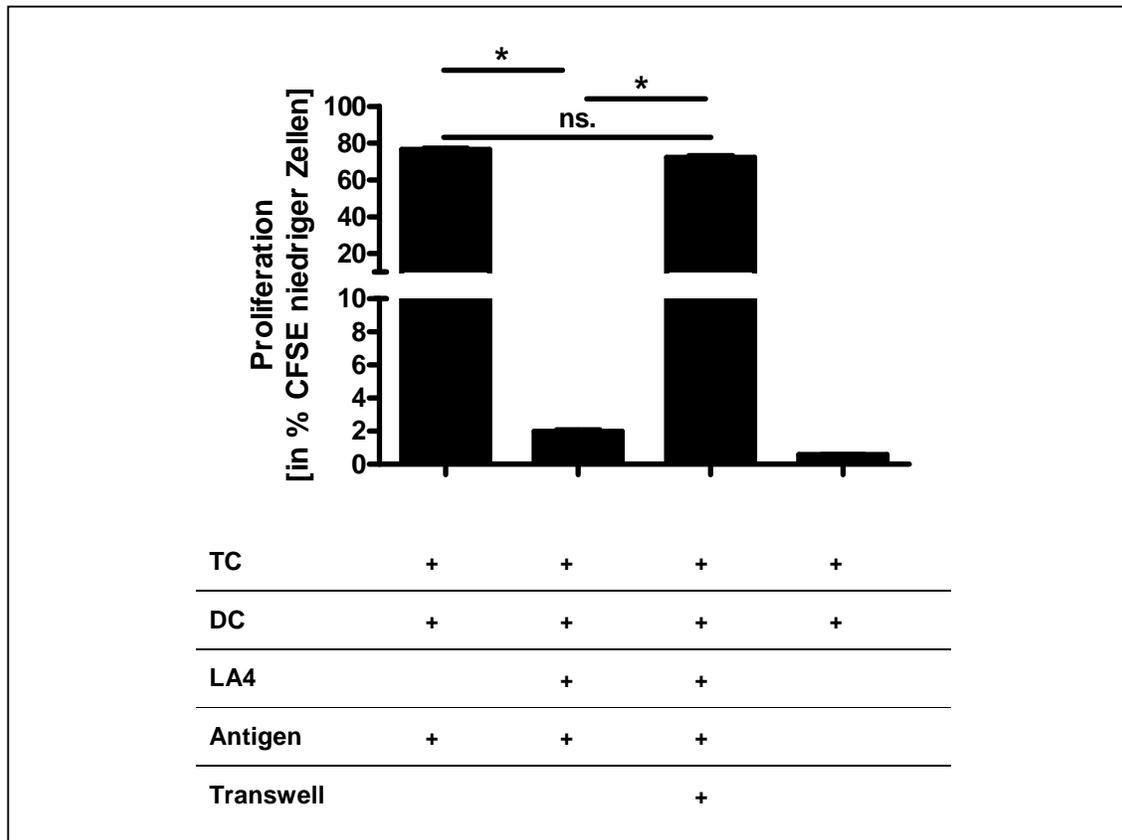


Abbildung 14: T Zellproliferation in Ko-Kulturen mit Transwelleinsätzen

Ko-Kultur von TC, DC, LA4 Zellen und OVA für 4 Tage zur Untersuchung der Kontaktabhängigkeit der Epithelzellsuppression. Die Kulturen wurden zusammen, oder durch einen Transwell®-Einsatz (s. Abb. 13) räumlich voneinander getrennt. Die T Zellproliferation wurde wie oben durch CFSE-Verdünnung in CD4+/KJ1-26+ Zellen an Tag 4 bestimmt. Positivkontrolle (TC+DC+OVA) vs. Negativkontrolle ohne Antigen (TC+DC) vs. Versuchsgruppe ohne Transwell (TC+DC+OVA+LA4) vs. Versuchsgruppe im Transwell (TC+DC+OVA+LA4 Transwell). (Repräsentatives Experiment von n=4, Versuchsgruppen jeweils als Vierfachansätze angelegt. Mann-Whitney-U-Test, * entspricht Signifikanzniveau P<0,05, ns. = nicht signifikant)

7.3.3 LA4 Epithelzellen wirken auch in Kulturen von TC mit APC aus der Milz inhibitorisch auf die T Zellaktivierung

Eine mögliche Ursache für eine reduzierte T-Zellproliferation in den Kulturen, in denen sich LA4 Zellen befanden, konnte darin liegen, dass die DC durch die Kokultur mit Alveolarepithelzellen nicht an der Oberfläche der Kulturschale adhären konnten. Da Adhärenz für die Kultur von DC wichtig ist, war es möglich, dass sie dadurch die T Zellproliferation schlechter induzieren konnten. Daher führten wir zusätzlich Kulturen mit APC aus der Milz durch. Diese Zellen adhären nicht, sondern befinden sich frei beweglich im Kulturmedium und können in einer Kokultur mit TC durch Antigenpräsentation einer spezifischen Peptidsequenz des OVAs die Proliferation anregen. Im direkten Vergleich mit Kulturen, in denen DCs das Antigen präsentieren (Abbildung 15, schwarz, DC), zeigte sich, dass LA4 Zellen auch in Kulturen mit APC aus der Milz (Abbildung 15, weiß, APC) die T-Zellaktivierung inhibieren. Dabei war auch die Stärke der Inhibition ähnlich, da in beiden

Kulturen die Proliferation von 82 % in Kulturen mit DC und 86 % in Kulturen mit APC aus der Milz auf 12 % beziehungsweise 18 % reduziert wurde. Auch hinsichtlich der zugrundeliegenden Mechanismen zeigten sich Gemeinsamkeiten: sowohl in Kulturen mit APC, wie mit DC wurde die Inhibition durch die LA4 Zellen deutlich abgeschwächt und die Proliferation stieg auf 50 % bei Kulturen mit DC und 59 % bei APC aus der Milz, wenn die LA4 Zellen durch Transwell-Einsätze von den T Zellen und DCs getrennt wurden. In beiden Fällen scheinen also zellkontaktabhängige Mechanismen eine Rolle zu spielen.

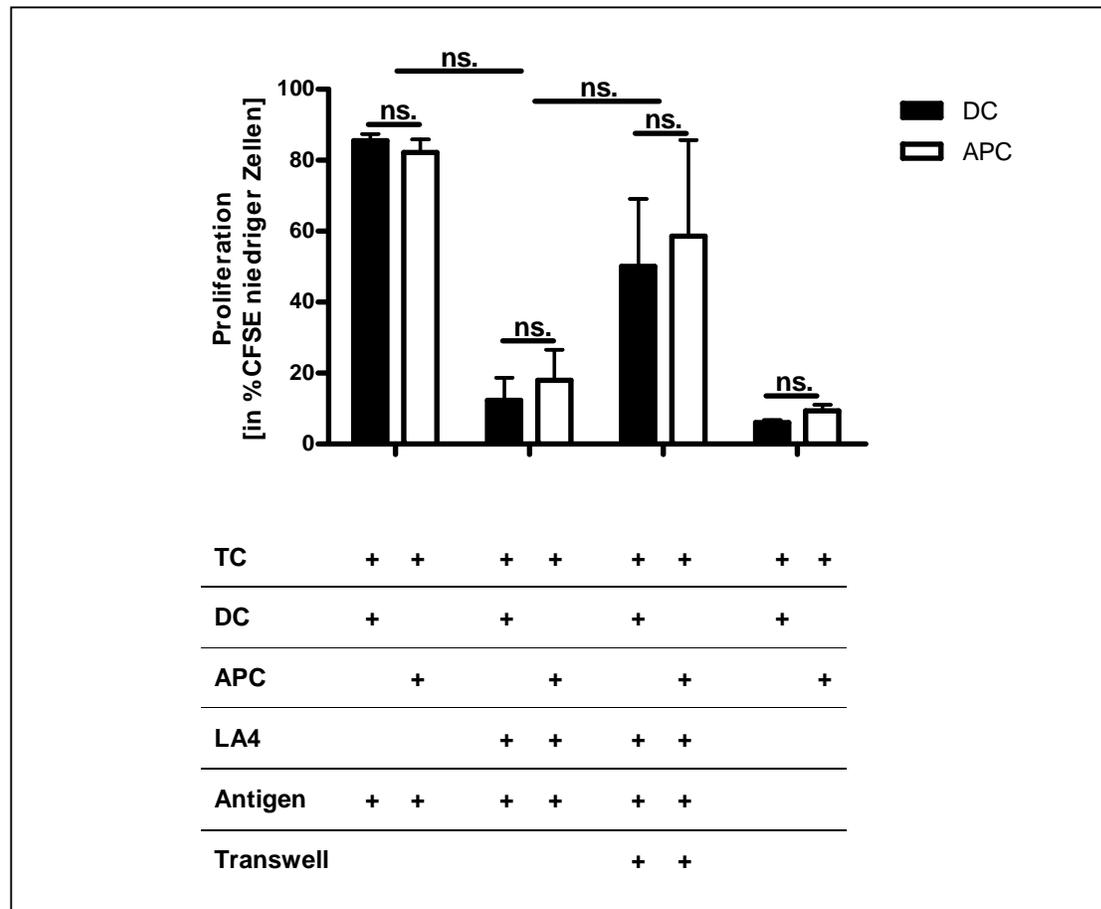


Abbildung 15: Vergleich der T-Zellproliferation von Ko-Kulturen mit APC aus der Milz versus knochenmarkgenerierten DC.

Ko-Kultur von TC, DC, LA4 Zellen und OVA für 4 Tage jeweils mit und ohne Transwell zur Evaluation der Kontaktabhängigkeit der Suppression. Induktion der T Zellproliferation durch DC (schwarze Balken) mit OVA als Antigen bzw. APC (weisse Balken) mit OVA-Peptid als Antigen. Positivkontrolle mit OVA/OVA-Peptid (TC+DC+OVA bzw. TC+APC+OVAp) versus Negativkontrolle ohne Antigen (TC+DC bzw. TC+APC) versus Kokultur mit LA4 Zellen und Antigen (TC+DC+LA4+OVA versus TC+APC+LA4+OVAp) versus Kokultur mit LA4 Zellen und Antigen im Transwell (TC+DC+LA4+OVA Transwell versus TC+APC+LA4+OVAp Transwell). (Repräsentatives Ergebnis von n=2, die einzelnen Versuchsansätze wurden in Doppelbestimmungen gemessen ungepaarter t-Test mit Welch Korrektur; Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und die Proliferation in Kulturen mit DC war nicht signifikant verschieden von der in Kulturen mit APC aus der Milz. ns.=nicht signifikant)

7.3.4 LA4 Epithelzellen beeinflussen den Aktivierungszustand von TC

Für eine genauere Charakterisierung der Mechanismen, durch die AECII, die T-Zellproliferation beeinflussen, untersuchte ich die Differenzierung der TC in den Kulturen, indem ich die Expression der Oberflächenmoleküle L-Selektin (CD62L) und CD44 untersuchte, so wie den Aktivierungszustand der Zellen anhand des IL-2-Rezeptors (CD25) und des C-Typ-Lectins (CD69) als klassische Aktivierungsmarker der T-Zellaktivierung durchflusszytometrisch in den verschiedenen Kulturansätzen.

CD62L das auch als L-Selektin bekannt ist findet sich auf der Oberfläche von naiven T Zellen und ist beteiligt an der Rekrutierung von naiven Lymphozyten in die sekundären lymphatischen Organe, wie z. B. den Lymphknoten. CD62L diente mir als Marker für einen naiven Differenzierungsstand der T Zelle. CD44 hingegen findet sich verstärkt auf der Oberfläche von T Effektorzellen und T Gedächtniszellen und repräsentiert hier ein Maß für die Differenzierung in T Effektorzellen.

CD25 und CD69 dienen mir als Marker für die Zellaktivierung, da beide Moleküle erst nach der T Zellaktivierung induziert und vermehrt exprimiert werden, wobei CD69 einen Marker für die frühe Phase der Aktivierung ist, da es zu den ersten induzierten Molekülen zählt, während CD25 erst wenige Stunden nach der T Zellaktivierung auf der Zelloberfläche exprimiert wird.

Es zeigte sich, dass die CD4⁺ TC (Abbildung 16 a und b) in Kulturen, ohne Antigenpräsentation, vor allem eine hohe Expression an L-Selektin und wenig CD44 aufweisen (73,7 %, Abbildung 16 c). Einen entsprechenden Phänotyp weisen auch naive T-Zellen auf (Abbildung 16 c=Negativkontrolle). Nach Antigenkontakt zeigten 71,1 % der CD4⁺ Zellen eine starke Expression von CD44, während CD62L herunterreguliert wurde (Abbildung 16 d), so dass nur noch 27,7 % der Zellen L-Selektin auf der Oberfläche trugen (Abbildung 16 d). In Anwesenheit von LA4 Zellen waren TC, die sowohl L-Selektin, wie auch CD44 exprimierten mit 45 % die vorherrschende Population, während CD44⁺ CD62L⁻ TC nur 26 % ausmachten (Abbildung 16 e). Zusammenfassend zeigte sich, dass die TC in Anwesenheit von Antigen und nach Kontakt mit AECII die Expression von CD44 (71 % CD44⁺, Abbildung 16 e) induzierten, aber weiterhin L-Selektin auf der Oberfläche präsentiert wurde (45 % der CD44⁺, Abbildung 16 e), welches durch die Aktivierung der TC in Abwesenheit von AECII herunterreguliert wurde. Vergleiche zwischen Kulturen von DC mit Kulturen von APC aus der Milz zeigten ähnliche Effekte der Epithelzellen: Nach der Präsentation von Antigen waren 47 % der CD4⁺ TC in TC/APC Kulturen CD62L⁻ CD44⁺, während 41,5 % CD62L⁺ CD44⁺ waren (Abbildung 16 f). Der Kontakt mit Alveolarepithelzellen erhöhte den Anteil an CD62L⁺ CD44⁺ TC auf 59,7 % (Abbildung 16 g) In Kulturen von DC und TC hingegen waren 71,1 % der TC CD62L⁻ und CD44⁺ und 17,1 % CD62L⁺ CD44⁺ (Abbildung 16 d). Durch die Epithelzellen stieg der Anteil an CD4⁺ Zellen mit

hoher Expression von CD44 und CD62L in diesen Kulturen von 17,1 % (Abbildung 16 d) auf 45 % an (Abbildung 16 e), während der Anteil an CD44⁺ CD62L⁻ Zellen von 71,1 % (Abbildung 16 d) auf 26 % sank (Abbildung 16 e). Die induzierten Veränderungen sind somit phänotypisch ähnlich, wie die Beobachtungen in Kulturen von TC und DC.

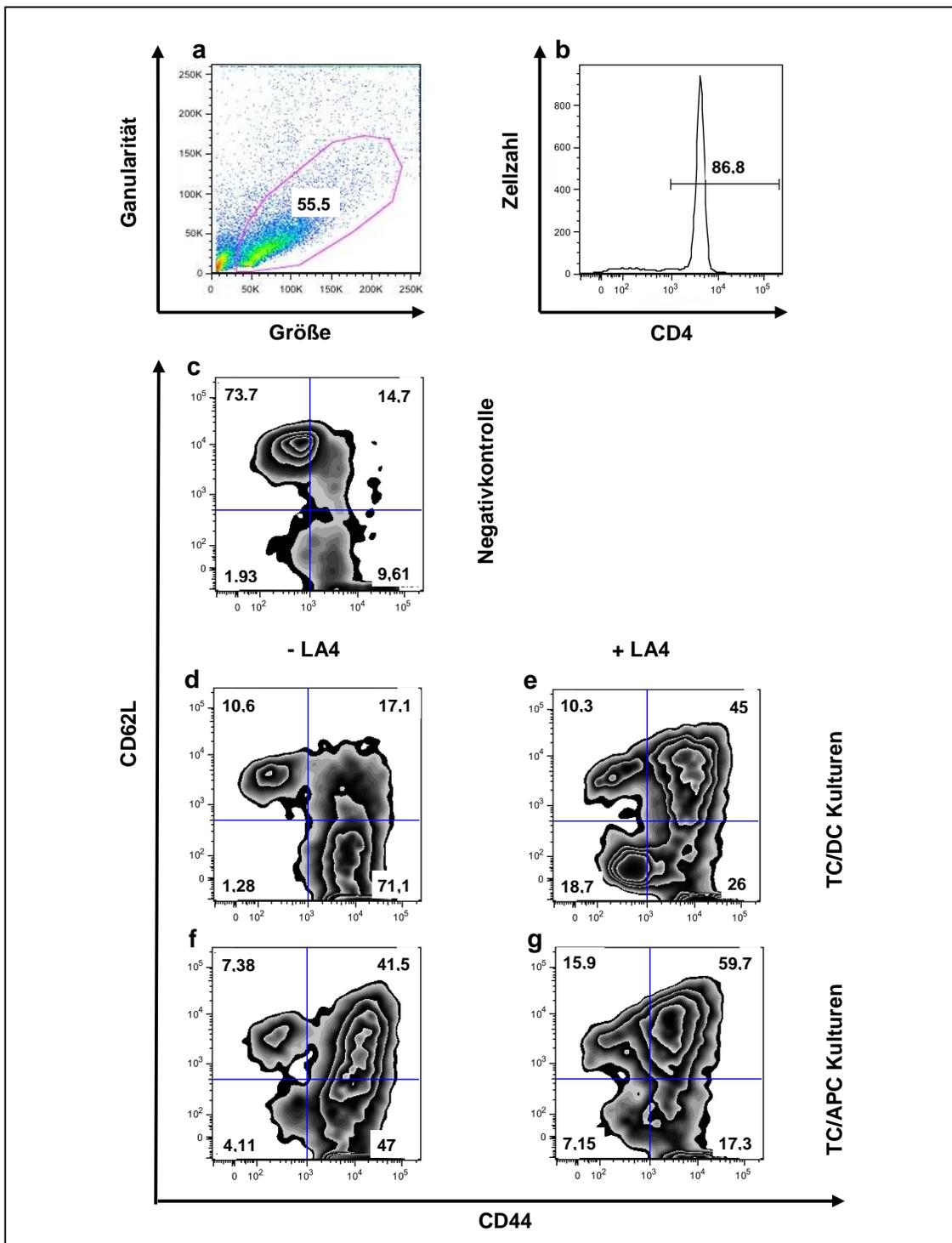


Abbildung 16: Modulation der Expression von CD44 und CD62L auf CD4⁺ Zellen durch APC und LA4 Epithelzellen

Messung der Oberflächenexpression von CD44 und CD62L auf CD4⁺ Lymphozyten, die 4 Tage mit OVA-präsentierenden DC oder OVAp-präsentierenden APC aus der Milz ko-kultiviert wurden. (a+b) Eingrenzung auf die Zielpopulation aufgrund von Größe und Granularität der Zellen und Expression von CD4. (c-g) Analyse der Expression von CD62L und CD44 auf CD4⁺ Zellen im Zebra-Plot. Die Einteilung in Quadranten erfolgte nach Isotypkontrolle. (c) TC/DC Kulturen ohne Antigen =Negativkontrolle. (d) TC/DC Kultur mit OVA-Präsentation. (e) TC/DC Kultur mit OVA-Präsentation, auf LA4 Zellen. (f) Kultur von TC, APC und OVAp. (g) Kultur von TC, APC und OVAp auf LA4 Zellen. (Repräsentatives Experiment von n=3 mit jeweils Doppelbestimmungen, n=2.)

Weiterhin konnte ich nach Präsentation von Antigen sowohl in Kulturen mit DC, wie auch in Kulturen mit APC aus der Milz eine Induktion von CD69 auf den CD4⁺ TC beobachten (Abbildung 17 b + d, TC/DC=79,4 % CD4⁺ CD69⁺, TC/APC=78 % CD4⁺ CD69⁺). In den Kulturen exprimierten 20,8 % der CD4⁺ Zellen (TC/DC Kulturen, Abbildung 17 b) bzw. 34,1 % (TC/APC Kulturen, Abbildung 17 d) der CD69⁺ Zellen zusätzlich CD25. Durch die Kultivierung auf LA4 Zellen wurde sowohl die Expression von CD69, wie auch CD25 stark abgeschwächt. In Kulturen von TC und DC sank der Anteil von CD69⁺ CD4⁺ Zellen von 79,4 % auf 37,12 % und der Anteil an CD4⁺ CD69⁺ CD25⁺ Zellen sank von 20,8 % auf 8,62 % (Abbildung 17 b + c). In Kulturen mit APC aus der Milz zeigte sich ein ähnlicher Effekt. Der Anteil an CD4⁺ CD69⁺ CD25⁺ Zellen sank von 34,1 % auf 9,29 % (Abbildung 17 d und e)

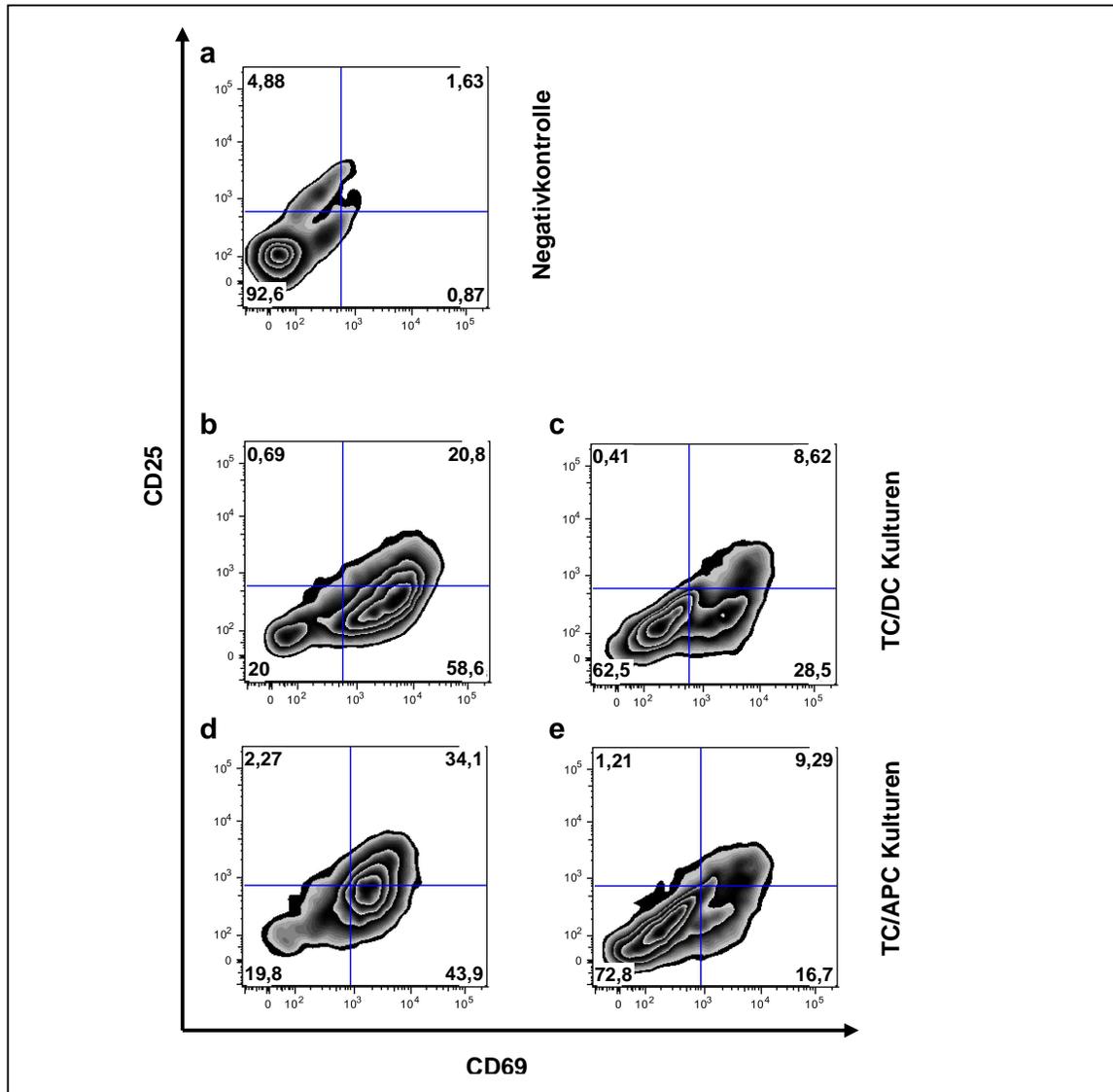


Abbildung 17: Modulation der Expression von CD25 und CD69 auf CD4⁺ Zellen durch APC und LA4 Epithelzellen.

Messung der Oberflächenexpression von CD25 und CD69 auf CD4⁺ Zellen, die 4 Tage mit OVA-präsentierenden DC oder OVAp-präsentierenden APC aus der Milz ko-kultiviert wurden. Die Identifikation der CD4⁺ Zellen (gating-Strategie) erfolgt in Analogie zu Abb. 16 a und b mit Einteilung in Quadranten anhand von Isotypkontrollen. Untersucht wurden Kulturen von TC und DC ohne Antigenpräsentation =Negativkontrolle (a), TC/DC Kulturen mit OVA-Präsentation =Positivkontrolle (b), Kulturen von TC mit OVA-präsentierenden DC auf LA4 Zellen (c), sowie Kulturen von TC, APC und OVAp =Positivkontrolle (d) und TC/APC/OVAp Kultur auf LA4 Zellen (e). (Repräsentatives Experiment von n=3 mit jeweils Doppelbestimmungen, n=2.)

Die schwächere Expression des IL-2 Rezeptors und des C-Typ Lectin CD69, wie auch die fehlende Regulation CD62L in Kulturen mit LA4 Zellen zeigten, dass die AECII den Wechsel von einem naiven zu einem aktivierten Zustand der TC inhibieren.

7.3.5 LA4 Epithelzellen induzieren keine FoxP3⁺ T-Zellpopulation

Eine mögliche Erklärung für die Reduktion der Proliferation und den reduzierten Aktivierungszustand der TC durch die LA4 Zellen könnte in der Induktion von T_{Reg} durch die LA4 Zellen liegen. T_{Reg} unterdrücken die Aktivierung anderer TC und ihre Induktion ist in einem ähnlichen Ko-Kultur-System bereits beschrieben worden (Wang et al., Thorax 2009).

Daher untersuchte ich in einem weiteren Schritt die Induktion von T_{Reg}, indem ich intrazelluläres FoxP3, als T_{Reg}-spezifischen Transkriptionsfaktor, in den CD4⁺-Zellen bestimmte (Abbildung 18). Im Gegensatz zu bereits publizierten Daten hinsichtlich der Induktion von T_{Reg} durch alveolare Epithelzellen (Gereke et al., Am.J.Respir.Crit Care Med. 2009; Wang et al., Thorax 2009), konnten wir die Induktion von T_{Reg} in unseren Kulturen nicht nachvollziehen: In Kulturen, in denen knochenmarksgenerierte DC das Antigen präsentierten, wurde die Expression von FoxP3 bei Zugabe von Antigen induziert. Während in Abwesenheit von Antigen nur 4,1 % der Zellen FoxP3 exprimieren, stieg der Anteil bei Antigengabe auf 13,1 % an. Die Gegenwart von AECII hatte jedoch einen stark negativen Effekt auf die Expression von FoxP3 in den TC. So wurde der Anteil an FoxP3⁺ Zellen in Kulturen mit AECII auf 3,3 % reduziert. Zudem konnte ich durch Untersuchungen mit Transwell-Einsätzen beobachten, dass dieser Effekt, vergleichbar mit den Beobachtungen der T Zellproliferation, auch über kontaktabhängige Interaktion vermittelt wurde, da der Anteil an FoxP3⁺ Zellen mit 6,6 % in diesen Kulturen doppelt so hoch war, wie in Kulturen, in denen die TC und DCs Kontakt mit LA4 Zellen hatten (Abbildung 18, schwarze Balken). Interessanterweise ist die Induktion der FoxP3 Expression nur in den Kulturen mit DC zu beobachten gewesen. In Kulturen von TC mit APC aus der Milz zeigte sich keine Änderung der FoxP3-Expression der Lymphozyten. In allen Kulturen mit APC aus der Milz lag der Anteil an FoxP3⁺-Zellen zwischen 5 bis 6,5 % (Abbildung 18, weiße Balken).

Diese Untersuchungen zeigten, dass die AECII nicht über die Induktion von T_{Reg}, respektive FoxP3, die T-Zellproliferation und –aktivierung beeinflussen, da die Expression von FoxP3 durch Antigengabe gesteigert wurde, Alveolarepithelzellen jedoch einen negativen Effekt auf die Expression dieses Transkriptionsfaktors hatten.

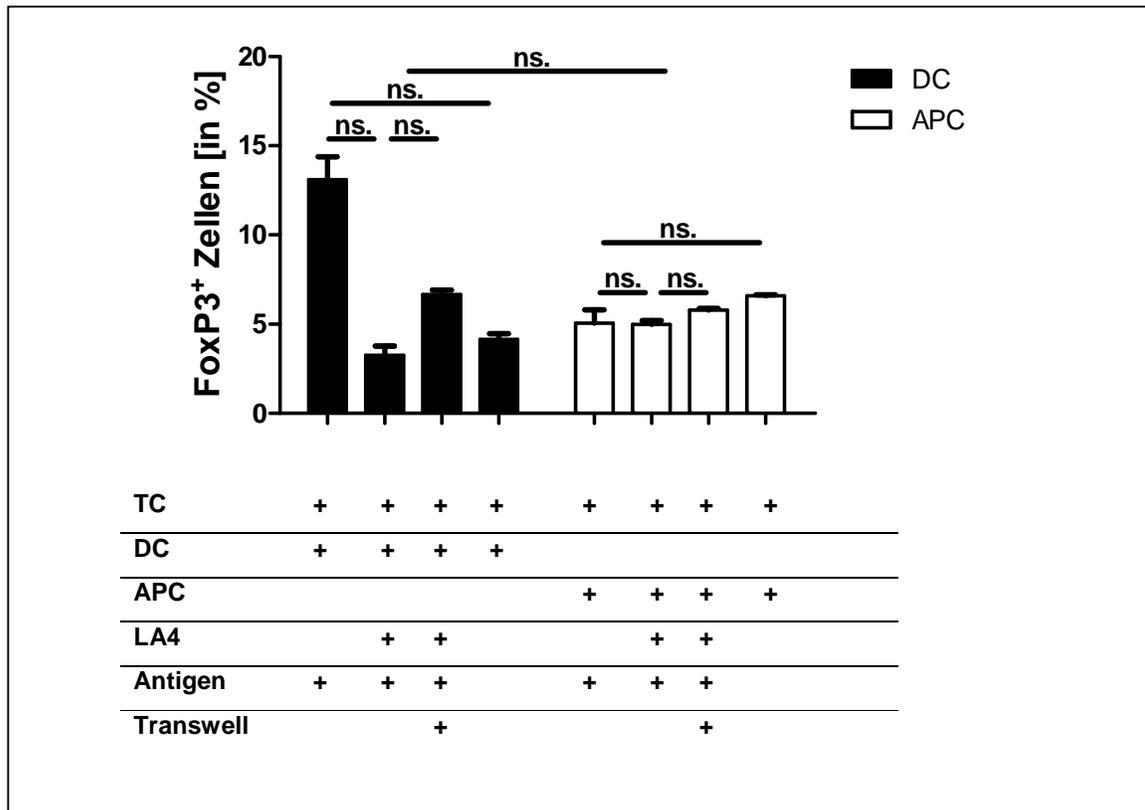


Abbildung 18: Modulation der Expression von FoxP3 in CD4⁺ Zellen durch APC und LA4 Epithelzellen

Expression von FoxP3 in CD4⁺ Zellen, die 4 Tage mit OVA-präsentierenden DC oder OVAp-präsentierenden APC aus der Milz ko-kultiviert wurden. Die Identifikation der CD4⁺ Zielzellen erfolgte in Analogie zu Abb. 16. Die Expression von FoxP3 wurde gemessen als prozentualer Anteil an FoxP3⁺ Zellen der Population CD4⁺ Zellen. (Repräsentatives Experiment mit zwei Bestimmungen pro Ansatz zur FoxP3 Expression in CD4⁺ TC, die mit DC, beziehungsweise APC aus der Milz zusammen mit LA4 Zellen kokultiviert wurden. Insgesamt wurde das Experiment sechsmal durchgeführt. P<0,05 Mann-Whitney-U-Test, ns.=nicht signifikant)

7.4 Die Wirkung von AECII ähnlichen LA4 Epithelzellen auf T-Zellen kann durch Behandlung mit IL-4 beeinflusst werden

7.4.1 LA4 Zellen bilden CD124 mRNA und Protein

In den folgenden Untersuchungen analysierte ich, ob IL-4 in einem vereinfachten in vitro Ko-Kultursystem ähnliche Effekte auf die LA4 Epithelzelllinie hat, wie ich sie in den Studien mit einem murinen Sensibilisierungsmodell beobachten konnte. Zunächst galt es allerdings, die Frage zu beantworten, ob die LA4 Zellen auf IL-4 reagieren können. Hierfür wies ich die mRNA Expression der IL-4 Rezeptor α -Untereinheit (CD124) anhand von RealTime-PCR Analyse von cDNA aus LA4 Zellen nach. Mit CD124-spezifischen Primern konnten wir ein circa 150 bp grosses Amplifikat nachweisen, der zu erwartenden Größe des für die alpha-Untereinheit des IL-4 Rezeptors kodierenden

Gens. Auch die Expression des CD124 Proteins konnten wir mithilfe von Western Blot Analyse von Proteinextrakten aus LA4 Zellen zeigen. Ein für die alpha-Untereinheit spezifischer polyklonaler Antikörper detektierte eine Bande bei circa 140 kDa, der erwarteten Größe des Proteins (Abbildung 19 a und b) sowohl in Proteinlysaten von Splenozyten (Abb. 19 b „+“), von denen bekannt ist, dass sie CD124 exprimieren (Park et al., J.Exp.Med. 1987), aber auch in Proteinlysaten von LA4 Zellen (Abb. 19 b „LA4“).

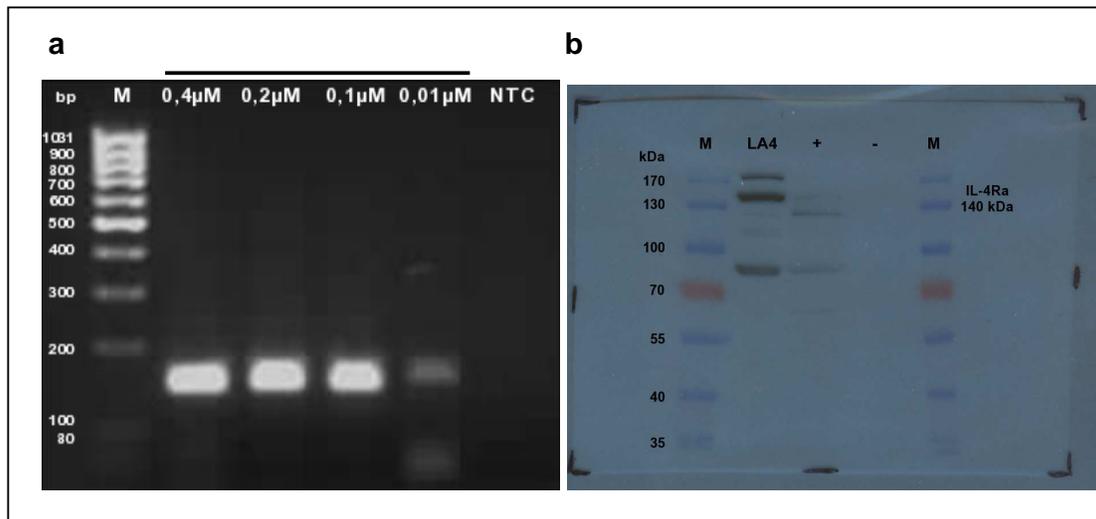


Abbildung 19: Nachweis der IL-4 Rezeptor α Untereinheit (CD124) in LA4 Zellen auf mRNA und Proteinebene

Nachweis der IL-4 Rezeptor α Untereinheit (CD124) durch (a) PCR von cDNA aus LA4 Zellen. Es wurde ein circa 150 bp großes Amplifikat mit 4 verschiedenen Primermengen (0,01µM – 0,4µM) synthetisiert. In der Spur NTC (= no template control) wurde eine Reaktion mit 0,2µM Primer ohne cDNA aufgetragen, M= Marker-DNA. (b) Western Blot Analyse von Gesamtprotein aus LA4 Zellen. Es wurden 100µg Proteinlysate von LA4 Zellen (LA4) oder Splenozyten (+) oder Lysispuffer alleine (-) aufgetragen. M=DNA- (a) bzw. Proteinmarker (b) definierter Größe.

7.4.2 Die Behandlung mit IL-4 schwächt die inhibitorische Wirkung von Epithelzellen auf die T-Zellproliferation ab

Nachdem ich zeigen konnte, dass die Epithelzelllinie LA4 die alpha-Untereinheit des IL-4 Rezeptors exprimiert, wollte ich die Effekte von IL-4 in dem in vitro Ko-Kultur-System studieren. Hierzu wurden LA4 Zellen vor der Ko-Kultur mit verschiedenen Konzentrationen von IL-4 im Medium kultiviert. Vor der Ko-Kultur mit TC und DC wurde das Medium durch mehrmaliges Waschen ausgetauscht, so dass das Zytokin keinen direkten Einfluss auf die TC oder APC haben konnte. Es wurde die Wirkung von unbehandelten LA4 Zellen mit Kulturen, in denen mit IL-4 behandelte LA4 Zellen eingesetzt wurden verglichen. Zunächst behandelte ich die AECII mit einer eher geringen Menge von IL-4 (10 pg) sowie einer hohen Menge von IL-4 (200 ng), wobei diese Initialdosen auf Literaturangaben zur Verwendung von IL-4 in Zellkultursystemen basierten (Grabbe et al., J.Dermatol.Sci. 1997; Paolieri et al., Allergy 1997; White et al., Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol 2009). Um direkte Wirkungen von verbliebenem IL-4 auf die T-Zellaktivierung auszuschließen wurden TC mit DC in Abwesenheit von Antigen auf IL-4 behandelten AECII kultiviert.

Es zeigte sich, dass die Behandlung mit 200 ng oder 10 pg IL-4 den inhibitorischen Effekt der alveolaren Epithelzellen auf die T-Zellproliferation stark abschwächt. In Kulturen von TC und DC wiesen 80,7 % der Zellen Proliferation auf, während die Negativkontrolle ohne Antigen eine Proliferation von weniger als 1 % zeigte. In Kulturen, die mit unbehandelten Alveolarepithelzellen in Kontakt kamen proliferierten nur 4,3 % der Zellen. Die Gegenwart von IL-4 behandelten LA4 Zellen hatte einen signifikant schwächeren inhibitorischen Effekt auf die T-Zellproliferation, als unbehandelte LA4 Zellen. So proliferierten in Kulturen mit IL-4 behandelten LA4 Zellen 16,4 % der TC im Vergleich zu den 4,3 % proliferierenden TC in den Kulturen mit LA4 Zellen, die nicht mit IL-4 vorbehandelt worden waren (Abbildung 20). Im Bereich von 10 pg und 200 ng hat IL-4 einen gleich starken Effekt auf die AECII.

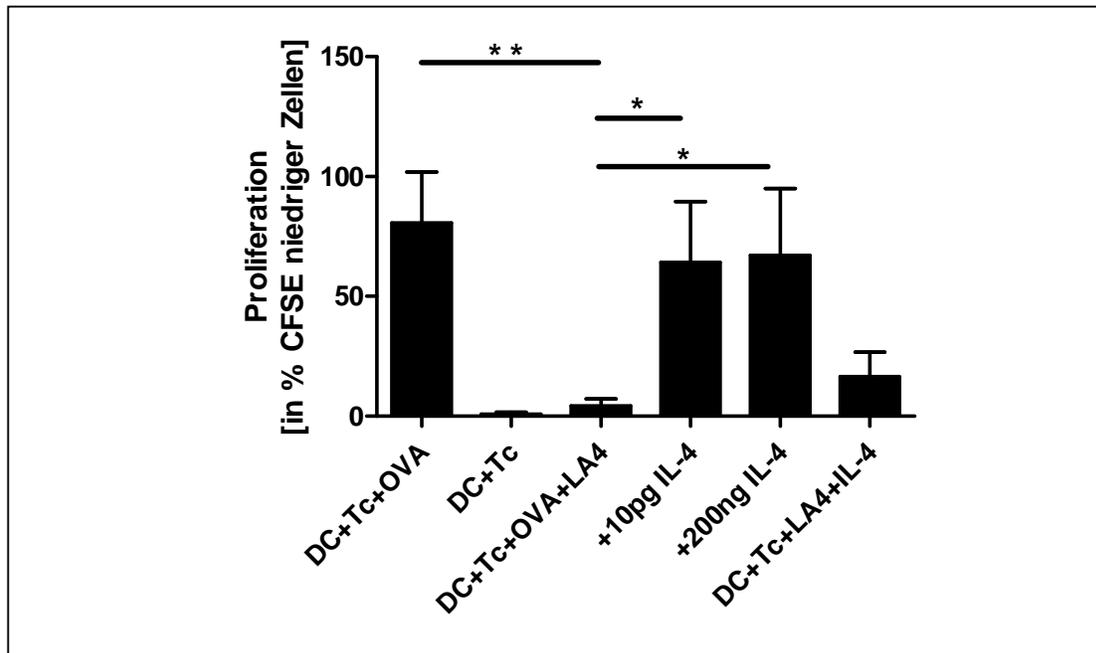


Abbildung 20: Effekt von IL-4 auf die LA4-abhängige Suppression der T-Zellproliferation.

Proliferation einer Ko-Kultur von TC, DC und LA4 Zellen. Vergleich von Kulturen mit TC, DC und OVA (Positivkontrolle), Kulturen von TC und DC in Abwesenheit von OVA (Negativkontrolle), Kulturen von TC, DC und OVA auf einer LA4 Zellschicht (Inhibitionsgruppe), Kulturen von TC, DC und OVA auf einer LA4 Schicht die mit 10pg oder 200ng IL-4 behandelt wurden (Behandlungsgruppen) und Kulturen, in denen TC, DC in Abwesenheit von Antigen auf einer Schicht von mit 10pg IL-4 behandelten LA4 Schicht kultiviert wurden (IL-4 Negativkontrollgruppe). Die Bestimmung der TC Proliferation erfolgte durch Messung der CFSE-Verdünnung. (Repräsentatives Experiment, in dem die Ansätze in Dreifachbestimmung gemessen wurden, n=3. Mann-Whitney-U-Test, * entspricht Signifikanzniveau $P < 0,05$ und ** entspricht Signifikanzniveau $P < 0,01$)

7.4.3 LA4 Epithelzellen werden durch geringste Mengen IL-4 beeinflusst

Da die Wirkung der IL-4 Behandlung auf die AECII im pg- und ng-Bereich nahezu identisch war, bestimmte ich die Mindestmenge an IL-4, die für die Abschwächung der inhibitorischen Wirkung von alveolaren Epithelzellen benötigt wird. Hierfür wurden die LA4 Zellen vor der Ko-Kultur mit steigenden Mengen von IL-4 behandelt. Da man in Vorexperimenten sehen konnte, dass 10 pg IL-4 noch einen starken Effekt auf die Wirkung von LA4 Zellen hatten (Abbildung 20), titrierte ich die kritische IL-4 Menge ausgehend von 10 pg auf noch geringere Mengen herunter. Dargestellt ist unten (Abbildung 21) ein repräsentatives Experiment in dem Mengen von 10 pg bis 1 fg untersucht wurden. Hier sah man, dass 10 pg IL-4 noch eine Proliferation von 30,6 % zuließen (Abbildung 21, 8. Balken), während LA4 Zellen ohne IL-4 die T-Zellproliferation auf 14,7 % reduzierten (Abb. 21, 3. Balken). Im Bereich von 1 fg bis 1 pg IL-4 (4.-7. Balken) lag der Anteil an proliferierten Zellen nur bei 18,8 bis 22,6 % ($P=0,3$) und unterschied sich damit nicht signifikant von der Proliferationsrate der TC, die durch unbehandelten LA4 Zellen beeinflusst wurden mit einer Proliferationsrate von 14,7 % (Abbildung 21, 3. Balken). Aufgrund dieser Beobachtung schloss ich, dass 10 pg IL-4 ($P=0,2$) die

kritische Menge IL-4 darstellen, die notwendig ist, damit die suppressive Wirkung der LA4 Zellen reduziert wird.

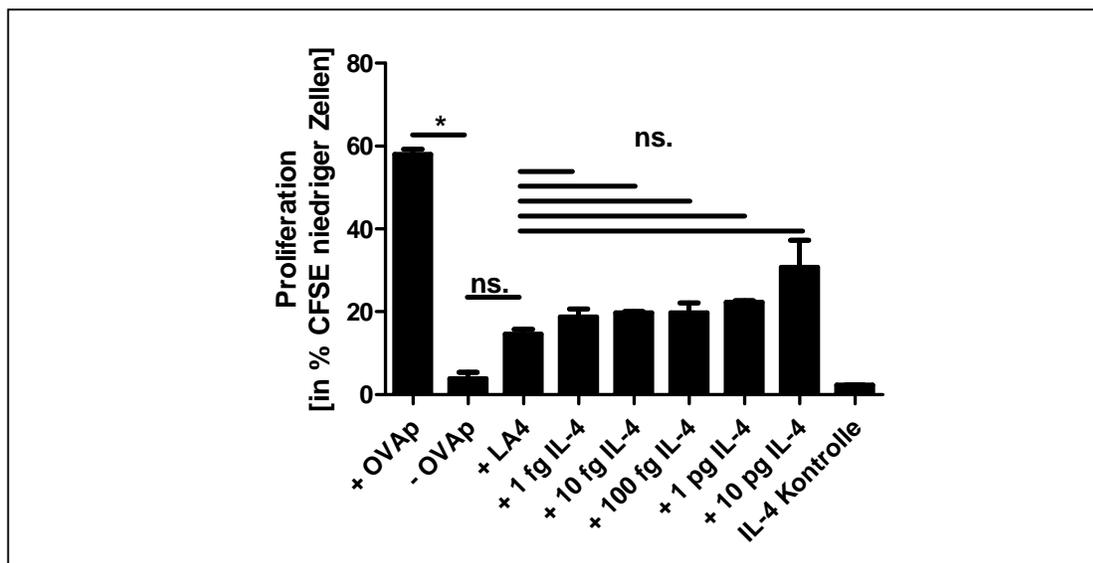


Abbildung 21: Dosisabhängigkeit der Effekte von IL-4 auf die LA4-abhängige Inhibition der T-Zellproliferation.

Proliferation einer Ko-Kultur von TC, DC und LA4 Zellen, die mit 1 fg bis 10 pg IL-4 behandelt wurden, oder unbehandelt blieben. In den Kulturen wurden die OVA-spezifischen CD4⁺ Zellen auf den intrazellulären CFSE-Gehalt hin untersucht. (Repräsentatives Experiment, in dem die Ansätze in Doppelbestimmung gemessen wurden, n=2. ungepaarter t Test mit Welch Korrektur, * entspricht Signifikanzniveau P<0,05 und ns. =nicht signifikant)

7.4.4 IL-4 verändert die Expression von kostimulatorischen Proteinen auf der Oberfläche von LA4 Epithelzellen

Aufgrund der Beobachtung, dass der inhibitorische Effekt von AECII auf die T-Zellaktivierung kontaktabhängig ist (siehe Abschnitt 4.3.2), untersuchte ich die Veränderungen in der epithelialen Expression von Oberflächenproteinen aufgrund der IL-4 Behandlung der LA4 Zellen. Ich untersuchte Oberflächenmoleküle, von denen bekannt ist, dass ihre Expression immunmodulatorische Effekte hat. Es wurden sowohl kostimulatorische Moleküle, wie CD80 und PD-Ligand untersucht, wie die Expression des MHCII Komplex und die Expression von Mitgliedern der TNF Rezeptorfamilie GITR-L und 4-1BB. Diese Moleküle sind alle im Bezug auf Überleben, Aktivierung und Proliferation von T Zellen bekannt und stellten in meinen Untersuchungen potentielle Mediatoren für eine kontaktvermittelte Einflussnahme der AECII dar. Hierfür behandelte ich LA4 Zellen mit 10 pg IL-4 für 24 Stunden. Die isolierte mRNA der Zellen wurde auf die Expression verschiedener immunmodulatorischer Oberflächenproteine, die in anderen Arbeiten bereits mit allergischen Erkrankungen oder Entzündungsreaktionen in der Lunge assoziiert werden konnten hin untersucht. Ich beobachtete die Expression von 4-1BB-Ligand (Gramaglia et al., Eur.J.Immunol. 2000), einen Liganden von 4-1BB, der auf T Lymphozyten und Eosinophilen exprimiert wird und kostimulatorisch

auf TC wirkt, indem er deren Überleben und Differenzierung in Effektorzellen fördert (Hurtado et al., J.Immunol. 1995). Weiterhin untersuchte ich das kostimulatorische Molekül CD80 (Kim et al., Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 2005), ein Mitglied der B7 Familie und Ligand von CTLA-4 oder CD28, das wichtig für die Aktivierung und das Überleben von TC ist (Peach et al., J.Biol.Chem. 1995). Des Weiteren prüfte ich die Expression des Liganden, des sowohl an der Apoptose beteiligten und immunmodulatorisch wirkenden kostimulatorischen Moleküls PD-1 Programmed death 1 ligand (PD-L) (Blank and Mackensen, A., Cancer Immunol.Immunother. 2007), das über eine inhibitorische cytosolische ITIM-Sequenz verfügt und der Aktivierung und Proliferation von TC entgegen wirkt (Freeman et al., J.Exp.Med. 2000) Auch die Expression von GITR-L untersuchte ich aufgrund der Beteiligung von GITR an der Regulation der Aktivität von T_H2 Zellen beim allergischen Asthma (Motta et al., Respir.Res. 2009). Zusätzlich zu den kostimulatorischen Molekülen waren, basierend auf den Beobachtungen von Gereke et al., die Wirkung von IL-4 auf die Expression von MHCII, somit der Antigenpräsentation, in AECII interessant. (Gereke et al., Am.J.Respir.Crit Care Med. 2009). Das Experiment zeigte, dass die Behandlung der alveolaren Epithelzellen mit IL-4 zu einer 6-fach höheren Expression von GITR-L mRNA führte (Abbildung 22). Die Expression von PD-L, 4-1BB-L, CD80 und MHCII war hingegen nur geringfügig (≤ 2 -fach) erhöht.

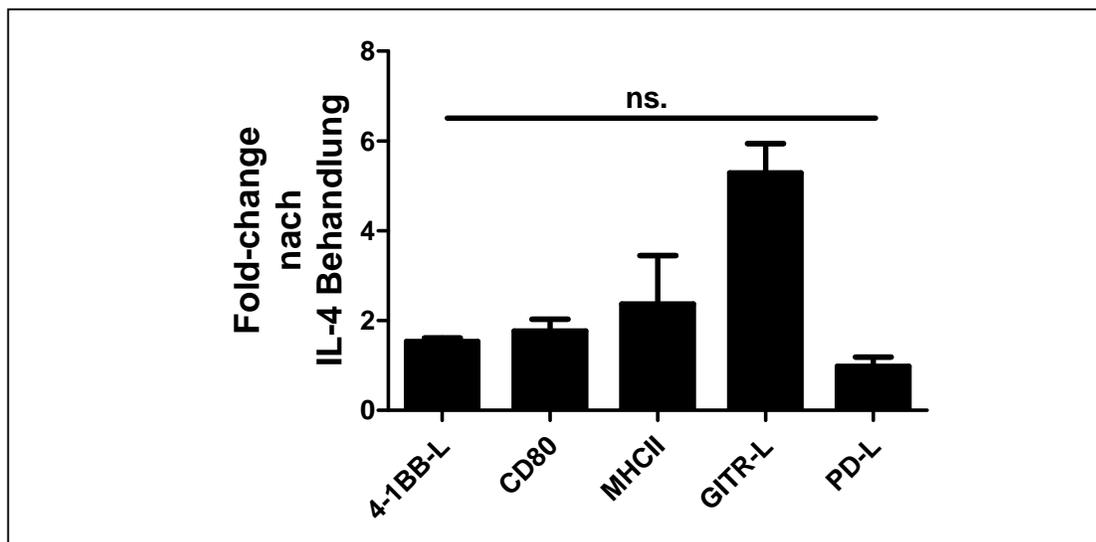


Abbildung 22: Expression von 4-1BB-L, CD80, MHCII, GITR-L und PD-L durch mit IL-4 behandelte LA4 Zellen

Mittels Sybr Green Realtime-PCR Analyse wurde die Expression von mRNA der Moleküle 4-1BB-L, CD80, MHCII, GITR-L und PD-L in LA4 Zellen, die 24 Stunden mit 10 pg/mL IL-4 behandelt wurden, relativ zu unbehandelten LA4 Zellen bestimmt (fold-change). Die Expression wurde in Dreifachansätzen von drei Versuchsansätzen bestimmt. (Ansätze bestimmt in Triplets). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (n=3, Mann-Whitney-U-Test, ns. =nicht signifikant).

Die Untersuchungen zeigten, dass IL-4 die inhibitorische Wirkung von AECII nicht durch eine veränderte Expression der vielbeschriebenen Moleküle MHCII oder CD80, sondern vielmehr die Expression eines kostimulatorischen Moleküls beeinflussen, dessen Funktion noch genauer untersucht werden muss – GITR-L.

8. Diskussion

In den letzten Jahren konnten maßgebliche Erkenntnisse über die Vorgänge während der allergischen Sensibilisierung gewonnen werden. Besonders hervorzuheben sind hierbei die Entdeckungen, die zu den PRRs (Janeway, Jr., Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol. 1989; Janeway, Jr. and Medzhitov, R., Annu.Rev.Immunol. 2002), wie zum Beispiel den TLR gemacht wurden (Coutinho and Poltorack, A., Curr.Opin.Immunol. 2003). Seit 1998 ist es bekannt, dass das TLR4 Protein in Mäusen der Rezeptor für LPS ist (Poltorak et al., Blood Cells Mol.Dis. 1998) und eine Mutation in diesem Locus zu einer fehlerhaften Immunantwort gegenüber Gram-negativen Bakterien führt (Poltorak et al., Science 1998). So konnten zwei Arbeitsgruppen 2002 in murinen Asthmamodellen zeigen, dass der Kontakt mit LPS bei der inhalativen Sensibilisierung notwendig ist, um die sonst bestehende Toleranz der Atemwege gegenüber inhalierten Proteinen zu durchbrechen und zu einer allergischen Atemwegsentzündung zu führen. Dabei trifft dies sowohl für T_H1 , wie auch T_H2 gerichteten Atemwegsentzündungen zu. (Dabbagh et al., J.Immunol. 2002; Eisenbarth et al., J.Exp.Med. 2002). Weitere Arbeiten bestätigten diese Befunde (Kim et al., Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 2005) und erweiterten die Hypothese, dass die Sensibilisierung über die Atemwege abhängig von PAMPs ist, da sie demonstrierten, dass auch andere TLR-Liganden die allergische Sensibilisierung induzieren können (Jeon et al., J.Allergy Clin.Immunol. 2007; Redecke et al., J.Immunol. 2004). Signale via PAMPs stellen anscheinend einen essenziellen Schritt dar, der dazu führt, dass das „inhibitorische“, tolerogene Milieu der Lunge im steady state in ein „pro-inflammatorisches“ Milieu überführt wird.

Dittrich et. al. konnten dann 2008 zeigen, dass die Abhängigkeit der pulmonalen Sensibilisierung von PAMPs durch Zugabe von IL-4 umgangen werden kann. Weiterführende Studien in chimären Mäusen, bei denen die α -Untereinheit des IL-4 Rezeptors auf strukturellen oder hämatopoetischen Zellen fehlt, zeigten, dass IL-4 bei der Sensibilisierung sowohl im hämatopoetischen Kompartiment, wie auch von strukturellen Zellen erkannt werden muss (Dittrich et al., J.Immunol. 2008). Allerdings blieb in dieser Untersuchung unklar, welche strukturellen Zelltypen auf das IL-4 reagieren können müssen, um den asthmatischen Phänotyp auszubilden.

Ziel dieser Arbeit ist es daher Epithelzellen als mögliche strukturelle Zielzellen des IL-4 zu identifizieren und die Effekte des IL-4 auf diese Epithelzellen genauer zu charakterisieren. Zu diesem Zweck untersuchte ich die Effekte von IL-4 auf pulmonale Alveolarepithelzellen in einem in vivo Modell der „IL-4 abhängigen pulmonalen Sensibilisierung“, wie auch in einem in vitro Zellkulturmodell. Verschiedene Studien konnten bereits eine immunmodulatorische Funktion der Epithelzellen bei allergischen Atemwegsentzündungen darstellen. So können bronchiale Epithelzellen die Immunreaktion in den Atemwegen durch die Sekretion von Mediatoren, wie TSLP und IL-33 (Hammad and Lambrecht, B. N., Allergy 2011) und die Expression von kostimulatorischen

Oberflächenmolekülen, wie den Mitgliedern der B7 Familie Inducible T-cell co-stimulator ligand (ICOS-L), PD-L und Programmed death 1 ligand 2 (PD-L2) (Kim et al., Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 2005) modulieren und damit entscheidend an der Etablierung und Chronifizierung einer T_H2-gerichteten Atemwegsentzündung mitwirken. Man kann daher postulieren, dass Epithelzellen eine Zielpopulation des IL-4 im strukturellen Kompartiment sind, die aufgrund ihrer Lokalisation eine zentrale Rolle beim ersten Kontakt zwischen einem Organismus und den Antigenen aus seiner Umwelt einnehmen.

Wie bereits in Abschnitt 5.6 erwähnt sind für die Epithelien der Atemwege verschiedenste immunmodulatorische Wirkmechanismen während der Effektorphase beschrieben. Welche Funktion Epithelzellen der Bronchien oder der Alveolen in den unteren Kompartimenten der Atemwege einnehmen ist bisher nur ungenügend untersucht.

Über die Atemluft werden Allergene bis in die unteren Atemwege aufgenommen. Wenn man die räumliche Zugänglichkeit berücksichtigt ist eine Interaktion zwischen bronchialem Epithel und den immunologischen Zellen während des Sensibilisierungsprozess wahrscheinlich. Gleichzeitig konnte eine Expression von immunmodulatorischen, kostimulatorischen Molekülen konnte auch in den parenchymalen Teilen der Lunge gezeigt werden (Stanciu et al., J.Infect.Dis. 2006). Verschiedene Interaktionen mit den Zellen des Immunsystems konnten für AEC II in unterschiedlichen Modellen der Atemwegsentzündung gezeigt werden (Dittrich et al., Clin.Exp.Allergy 2010; Gereke et al., Am.J.Respir.Crit Care Med. 2009; Zhao et al., Respir.Med. 2010). So beeinflussen AECII die Proliferation von T Lymphozyten (Paine, III et al., Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 1991) und können Chemokine wie RANTES und GM-CSF freisetzen, die an der Rekrutierung und dem Wachstum von Makrophagen beteiligt sind (Christensen et al., Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 1995; O'Brien et al., J.Lab Clin.Med. 1998). Die Rolle von AECII in der Sensibilisierungsphase ist bisher nicht untersucht worden, so dass ich untersuchen wollte, ob diese Zellen mögliche Interaktionspartner von IL-4 sind.

8.1 TLR-unabhängiges Sensibilisierungsmodell

In der vorliegenden Arbeit konnte ich in einem murinen Sensibilisierungsmodell zeigen, dass die Gegenwart von IL-4 während der Sensibilisierungsphase zu einer eosinophilenreichen Entzündung der Atemwege führte, die unabhängig von Signalen über den TLR4 Signalweg vermittelt wurde. Durch Sensibilisierung mit Antigen und IL-4 im Vergleich zu Antigen alleine kam es zu einer starken Steigerung der mRNA Expression von MCP-1, Eotaxin-2, GM-CSF, TARC, IL-33 und CXCL1 in den Lungen der Tiere nach der Provokationsphase. Diese Moleküle sind zentrale Mediatoren für die Rekrutierung, Aktivierung und Polarisierung verschiedenster Entzündungszellen, die zentral für die

Induktion und Chronifizierung einer allergischen Atemwegsentzündung sind. So vermittelt das Chemokin MCP-1 die Rekrutierung von Monozyten, DCs und Gedächtnis TC an Entzündungsstellen im Gewebe (Carr et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1994). Eotaxin-2 ist der Ligand des C-C Chemokinrezeptors 3 (CCR3) und ist das Hauptzytokin für die Rekrutierung von Eosinophilen (White et al., J.Leukoc.Biol. 1997) GM-CSF ist ein Glykoprotein, dass mit dem Überleben von Eosinophilen in der BALF von Asthmatikern assoziiert ist (Park et al., Eur.Respir.J. 1998), die Cytotoxizität und Adhäsion von Eosinophilen steigert (Nagata et al., J.Immunol. 1995) und das Überleben von Monozyten und deren Differenzierung zu Makrophagen fördert (Young et al., J.Immunol. 1990). TARC ist ein Ligand des CCR4 Rezeptors (Imai et al., J.Biol.Chem. 1997), der durch T_H2 Zytokine, wie IL-4 und IL-13 reguliert wird (Greaves et al., Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. 2001) und an der Rekrutierung von T Lymphozyten beteiligt ist (Lieberman and Forster, I., Eur.J.Immunol. 1999). Während IL-33, als Mitglied der IL-1 Familie in T-Helferzellen, Mastzellen, Eosinophile und Basophilen die Produktion von T_H2 Zytokinen induziert (Schmitz et al., Immunity. 2005), ist CXCL1 ein Chemokin, das von Makrophagen und bronchialen Epithelzellen produziert wird (Becker et al., Am.J.Physiol 1994) und chemotaktisch auf Neutrophile wirkt (Moser et al., J.Exp.Med. 1990). Zusammengefasst wurden durch die Sensibilisierung mit Antigen und IL-4 zahlreiche Mediatoren induziert, die dazu führten, dass es nach der Provokation mit dem Antigen alleine zu einer klassischen T_H2-polarisierten Atemwegsentzündung und zur Produktion von antigenspezifischem IgE kam, zwei zentralen Merkmalen des Asthma bronchiale.

Neben diesem bereits bekannten Phänotyp der „IL-4 abhängigen Sensibilisierung“ (Dittrich et al., J.Immunol. 2008), zeigte ich durch detaillierte Untersuchungen der Sensibilisierungsphase, dass die Bedingungen für eine eosinophilenreiche Entzündung bereits früh während der Sensibilisierung gelegt werden. Anhand der Auswertung der Bronchoalveolaren Flüssigkeit und der mRNA Expression in der Lunge der Tiere konnte man sehen, dass bereits der zweite Kontakt mit dem Antigen und IL-4 die Expression von Eotaxin-2 in der Lunge induziert und in der Sensibilisierungsphase einen Influx von Eosinophilen nach sich zieht, der durch das Antigen ohne IL-4 nicht ausgelöst wurde. Durch die ex vivo Analyse von AECII aus diesem Modell, die in der Sensibilisierungsphase entnommen wurden, konnten 76 Gene identifiziert werden, die durch die Sensibilisierung in Gegenwart von IL-4 differenziell reguliert waren im Vergleich zur Sensibilisierung ohne IL-4. Durch datenbankgestützte Datenanalyse war es möglich 30 Gene zu identifizieren, die aufgrund ihrer Funktion und Expression eine zentrale Rolle bei einer IL-4 abhängigen, epithelzellvermittelten Erleichterung der allergischen Sensibilisierung spielen könnten.

Die Sensibilisierung in Gegenwart von IL-4 führte auf mRNA Ebene zur Heraufregulation der Expression von Genen wie Cxcl2, Cxcl3, Cxcl5, Chi3l3, Pigr, oder Fcgr2a, Slc26a4 und CD83 im Vergleich zur Sensibilisierung mit Antigen alleine. Diese Gene sind in der Literatur bereits im Zusammenhang mit Entzündungen der Atemwege beschrieben. Ihre Induktion bestätigte, dass unser

Modell der IL-4 abhängigen Atemwegsentzündung deutliche Gemeinsamkeiten mit anderen Modellen T_H2 -polarisierter allergischer Entzündungen in den Atemwegen aufweist, die durch eine eosinophilen-dominierte pulmonale Entzündung, die Bildung von antigenspezifischem IgE, Bildung von Mukus und Atemwegshyperreaktivität gekennzeichnet sind (Taube et al., *Int.Arch.Allergy Immunol.* 2004). So konnten Nakao et al. zeigen, dass das Transmembran-Transportprotein Slc26a4, das wir in unseren Arrayanalysen ebenfalls hochreguliert fanden, an der Mukusproduktion bei allergischem Asthma und COPD beteiligt ist (Nakao et al., *J.Immunol.* 2008). Auch die in unserem Modell hochregulierte Arginase Chi313/YM1 passt in das Bild einer T_H2 -polarisierten Entzündung, da sie auf der Oberfläche von alternativ aktivierten Makrophagen nachgewiesen werden konnte (Raes et al., *J.Leukoc.Biol.* 2002) und bei allergischen Entzündungen der Atemwege die Sekretion von T_H2 -Zytokinen induziert (Cai et al., *J.Immunol.* 2009). YM1 scheint aber auch an chronischen Entzündungen in der Lunge beteiligt zu sein, da YM1 mRNA in DC in den Atemwegen von Versuchstieren in einem chronischen Allergiemodell nachgewiesen werden konnte (van Rijt et al., *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2011).

Grundlagen für die Rekrutierung von Neutrophilen und Eosinophilen, wie man sie in dem hier gezeigten Modell beobachtete, kann die Hochregulation von CXCL2, -3 (Ahuja and Murphy, P. M., *J.Biol.Chem.* 1996) und -5 (Qiu et al., *Thorax* 2007) darstellen, die in den Arrayanalysen ebenfalls hochreguliert waren.

Die Sensibilisierung in Gegenwart von IL-4 induzierte zudem den low Affinity Rezeptor für IgE Fc ϵ 2a. Dieses Molekül wird einerseits als supprimierend auf pulmonale Entzündungen und die AHR beschrieben (Cernadas et al., *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1999). Aktuelle Publikationen zeigen, dass humane epitheliale Primärzellen der Atemwege Fc ϵ 2a/CD23 in den Bronchien, wie in den Alveolen konstitutiv exprimieren und die Stimulation mit IL-4 zu einer starken Induktion dieses Rezeptors führt (Palaniyandi et al., *J.Immunol.* 2011). Diese Beobachtungen passen sich gut in das beschriebene Modell der „IL-4 abhängigen pulmonalen Sensibilisierung“ ein. Palaniyandi et al. zeigte auch, dass CD23 ein Schlüsselement bei der Transzytose von IgE durch die epitheliale Barriere darstellt.

Diese 8 identifizierten und mittels semiquantitativer PCR unabhängig verifizierten Gene zeigten, dass die Sensibilisierung mit IL-4 entzündliche T_H2 -polarisierende Prozesse in der Lunge einleitet. Es fanden sich 16 weitere differenziell regulierte Gene, die bisher allerdings nicht genauer im Zusammenhang mit allergischen Immunantworten in den Atemwegen beschrieben wurden. Diese von mir identifizierten und mit RealTime-PCR bestätigten Gene waren FXYD4, IL4i1, Clec4a2, Slc6a20a, Clec4a3, Ccr11, Lemd1, Pglyrp1, Fetub, Fatty acid binding protein 1 (Fabp1), Noxo1, Ccl9, Malt1, Nfkbie, CD52 und Tnfrsf9/4-1BB.

Die bisher bekannten Funktionen dieser Gene sind sehr heterogen, wobei zum Teil auch bisher sehr wenig funktionelle Effekte bekannt sind. Auch die Expression im Lungenepithel war für einige dieser Gene (FXVD4, IL4i1, Clec4a2, Slc6a20a, Clec4a3, Lemd1 und Fetub) bisher nicht beschrieben.

So wird das durch Aldosteron induzierbare Transmembranprotein FXVD4/Chif in renalen Epithelzellen exprimiert und ist beteiligt an der Regulation des Ionentransports in diesen Zellen (Goldschmidt et al., *Cell Physiol Biochem*. 2004). Die Expression und Funktion von Chif in der Lunge konnte bisher noch nicht gezeigt werden, dort könnte es möglicherweise eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Barriere oder der Regulation der Mukussekretion spielen, wie dies bereits für verschiedene Ionenkanäle in der Lunge gezeigt werden konnte (Valverde et al., *J.Biol.Chem.* 2011). Zwei der bisher nicht in der Lunge identifizierten Gene, Lemd1 und Fetub und dem Gen Pglyrp1 wird eine Rolle bei der Organdifferenzierung bzw. –entdifferenzierung zugeschrieben. Während Slc6a20a bisher nur im Kontext des Betain/Prolin Proteintransports in der Embryonalentwicklung beschrieben wird (Anas et al., *Development* 2008), sind Lemd1 und Fetuin B im Zusammenhang mit Tumorentwicklung beschrieben. Lemd1 wurde bisher in Testis nachgewiesen und ist dort beteiligt an der Entwicklung von Prostatakrebs (Ghafouri-Fard et al., *Arch.Med.Res.* 2010). Fetuin β ist beteiligt an der Tumorangiogenese und konnte in Carcinomen der Haut und des Pankreas nachgewiesen werden (Hsu et al., *Genome* 2004). Hier konnte auch gezeigt werden, dass Fetub einen suppressiven Effekt auf die Carcinogenese hat. Zudem weist es einen pro-angiogenetischen Effekt auf, der möglicherweise den Zusammenhang zur Inflammation beim Asthma darstellt, der bisher für diese Gene nicht beschrieben wurde. Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass angio- und lymphangiogenetische Prozesse zentrale Faktoren bei der Entwicklung und Chronifizierung des Asthma bronchiale darstellen und die Angiogenese daher ein neues Ziel für pharmakologische Interventionen zur Behandlung des Asthma bronchiale sein könnte (zusammengefasst in Detoraki Allergy 2010). Während für diese vier Gene der Zusammenhang mit Asthma bronchiale oder auch entzündlichen Prozessen insgesamt nicht direkt offensichtlich erscheint, fanden wir auch Gene, die bereits mit inflammatorischen Prozessen assoziiert wurden, wie Pglyrp1, Fabp1, Ccr11, Clec4a2, Clec4a3 und IL4i1. Bis auf Ccr11 werden diese Gene alle in hämatopoetischen Zellen des Immunsystems exprimiert. Ccr11 findet sich nur auf Stromazellen und gehört zu den chemokinrezeptor-ähnlichen Membranproteinen. Da es über keine intrazelluläre Signaltransduktionsuntereinheit verfügt wird es auch als „stiller“ Chemokinrezeptor bezeichnet und ist an der Homöostase von Leukozyten und der steten Rekrutierung von DC in die Lymphknoten beteiligt (Heinzel et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2007). Diese Prozesse finden fraglos in unserem Modell statt, die funktionelle Konsequenz der Hochregulation des Moleküls ist allerdings bisher nicht untersucht worden.

Eine klare Assoziation mit Immunreaktionen konnte auch für Peptidoglykan Erkennungsprotein Pglyrp1 gefunden werden, da eine Beteiligung an der Abwehr des gram-positiven Bakteriums *Listeria*

monocytogenes durch die Induktion der IFN- γ und TNF- α Produktion gezeigt werden konnte (Osana et al., *Infect.Immun.* 2011) Ob die Induktion dieser Zytokine auch durch die Induktion dieses Gens in unserem Modell stattfindet, werden funktionelle Untersuchungen klären müssen.

Bezüglich der C-Typ-Lectine Clec4a2 und Clec4a3 ist bisher bekannt, dass sie über eine inhibitorische Proteindomäne verfügen, von DC exprimiert werden und an der Homöostase des Immunsystems beteiligt sind (Fujikado et al., *Nat.Med.* 2008), so dass eine funktionelle Relevanz bei der Entwicklung des Asthma bronchiale oder einer T_H2-polarisierten Atemwegsentzündung für diese Gene nahe liegt. Eine Expression im Lungenepithel war für Clec4a2 bisher nicht beschrieben und funktionelle Effekte der Expression dieser Lectine im Lungenepithel wurden in der Literatur bisher nicht adressiert.

IL4i1 ist auch als LAAO bekannt. Abgesehen von der durch IL-4 induzierbaren Expression in den Lysozymen von B Zellen (Mason et al., *J.Immunol.* 2004), sind bisher keine funktionellen Aspekte von LAAO bekannt. Bei Fabp1 weist einerseits die Expression auf alveolaren Makrophagen und die Funktion als Peroxisomen proliferator-activated receptor (PPAR) auf eine Beteiligung an inflammatorischen Vorgängen in der Lunge hin (Schachtrup et al., *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 2004), gleichzeitig wird in dieser Arbeit aber auch die Rolle von Fabp1 im Cholesterometabolismus in Adipocyten verwiesen. Daher müssen zum besseren Verständnis der Funktion dieses Gens im Lungenepithel bei der allergischen Atemwegsentzündung auch weitere funktionelle Untersuchungen folgen.

Deutliche Bezüge zu Entzündungen der Atemwege ergaben sich nach Durchsicht der Literatur für die sechs Gene Nox1, Ccl9, Malt1, Nfkbie, CD52 und 4-1BB. Für diese Gene existieren Untersuchungen zur Expression und/oder Funktion bei Entzündungen der Atemwege, in Epithelzellen oder Lunge, oder bei der Entwicklung einer AHR. So ist epithelial exprimiertes Nox1 an der Beseitigung von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt (Kiss et al., *Curr.Biol.* 2006), die in den Atemgasen von Asthmatikern verstärkt nachgewiesen werden konnten (Ganas et al., *Respir.Med.* 2001; Kharitonov et al., *Chest* 1995). Ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der Regulation von Nox1 und Asthma bronchiale konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden.

Ähnlich verhält es sich bei dem Oberflächenmolekül CD52, einem Mitglied der B7-Familie, das auf vielen Lymphozyten exprimiert wird und daher auch als Zielmolekül in der Lymphomtherapie genutzt wird (Ermini et al., *Dev.Growth Differ.* 2008). Bisher wurde CD52 nur im Kontext von akuten (Ermini et al., *Dev.Growth Differ.* 2008) und chronisch-fibrosierenden Abstoßungsreaktionen beschrieben (Reams et al., *Am.J.Transplant.* 2007). Im Zusammenhang mit allergischen Erkrankungen der Atemwege ist es jedoch bisher nicht bekannt. Funktionelle Untersuchungen wären insbesondere aufgrund der beschriebenen Beteiligung an fibrotischen Reaktionen von Interesse, um zu untersuchen, ob in unserem Modell möglicherweise frühzeitig Gene induziert werden, die langfristig zu

chronischen Umbauprozessen der Lungen im Sinne eines „Remodelling“ führen. Wir konnten auch eine Induktion des mit allergischen Erkrankungen assoziierten NF- κ B Signaltransduktionswegs beobachten. Die beiden regulierten Moleküle Malt1 und Nfkbie wurden allerdings bisher noch nicht im Kontext von allergischen Erkrankungen beschrieben. Malt1 ist ein Protein, das zusammen mit B-cell leukemia/lymphoma 10 (Bcl-10) an der Aktivierung von NF- κ B beteiligt ist (Ruefli-Brasse et al., Science 2003). Weiterhin spielt es eine Rolle bei einer TLR-unabhängigen Aktivierung von Makrophagen und DC (Werninghaus et al., J.Exp.Med. 2009). Auch Nfkbie beeinflusst die Differenzierung von B-Zellen durch Aktivierung von NF- κ B (Doerre et al., J.Immunol. 2005). Die beiden hochregulierten Gene NF- κ Bie und Malt1 könnten in unserem Modell entscheidende Schritte für die Differenzierung der B Zellen zu IgE-produzierenden Plasmazellen spielen. Das Chemokin Ccl9, das zu den Macrophage inflammatory proteins gezählt wird, ist bisher vorrangig im Kontext von Knochenresorption beschrieben worden (Okamatsu et al., J.Immunol. 2004), so dass für dieses Gen funktionelle Untersuchungen in Modellen der allergischen Atemwegsentzündung klären müssen, welche Rolle es bei der allergischen Sensibilisierung spielt.

4-1BB und sein Ligand 4-1BB-L, sind Mitglieder der Familie von TNF Rezeptoren (Schwarz et al., Gene 1993) und Tumor Necrosis Factors (Goodwin et al., Eur.J.Immunol. 1993). Ihre Expression wird bei der Aktivierung von TC und APC induziert und aufrecht erhalten (Vinay and Kwon, B. S., Semin.Immunol. 1998). Während 4-1BB von Splenozyten und von CD4⁺- und CD8⁺ TC exprimiert wird (Pollok et al., J.Immunol. 1993), findet sich 4-1BB-L auf APC, wie B-Zellen, Makrophagen und DCs, aber auch Eosinophilen (Heinisch et al., J.Allergy Clin.Immunol. 2001; Pollok et al., Eur.J.Immunol. 1994). Hinsichtlich der Induktion von 4-1BB-L konnten Cannons et. al. zeigen, dass 4-1BB-L das Überleben von CD4⁺-TC ermöglicht, Zellteilung induziert und die Effektorfunktion dieser Zellen verstärkt (Cannons et al., J.Immunol. 2001), so dass auch die Induktion dieses Oberflächenmoleküls, an der Vermittlung der hier identifizierten Effekte des IL-4 beteiligt sein könnte. Allerdings wird die kostimulatorische Funktion von 4-1BB kontrovers diskutiert, da einige Untersuchungen auch einen tolerogenen Effekt der von 4-1BB vermittelten Signaltransduktion zeigen konnten (Gramaglia 2000, Hurtado 1995, Cho 2006). Eine Studie in einem murinen Asthmodell wies darauf hin, dass die Behandlung mit einem antagonisierenden Antikörper gegen 4-1BB, zu einer Minderung von AHR, eosinophiler Inflammation in der Lunge und antigenspezifischen IgE führte (Polte et al., J.Clin.Invest 2006). Die Expression von 4-1BB-L auf Pneumozyten ist bisher nicht beschrieben. Um die Funktion von 4-1BB-L auf Alveolarepithelzellen genauer zu untersuchen, wäre eine epithelspezifische knock-out Mutante oder Überexpression hilfreich, die aber bisher nicht veröffentlicht ist.

Die vorgestellten Gene stellen aufgrund ihrer verschiedenen Funktionen interessante Zielgene für anzuschließende funktionelle Untersuchungen dar, um ihre Rolle bei der allergischen Atemwegsentzündung genauer zu charakterisieren. Wenn sich eine funktionelle Relevanz dieser

Moleküle bei einer epithelspezifischen Expression in der Lunge für die Entwicklung einer allergischen Atemwegsentzündung bestätigen lässt, können solche „hypothesenfreien“ Screeningansätze via Microarray dazu beitragen, Moleküle für neue interventionelle Strategien zu entwickeln, die ohne solche Ansätze nicht identifiziert werden würden (Dittrich et al., Exp.Toxicol.Pathol. 2006). In den weiterführenden Untersuchungen wird daher die IL-4 abhängige Expression dieser Moleküle in AECII Zellen auch auf Proteinebene, überprüft, um nachfolgend die Funktion in dem etablierten in vitro System oder durch in vivo Studien zu überprüfen. Diese Vorgehensweise könnte erste Zielgene für pharmakologische Interventionen auf Epithelzellenebene identifizieren, einer Zellpopulation, die bisher in der Asthmatherapie nicht spezifisch angesprochen wird.

8.2 Ko-Kultur-System

Die Experimente in dem hier vorgestellten in vitro Ko-Kultur-System zeigten, dass die T-Zellaktivierung durch die murine Alveolarepithelzelllinie LA4 stark inhibiert wird (Abbildung 12 c), wobei die Behandlung von AECII mit IL-4 diesen Effekt stark vermindert (Abbildung 20). IL-4 nimmt eine zentrale Rolle bei allergischen Erkrankungen der Atemwege ein und in einem Modell einer pulmonalen IL-4 abhängigen Sensibilisierung konnte bereits gezeigt werden, dass dieses Zytokin eine Entzündung der Atemwege nur vermitteln kann, wenn es sowohl von hämatopoetischen, wie auch von strukturellen Zellen wahrgenommen werden kann (Dittrich et al., J.Immunol. 2008) . Meine Untersuchungen im in vitro Ko-Kultursystem zeigen einerseits, dass LA4 Epithelzellen, die AECII sehr ähnlich sind, eine suppressive Wirkung auf die T Zellaktivierung haben. Zudem konnte ich in diesen Versuchen zeigen, dass IL-4 diese inhibitorische Wirkung der AECII abschwächt. Die Alveolarepithelzell-ähnlichen LA4 Zellen hielten die T Zellen in einem Zustand, der mit dem Phänotyp von naiven T Zellen vergleichbar ist (Abbildung 16 und 17). Meine Beobachtungen eines suppressiven Effekts der AECII auf die T Zellaktivierung und die Wirkung des T_H2-Zytokin IL-4 in diesem Zusammenhang könnten eine Erklärung dafür liefern, das bereits sensibilisierte Patienten ein erhöhtes Risiko für weitere Sensibilisierungen aufweisen, da bereits gezeigt werden konnte, dass in Patienten mit einer T_H2-gerichteten Atemwegsentzündung erhöhte Mengen an IL-4 in der Lunge nachweisbar sind (Lommatzsch et al., J.Allergy Clin.Immunol. 2006). Vorausgesetzt, die Vorgänge in diesen Individuen unterliegen den gleichen Mechanismen, die ich in dieser Arbeit beschrieben habe, könnten sich erleichterte Folgesensibilisierungen durch eine vermehrten T Zellaktivierung infolge der erhöhten pulmonalen IL-4 Konzentration erklären.

In früheren Arbeiten konnten bereits inhibierende Effekte von AECII bzw. AECII-ähnlicher Zelllinien auf die T Zellaktivierung beschrieben werden (Gereke et al., Am.J.Respir.Crit Care Med. 2009; Wang et al., Thorax 2009). Jedoch zeigte sich in meiner Arbeit, dass ich nicht alle Beobachtungen von Gereke et al. und Wang et al. bestätigen konnte, so konnte ich die reduzierte Aktivierung und Proliferation der T Zellen durch den Einfluss von AECII nicht auf die Induktion von FoxP3⁺ T_{Reg} zurückzuführen, da weder in Kulturen mit DC oder T Zell-depletierten APC ein signifikanter Anstieg an CD4⁺ FoxP3⁺ Zellen gemessen werden konnte (Abbildung 18), was in beiden zitierten Arbeiten ein zentrales Ergebniss darstellte. Eine mögliche Erklärung der Unterschiede dieser beiden Arbeiten mit den hier aufgeführten Ergebnissen, könnte sich in den Unterschieden der verwendeten Epithelzellen oder Versuchsdurchführung finden. So nutzten Gereke et al. für die Untersuchungen der FoxP3 Expression CD25-depletierte Suspensionen von CD4⁺ TC, die in einem Sortingschritt weiter aufgereinigt wurden. Zudem kultivierten sie die Zellen in AECII-konditioniertem Medium und regten die TC mithilfe eines löslichen CD3 Antikörper zur Proliferation an, so dass diese Arbeit den

mediator-vermittelten Einfluss der AECII untersucht. Obwohl ich in der vorliegenden Arbeit die gleiche murine Epithelzelllinie wie in der Arbeit von Wang et al. verwendete, wurden unterschiedliche Ausgangspopulation an TC eingesetzt, da mein Anreicherungsprotokoll (siehe Methoden 6.2.3.1) für CD4⁺ TC von Wang et al. abweicht, die CD11c⁺ depletierte Splenozyten verwendet haben. Es ergaben sich auch Unterschiede in der Generierung der BMDC. So verwendeten Wang et al. BMDC in ihrer Kultur, die zuvor 10 bis 12 Tage kultiviert wurden. Da Kushwah et al. 2010 zeigen konnten, dass die Aufnahme von apoptotischen oder nekrotischen DC durch andere DC zur Entwicklung einer tolerogenen Reaktion und Induktion von T_{Reg} führt (Kushwah et al., Eur.J.Immunol. 2010), könnten die Unterschiede zwischen der Arbeit von Wang et al. und den hier beschriebenen Beobachtungen von ähnlichen Vorgängen herrühren. Abschließend muss ich auch darauf hinweisen, dass Unterschiede zwischen den Untersuchungen von Wang et al. und dieser Arbeit durch Veränderungen in der LA4 Epithelzelllinie möglich sind. Es ist bekannt, dass sich die Eigenschaften und der Phänotyp von immortalisierte Zelllinien mit zunehmender Passagierung verändern (Gazdar et al., Lung Cancer 2010).

In dieser Arbeit untersuchte ich zudem, welchen Einfluss der Gewebeansprung der DC auf die inhibitorische Wirkung der AECII im in vitro Ko-Kultur-System hat. Hierfür verglich ich Kulturen, in denen knochenmarksgenerierte DC das Antigen OVA präsentierten mit Kulturen, in denen CD4-depletierte Splenozyten OVA-Peptid präsentierten. 1992 wurde ein Kultur-System vorgestellt, mit dessen Hilfe man DC durch GM-CSF und IL-4 haltiges Medium aus Knochenmarkszellen zu DC differenzieren kann (Inaba et al., J.Exp.Med. 1992; Scheicher et al., J.Immunol.Methods 1992). Die Eigenschaften und Charakteristika der DC aus Blut, Lymphorganen, Milz oder als knochenmarksgenerierte APC sind jedoch teils unterschiedlich. Während in einem in vitro Ko-Kultur-System mit Kontaktallergenen gezeigt werden konnte, dass DC aus den Lymphknoten eine stärkere Proliferationsreaktion als DC aus dem peripheren Blut hervorrufen (Hill et al., Immunology 1994), zeigte sich, dass DC aus der Milz eine schwächere allogeneische Leukozytenreaktion hervorrufen als BMDC. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen diese Erkenntnisse. So zeigen die Untersuchungen der Proliferation, dass BMDC und APC aus der Milz ähnlich starke Effekte auf die Aktivierung der T Zellen haben (Abbildung 15). Der inhibitorische Effekt der AECII auf die T Zellaktivierung ist in Kulturen mit BMDC etwas stärker, als in Kulturen mit DC aus der Milz. Untersuchungen aus dem Jahre 1996 stützen diese Ergebnisse. Es zeigte sich, dass BMDC und DC aus der Milz in vitro Proliferation in allogeneischen T Zellen auslösen konnten und ähnlich hohe Mengen an kostimulatorischen Molekülen auf ihrer Oberfläche aufwiesen. Gleichzeitig zeigten die BMDC eine bessere Fähigkeit Antigen aufzunehmen, zu prozessieren und auf der Oberfläche zu präsentieren (Garrigan et al., Blood 1996).

Jedoch unterschieden sich die Ergebnisse meiner Arbeit nicht nur darin, dass die AECII keinen T_{Reg}-Phänotyp in der Kultur hervorrufen konnten. Während in der Arbeit von Wang et al. gezeigt

wurde, dass die suppressive Wirkung von LA4 Zellen auf die T Zellproliferation sowohl durch kontakt-vermittelte Mechanismen, wie auch über das in das Medium sezernierte Zytokin TGF- β vermittelt wird, war die inhibitorische Wirkung in der vorliegenden Arbeit fast vollständig kontaktabhängig. Unsere Ergebnisse sind in diesem Kontext vergleichbar mit den Untersuchungen von Cruickshank et al., die zeigen, dass Darmepithelzellen TC über zellkontaktabhängige Mechanismen in der G1 Phase halten (Cruickshank et al., Gut 2004). Wie bei Cruickshank et al. halten die verwendeten AECII die T Zellen in einem Zustand, der denen von naiven TC ähnelt. Meine Untersuchungen der T Zellaktivierung im Ko-Kultursystem zeigten, dass der Kontakt zu AECII die Aktivierung, charakterisiert durch die Expression der Oberflächenmoleküle CD69 und CD25, abschwächt. Es zeigten sich auch klare Unterschiede in der Differenzierung zu T Effektorzellen zwischen Kulturen mit und ohne LA4 Zellen. So zeigte die erhöhte Expression von CD44 auf der Oberfläche der TC, dass die Differenzierung zu Effektorzellen, die nur geringe Mengen dieses Moleküls tragen, nur unvollständig in Kulturen mit LA4 Zellen war. Neben den Untersuchungen der suppressiven Effekte von Alveolarepithelzell-ähnlichen LA4 Zellen auf die T Zellaktivierung, beschrieben sie den Einfluss einer Infektion mit Respiratory-Syncytial-Virus (RSV) auf Epithelzellen. Diese virale Erkrankung der Atemwege wird oft mit einer erhöhten Prävalenz von allergischen Erkrankungen der Atemwege, im speziellen Asthma bronchiale, in Verbindung gebracht (Sigurs et al., Am.J.Respir.Crit Care Med. 2005). Durch die Infektion mit RSV konnten Wang et al. vergleichbare Effekte auf die inhibitorische Wirkung der AECII ausüben, wie sie IL-4 im hier beschriebenen in vitro Ko-Kultursystem hatte. Wang et al. haben im Rahmen ihrer Arbeit keine Untersuchungen in dieser Richtung durchgeführt, jedoch sind RSV Infektionen mit einer vermehrten Ausschüttung von T_H2-Zytokinen assoziiert (Openshaw, Am.J.Respir.Crit Care Med. 1995). Zudem konnte gezeigt werden, dass RSV Infektionen der bronchialen Epithelien zu einer vermehrten Sekretion von T_H2-polarisierenden Chemokinen, wie TSLP führt (Qiao et al., Immunol.Cell Biol. 2011), während Infektionen der bronchialen und alveolaren Epithelzellen die Sekretion von Mediatoren, wie CCL5 beeinflussen (Culley et al., J.Virol. 2006). In vitro konnte gezeigt werden, dass die RSV-Infektion einer Alveolarepithelzell-ähnlichen Epithelzelllinie zu einer Induktion von CCL17 führt (Culley et al., J.Virol. 2006; Monick et al., J.Immunol. 2007; Qiao et al., Immunol.Cell Biol. 2011), so dass die Annahme naheliegend ist, dass der Ausstoß von proinflammatorischen Molekülen durch bronchiale und AECII bei der Etablierung einer Immunreaktion zur Abwehr von viralen Infektionen beteiligt ist. Die virale Infektion führt möglicherweise zur Ausschüttung von T_H2 Zytokinen, wodurch IL-4 die immunsuppressive Wirkung der Alveolarepithelzellen dann abschwächt. Diese Hypothese liefert eine mögliche Erklärung sowohl für meine Beobachtungen, wie auch für die Ergebnisse von Wang et al.

Darüber hinaus ist es möglich, dass RSV-Infektionen neben der Förderung der Sekretion von IL-4 in der Lunge zusätzlich über einen TGF- β -vermittelten Mechanismus zellkontakt-unabhängig auf die Epithelzellen wirken. IL-4 hingegen wirkt primär über direkten Zellkontakt mittels Oberflächenproteinen, wie z.B. GITR-L wirken. GITR-L ist ein kostimulatorisches

Oberflächenprotein, das zur Familie der Tumor Necrosis Factor Receptors (TNFR) gezählt wird, einer Gruppe an Molekülen, die in verschiedenen immunologischen Erkrankungen wirksam ist. Die Interaktion mit dem Liganden GITR fördert die Aktivierung und das Überleben von TC (So et al., *Int.J.Hematol.* 2006). Während die Expression von GITR-L erstmals auf DC beschrieben wurde (Kim et al., *Genes Immun.* 2003), konnte es inzwischen auch auf Epithelien in verschiedenen Teilen des Körpers nachgewiesen werden. So konnte gezeigt werden, dass auf retinalem Pigmentepithel exprimiertes GITR-L die immunsuppressive Wirkung von T Zellen durch eine Verminderung der TGF- β Sekretion vermindert und einer Steigerung der Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren in diesen Zellen auslöst (Mahesh et al., *Eur.J.Immunol.* 2006). Auch in einem in vitro Ko-Kultursystem, bei dem Keratinozyten zusammen mit T Zellen kultiviert wurden, führte die Interaktion von GITR-L mit GITR zu einer verstärkten T Zellproliferation und einer erhöhten Sekretion von T Zell-rekrutierenden Chemokinen (Byrne et al., *J.Invest Dermatol.* 2009). Diese Arbeiten unterstützen meine Hypothese, dass IL-4 durch die Induktion von GITR-L die immunsuppressive Wirkung von AECII verringert, was in weiterführenden Untersuchungen geprüft werden muss.

8.3 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit gibt neue, detailliertere Einblicke in die Sensibilisierungsphase von allergischen Erkrankungen. Es konnten insgesamt 18 Zielgene identifiziert werden, deren Wirkung auf die pulmonale Sensibilisierung bisher nicht beschrieben ist. Die Untersuchungen zu den Effekten von IL-4 auf AECII konnten in verschiedenen Modellsystemen Kandidatengene identifizieren, die den Wechsel von einem „inhibitorischen Phänotyp“ der AECII in der Lunge in einen „proinflammatorischen Phänotyp“ steuern könnten. Die Regulation der 18 im Microarray identifizierten Gene und des GITR-L, den wir in unserem in vitro System identifizierten, können Mechanismen sein, durch die IL-4 die natürlicherweise bestehende Toleranz der Lunge bei Kontakt mit harmlosen Proteinantigenen durchbricht und zur allergischen Sensibilisierung führt.

Die Ergebnisse zur inhibitorischen Wirkung von AECII auf die T-Zellaktivierung und die Wirkung von IL-4 in diesem Zusammenhang unterstreichen, dass die Interaktion von Epithel- und TC eine zentrale Rolle bei der allergischen Sensibilisierung spielt. Dieses bisher nur in Ansätzen verstandene Zusammenspiel stellt einen vielversprechenden Schnittpunkt zwischen angeborener und erworbener Immunität dar, dessen Modulation durch bisher zur Verfügung stehende Asthmatherapeutika bisher nicht möglich ist. Sollte die funktionelle Überprüfung der Kandidatengene in meinen Modellen tatsächlich bestätigen, dass ihre Modulation die T-Zellaktivierung beeinflussen kann, können Eingriffe in die Expression dieser Gene oder nachgeschalteter Signaltransduktionswege einen ersten vielversprechenden Ansatz zur Modulation der Interaktion von AECII und TC darstellen.

Schließlich können die nachfolgenden Experimente zur Funktion der identifizierten Kandidatengene zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze führen und damit zur Prävention von allergischen Erkrankungen der Atemwege beitragen. Bisher ist nicht ausreichend geklärt, wodurch die steigende Prävalenz der allergischen Erkrankungen erklärt werden kann. Daher sind neue Erkenntnisse zu den Grundlagen von Sensibilisierungsvorgängen zentral. Auf diesen Erkenntnissen aufbauend können Interventionsstrategien für die Sensibilisierungsphase entwickelt werden, um in Zukunft nicht nur die Effektorphase, sondern auch die Entstehung dieser Erkrankungen beeinflussen zu können.

9. Literaturangaben

1. Ahuja S.K. und Murphy P.M. (1996): The CXC chemokines growth-regulated oncogene (GRO) alpha, GRObeta, GROgamma, neutrophil-activating peptide-2, and epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 are potent agonists for the type B, but not the type A, human interleukin-8 receptor. *J.Biol.Chem.* **271**:20545-20550
2. Anas M.K., Lee M.B., Zhou C., Hammer M.A., Slow S., Karmouch J.et al. (2008): SIT1 is a betaine/proline transporter that is activated in mouse eggs after fertilization and functions until the 2-cell stage. *Development* **135**:4123-4130
3. Annacker O., Pimenta-Araujo R., Burlen-Defranoux O., Barbosa T.C., Cumano A., Bandeira A. (2001): CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J.Immunol.* **166**:3008-3018
4. Appleman L.J., Berezovskaya A., Grass I., Boussiotis V.A. (2000): CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression. *J.Immunol.* **164**:144-151
5. Arruda L.K., Sole D., Baena-Cagnani C.E., Naspitz C.K. (2005): Risk factors for asthma and atopy. *Curr.Opin.Allergy Clin.Immunol.* **5**:153-159
6. Babu S.K., Puddicombe S.M., Arshad H.H., Wilson S.J., Ward J., Gozzard N.et al. (2011): Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) autoregulates its expression and induces adhesion molecule expression in asthma. *Clin.Immunol.* **140**:18-25
7. Bals R. und Hiemstra P.S. (2004): Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur.Respir.J.* **23**:327-333
8. Becker S., Quay J., Koren H.S., Haskill J.S. (1994): Constitutive and stimulated MCP-1, GRO alpha, beta, and gamma expression in human airway epithelium and bronchoalveolar macrophages. *Am.J.Physiol* **266**:L278-L286
9. Blank C. und Mackensen A. (2007): Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol.Immunother.* **56**:739-745
10. Bloemen K., Verstraelen S., Van Den H.R., Witters H., Nelissen I., Schoeters G. (2007): The allergic cascade: review of the most important molecules in the asthmatic lung. *Immunol.Lett.* **113**:6-18
11. Bogefors J., Rydberg C., Uddman R., Fransson M., Mansson A., Benson M.et al. (2010): Nod1, Nod2 and Nalp3 receptors, new potential targets in treatment of allergic rhinitis? *Allergy* **65**:1222-1226

12. Breloer M. und Fleischer B. (2008): CD83 regulates lymphocyte maturation, activation and homeostasis. *Trends Immunol.* **29**:186-194

13. Brito R.C., da Silva G.A., Motta M.E., Brito M.C. (2009): The association of rhinoconjunctivitis and asthma symptoms in adolescents. *Rev.Port.Pneumol.* **15**:613-628

14. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) (2011): Nationale VersorgungsLeitlinie Asthma - Langfassung, 2. Auflage. Version 1.3, 2011. **2. Auflage**:

15. Busse W.W. und Lemanske R.F., Jr. (2001): Asthma. *N.Engl.J.Med.* **344**:350-362

16. Byrne A.M., Goleva E., Leung D.Y. (2009): Identification of glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein ligand on keratinocytes: ligation by GITR induces keratinocyte chemokine production and augments T-cell proliferation. *J.Invest Dermatol.* **129**:2784-2794

17. Cai Y., Kumar R.K., Zhou J., Foster P.S., Webb D.C. (2009): Ym1/2 promotes Th2 cytokine expression by inhibiting 12/15(S)-lipoxygenase: identification of a novel pathway for regulating allergic inflammation. *J.Immunol.* **182**:5393-5399

18. Cannons J.L., Lau P., Ghumman B., DeBenedette M.A., Yagita H., Okumura K.et al. (2001): 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. *J.Immunol.* **167**:1313-1324

19. Cao J., Ren G., Gong Y., Dong S., Yin Y., Zhang L. (2011): Bronchial epithelial cells release IL-6, CXCL1 and CXCL8 upon mast cell interaction. *Cytokine* **56**:823-831

20. Carr M.W., Roth S.J., Luther E., Rose S.S., Springer T.A. (1994): Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**:3652-3656

21. Cernadas M., De Sanctis G.T., Krinzman S.J., Mark D.A., Donovan C.E., Listman J.A.et al. (1999): CD23 and allergic pulmonary inflammation: potential role as an inhibitor. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **20**:1-8

22. Chai O.H., Han E.H., Lee H.K., Song C.H. (2011): Mast cells play a key role in Th2 cytokine-dependent asthma model through production of adhesion molecules by liberation of TNF-alpha. *Exp.Mol.Med.* **43**:35-43

23. Chen W., Jin W., Hardegen N., Lei K.J., Li L., Marinos N.et al. (2003): Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J.Exp.Med.* **198**:1875-1886

24. Chen Y., Kuchroo V.K., Inobe J., Hafler D.A., Weiner H.L. (1994): Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* **265**:1237-1240

25. Christensen P.J., Armstrong L.R., Fak J.J., Chen G.H., McDonald R.A., Toews G.B.et al. (1995): Regulation of rat pulmonary dendritic cell immunostimulatory activity by alveolar epithelial cell-derived granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **13**:426-433

26. Cirillo I., Vizzaccaro A., Klersy C., Baiardini I., Marseglia G.L., Canonica G.W. et al. (2005): Quality of life and polysensitization in young men with intermittent asthma. *Ann.Allergy Asthma Immunol.* **94**:640-643
27. Coffman R.L., Ohara J., Bond M.W., Carty J., Zlotnik A., Paul W.E. (1986): B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *J.Immunol.* **136**:4538-4541
28. Coutinho A. und Poltorack A. (2003): Innate immunity: from lymphocyte mitogens to Toll-like receptors and back. *Curr.Opin.Immunol.* **15**:599-602
29. Crapo J.D., Barry B.E., Gehr P., Bachofen M., Weibel E.R. (1982): Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am.Rev.Respir.Dis.* **125**:740-745
30. Cruickshank S.M., McVay L.D., Baumgart D.C., Felsburg P.J., Carding S.R. (2004): Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4 T cell activation. *Gut* **53**:678-684
31. Culley F.J., Pennycook A.M., Tregoning J.S., Dodd J.S., Walzl G., Wells T.N. et al. (2006): Role of CCL5 (RANTES) in viral lung disease. *J.Virol.* **80**:8151-8157
32. D'Amato G., Liccardi G., D'Amato M., Holgate S. (2005): Environmental risk factors and allergic bronchial asthma. *Clin.Exp.Allergy* **35**:1113-1124
33. Dabbagh K., Dahl M.E., Stepick-Biek P., Lewis D.B. (2002): Toll-like receptor 4 is required for optimal development of Th2 immune responses: role of dendritic cells. *J.Immunol.* **168**:4524-4530
34. Dabbagh K., Takeyama K., Lee H.M., Ueki I.F., Lausier J.A., Nadel J.A. (1999): IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo. *J.Immunol.* **162**:6233-6237
35. De Smedt T., Pajak B., Muraille E., Lespagnard L., Heinen E., De B.P. et al. (1996): Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J.Exp.Med.* **184**:1413-1424
36. Del Prete G., Maggi E., Parronchi P., Chretien I., Tiri A., Macchia D. et al. (1988): IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. *J.Immunol.* **140**:4193-4198
37. Des Roches A., Paradis L., Menardo J.L., Bouges S., Daures J.P., Bousquet J. (1997): Immunotherapy with a standardized Dermatophagoides pteronyssinus extract. VI. Specific immunotherapy prevents the onset of new sensitizations in children. *J.Allergy Clin.Immunol.* **99**:450-453
38. Dittrich A.M., Chen H.C., Xu L., Ranney P., Connolly S., Yarovinsky T.O. et al. (2008): A new mechanism for inhalational priming: IL-4 bypasses innate immune signals. *J.Immunol.* **181**:7307-7315
39. Dittrich A.M., Krokowski M., Meyer H.A., Quarcoo D., Avagyan A., Ahrens B. et al. (2010): Lipocalin2 protects against airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of allergic airway disease. *Clin.Exp.Allergy* **40**:1689-1700
40. Dittrich A.M., Meyer H.A., Krokowski M., Quarcoo D., Ahrens B., Kube S.M. et al. (2010): Glutathione peroxidase-2 protects from allergen-induced airway inflammation in mice. *Eur.Respir.J.* **35**:1148-1154

41. Dittrich A.M., Quarcoo D., Krokowski M., Ahrens B., Hamelmann E. (2006): Gene expression profiling as novel tool in experimental asthma research. *Exp.Toxicol.Pathol.* **57 Suppl 2**:31-33
42. Doerre S., Mesires K.P., Daley K.M., McCarty T., Knoetig S., Corley R.B. (2005): Reductions in I kappa B epsilon and changes in NF-kappa B activity during B lymphocyte differentiation. *J.Immunol.* **174**:983-991
43. Doucet C., Brouty-Boye D., Pottin-Clemenceau C., Jasmin C., Canonica G.W., Azzarone B. (1998): IL-4 and IL-13 specifically increase adhesion molecule and inflammatory cytokine expression in human lung fibroblasts. *Int.Immunol.* **10**:1421-1433
44. Eisenbarth S.C., Cassel S., Bottomly K. (2004): Understanding asthma pathogenesis: linking innate and adaptive immunity. *Curr.Opin.Pediatr.* **16**:659-666
45. Eisenbarth S.C., Piggott D.A., Huleatt J.W., Visintin I., Herrick C.A., Bottomly K. (2002): Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J.Exp.Med.* **196**:1645-1651
46. Eisenbarth S.C., Zhadkevich A., Ranney P., Herrick C.A., Bottomly K. (2004): IL-4-dependent Th2 collateral priming to inhaled antigens independent of Toll-like receptor 4 and myeloid differentiation factor 88. *J.Immunol.* **172**:4527-4534
47. Ermini L., Aldi S., Rosati F. (2008): Expression of CD52 mRNA in the rat embryo. *Dev.Growth Differ.* **50**:577-583
48. Evans M.J., Cabral L.J., Stephens R.J., Freeman G. (1975): Transformation of alveolar type 2 cells to type 1 cells following exposure to NO₂. *Exp.Mol.Pathol.* **22**:142-150
49. Falkoff R.M. und Scavulli J.F. (1978): Suppressor-cell function and autoimmunity. *Ann.Intern.Med.* **89**:426-
50. Freeman G.J., Long A.J., Iwai Y., Bourque K., Chernova T., Nishimura H.et al. (2000): Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J.Exp.Med.* **192**:1027-1034
51. Fu S., Yopp A.C., Mao X., Chen D., Zhang N., Chen D.et al. (2004): CD4+ CD25+ CD62+ T-regulatory cell subset has optimal suppressive and proliferative potential. *Am.J.Transplant.* **4**:65-78
52. Fujikado N., Saijo S., Yonezawa T., Shimamori K., Ishii A., Sugai S.et al. (2008): Dcir deficiency causes development of autoimmune diseases in mice due to excess expansion of dendritic cells. *Nat.Med.* **14**:176-180
53. Fujimoto Y. und Tedder T.F. (2006): CD83: a regulatory molecule of the immune system with great potential for therapeutic application. *J.Med.Dent.Sci.* **53**:85-91
54. Ganas K., Loukides S., Papatheodorou G., Panagou P., Kalogeropoulos N. (2001): Total nitrite/nitrate in expired breath condensate of patients with asthma. *Respir.Med.* **95**:649-654

55. Garrigan K., Moroni-Rawson P., McMurray C., Hermans I., Abernethy N., Watson J. et al. (1996): Functional comparison of spleen dendritic cells and dendritic cells cultured in vitro from bone marrow precursors. *Blood* **88**:3508-3512
56. Gazdar A.F., Gao B., Minna J.D. (2010): Lung cancer cell lines: Useless artifacts or invaluable tools for medical science? *Lung Cancer* **68**:309-318
57. Geha R.S., Jabara H.H., Brodeur S.R. (2003): The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat.Rev.Immunol.* **3**:721-732
58. Gell, P.G.H. and Coombs, R.R.A. (1963): Clinical aspects of immunology. *F.A. Davis Co*
59. Gereke M., Jung S., Buer J., Bruder D. (2009): Alveolar type II epithelial cells present antigen to CD4(+) T cells and induce Foxp3(+) regulatory T cells. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **179**:344-355
60. Ghafouri-Fard S., Ousati A.Z., Sabah G.B., Hasheminasab S.M., Modarressi M.H. (2010): Expression of two testis-specific genes, SPATA19 and LEMD1, in prostate cancer. *Arch.Med.Res.* **41**:195-200
61. Goldschmidt I., Grahammer F., Warth R., Schulz-Baldes A., Garty H., Greger R. et al. (2004): Kidney and colon electrolyte transport in CHIF knockout mice. *Cell Physiol Biochem.* **14**:113-120
62. Goodwin R.G., Din W.S., vis-Smith T., Anderson D.M., Gimpel S.D., Sato T.A. et al. (1993): Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *Eur.J.Immunol.* **23**:2631-2641
63. Grabbe J., Karau L., Welker P., Ziegler A., Henz B.M. (1997): Induction of MHC class II antigen expression on human HMC-1 mast cells. *J.Dermatol.Sci.* **16**:67-73
64. Gramaglia I., Cooper D., Miner K.T., Kwon B.S., Croft M. (2000): Co-stimulation of antigen-specific CD4 T cells by 4-1BB ligand. *Eur.J.Immunol.* **30**:392-402
65. Greaves D.R., Hakkinen T., Lucas A.D., Liddiard K., Jones E., Quinn C.M. et al. (2001): Linked chromosome 16q13 chemokines, macrophage-derived chemokine, fractalkine, and thymus- and activation-regulated chemokine, are expressed in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **21**:923-929
66. Greenwald R.J., Freeman G.J., Sharpe A.H. (2005): The B7 family revisited. *Annu.Rev.Immunol.* **23**:515-548
67. Gudmundsdottir H., Wells A.D., Turka L.A. (1999): Dynamics and requirements of T cell clonal expansion in vivo at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity. *J.Immunol.* **162**:5212-5223
68. Hamid Q., Song Y., Kotsimbos T.C., Minshall E., Bai T.R., Hegele R.G. et al. (1997): Inflammation of small airways in asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* **100**:44-51
69. Hammad H. und Lambrecht B.N. (2011): Dendritic cells and airway epithelial cells at the interface between innate and adaptive immune responses. *Allergy* **66**:579-587

70. Harris, C.C. (1978): Pathogenesis and Therapy of Lung Cancer. *M. Dekker*
71. Heijink I.H., Marcel K.P., van Oosterhout A.J., Postma D.S., Kauffman H.F., Vellenga E. (2007): Der p, IL-4, and TGF-beta cooperatively induce EGFR-dependent TARC expression in airway epithelium. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **36**:351-359
72. Heinisch I.V., Bizer C., Volgger W., Simon H.U. (2001): Functional CD137 receptors are expressed by eosinophils from patients with IgE-mediated allergic responses but not by eosinophils from patients with non-IgE-mediated eosinophilic disorders. *J.Allergy Clin.Immunol.* **108**:21-28
73. Heinzl K., Benz C., Bleul C.C. (2007): A silent chemokine receptor regulates steady-state leukocyte homing in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **104**:8421-8426
74. Herrick C.A., MacLeod H., Glusac E., Tigelaar R.E., Bottomly K. (2000): Th2 responses induced by epicutaneous or inhalational protein exposure are differentially dependent on IL-4. *J.Clin.Invest* **105**:765-775
75. Hill S., Coates J.P., Kimber I., Knight S.C. (1994): Differential function of dendritic cells isolated from blood and lymph nodes. *Immunology* **83**:295-301
76. Hogan S.P., Rosenberg H.F., Moqbel R., Phipps S., Foster P.S., Lacy P.et al. (2008): Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin.Exp.Allergy* **38**:709-750
77. Hohlfeld J., Fabel H., Hamm H. (1997): The role of pulmonary surfactant in obstructive airways disease. *Eur.Respir.J.* **10**:482-491
78. Holgate S.T. (2007): The epithelium takes centre stage in asthma and atopic dermatitis. *Trends Immunol.* **28**:248-251
79. Holgate S.T., Bodey K.S., Janezic A., Frew A.J., Kaplan A.P., Teran L.M. (1997): Release of RANTES, MIP-1 alpha, and MCP-1 into asthmatic airways following endobronchial allergen challenge. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **156**:1377-1383
80. Hoontrakoon R., Kailey J., Bratton D. (1999): IL-4 and TNF-alpha synergize to enhance eosinophil survival. *J.Allergy Clin.Immunol.* **103**:A239-
81. Hsu S.J., Nagase H., Balmain A. (2004): Identification of Fetuin-B as a member of a cystatin-like gene family on mouse chromosome 16 with tumor suppressor activity. *Genome* **47**:931-946
82. Hurtado J.C., Kim S.H., Pollok K.E., Lee Z.H., Kwon B.S. (1995): Potential role of 4-1BB in T cell activation. Comparison with the costimulatory molecule CD28. *J.Immunol.* **155**:3360-3367
83. Ibanez M.D., Navarro A., Sanchez M.C., Rondon C., Montoro J., Mateu V.et al. (2010): Rhinitis and its association with asthma in patients under 14 years of age treated in allergy departments in Spain. *J.Investig.Allergol.Clin.Immunol.* **20**:402-406
84. Imai T., Baba M., Nishimura M., Kakizaki M., Takagi S., Yoshie O. (1997): The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4. *J.Biol.Chem.* **272**:15036-15042

85. Inaba K., Inaba M., Romani N., Aya H., Deguchi M., Ikehara S. et al. (1992): Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J.Exp.Med.* **176**:1693-1702
86. Ito T., Wang Y.H., Duramad O., Hori T., Delespesse G.J., Watanabe N. et al. (2005): TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J.Exp.Med.* **202**:1213-1223
87. Janeway C.A., Jr. (1989): Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **54 Pt 1**:1-13
88. Janeway C.A., Jr. und Medzhitov R. (2002): Innate immune recognition. *Annu.Rev.Immunol.* **20**:197-216
89. Jeon S.G., Oh S.Y., Park H.K., Kim Y.S., Shim E.J., Lee H.S. et al. (2007): TH2 and TH1 lung inflammation induced by airway allergen sensitization with low and high doses of double-stranded RNA. *J.Allergy Clin.Immunol.* **120**:803-812
90. Kameyoshi Y., Dorschner A., Mallet A.I., Christophers E., Schroder J.M. (1992): Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J.Exp.Med.* **176**:587-592
91. Kaplan A.P., Kuna P., Reddigari S.R. (1995): Chemokines and the allergic response. *Exp.Dermatol.* **4**:260-265
92. Kato A., Favoreto S Jr, Avila P.C., Schleimer R.P. (2007): TLR3- and Th2 cytokine-dependent production of thymic stromal lymphopoietin in human airway epithelial cells. *J.Immunol.* **179**:1080-1087
93. Kauffman S.L., Burri P.H., Weibel E.R. (1974): The postnatal growth of the rat lung. II. Autoradiography. *Anat.Rec.* **180**:63-76
94. Kay A.B. (2001a): Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* **344**:30-37
95. Kay A.B. (2001b): Allergy and allergic diseases. Second of two parts. *N.Engl.J.Med.* **344**:109-113
96. Kharitonov S.A., Yates D., Springall D.R., Buttery L., Polak J., Robbins R.A. et al. (1995): Exhaled nitric oxide is increased in asthma. *Chest* **107**:156S-157S
97. Kim J., Myers A.C., Chen L., Pardoll D.M., Truong-Tran Q.A., Lane A.P. et al. (2005): Constitutive and inducible expression of b7 family of ligands by human airway epithelial cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **33**:280-289
98. Kim J.D., Choi B.K., Bae J.S., Lee U.H., Han I.S., Lee H.W. et al. (2003): Cloning and characterization of GITR ligand. *Genes Immun.* **4**:564-569
99. Kiss P.J., Knisz J., Zhang Y., Baltrusaitis J., Sigmund C.D., Thalmann R. et al. (2006): Inactivation of NADPH oxidase organizer 1 results in severe imbalance. *Curr.Biol.* **16**:208-213

100. Kramer M.F., Jordan T.R., Klemens C., Hilgert E., Hempel J.M., Pfrogner E. et al. (2006): Factors contributing to nasal allergic late phase eosinophilia. *Am.J.Otolaryngol.* **27**:190-199
101. Kuipers H. und Lambrecht B.N. (2004): The interplay of dendritic cells, Th2 cells and regulatory T cells in asthma. *Curr.Opin.Immunol.* **16**:702-708
102. Kuna P., Reddigari S.R., Schall T.J., Rucinski D., Sadick M., Kaplan A.P. (1993): Characterization of the human basophil response to cytokines, growth factors, and histamine releasing factors of the intercrine/chemokine family. *J.Immunol.* **150**:1932-1943
103. Kurata H., Lee H.J., O'Garra A., Arai N. (1999): Ectopic expression of activated Stat6 induces the expression of Th2-specific cytokines and transcription factors in developing Th1 cells. *Immunity.* **11**:677-688
104. Kurtz J., Raval F., Vallot C., Der J., Sykes M. (2009): CTLA-4 on alloreactive CD4 T cells interacts with recipient CD80/86 to promote tolerance. *Blood* **113**:3475-3484
105. Kushwah R., Wu J., Oliver J.R., Jiang G., Zhang J., Siminovitch K.A. et al. (2010): Uptake of apoptotic DC converts immature DC into tolerogenic DC that induce differentiation of Foxp3+ Treg. *Eur.J.Immunol.* **40**:1022-1035
106. Lawrence T., Willoughby D.A., Gilroy D.W. (2002): Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat.Rev.Immunol.* **2**:787-795
107. Lieberam I. und Forster I. (1999): The murine beta-chemokine TARC is expressed by subsets of dendritic cells and attracts primed CD4+ T cells. *Eur.J.Immunol.* **29**:2684-2694
108. Lilly C.M., Nakamura H., Kesselman H., Nagler-Anderson C., Asano K., Garcia-Zepeda E.A. et al. (1997): Expression of eotaxin by human lung epithelial cells: induction by cytokines and inhibition by glucocorticoids. *J.Clin.Invest* **99**:1767-1773
109. Lommatzsch M., Julius P., Kuepper M., Garn H., Bratke K., Irmscher S. et al. (2006): The course of allergen-induced leukocyte infiltration in human and experimental asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* **118**:91-97
110. Luster A.D. und Rothenberg M.E. (1997): Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation. *J.Leukoc.Biol.* **62**:620-633
111. Mahesh S.P., Li Z., Liu B., Fariss R.N., Nussenblatt R.B. (2006): Expression of GITR ligand abrogates immunosuppressive function of ocular tissue and differentially modulates inflammatory cytokines and chemokines. *Eur.J.Immunol.* **36**:2128-2138
112. March M.E., Sleiman P.M., Hakonarson H. (2011): The genetics of asthma and allergic disorders. *Discov.Med.* **11**:35-45
113. Marini M., Vittori E., Hollemborg J., Mattoli S. (1992): Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8, in bronchial epithelial cells of patients with asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* **89**:1001-1009

114. Masoli M., Fabian D., Holt S., Beasley R. (2004): The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* **59**:469-478
115. Mason J.M., Naidu M.D., Barcia M., Porti D., Chavan S.S., Chu C.C. (2004): IL-4-induced gene-1 is a leukocyte L-amino acid oxidase with an unusual acidic pH preference and lysosomal localization. *J.Immunol.* **173**:4561-4567
116. Matsushima K., Larsen C.G., DuBois G.C., Oppenheim J.J. (1989): Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J.Exp.Med.* **169**:1485-1490
117. Metcalfe D.D., Baram D., Mekori Y.A. (1997): Mast cells. *Physiol Rev.* **77**:1033-1079
118. Minshall E.M., Hogg J.C., Hamid Q.A. (1998): Cytokine mRNA expression in asthma is not restricted to the large airways. *J.Allergy Clin.Immunol.* **101**:386-390
119. Monick M.M., Powers L.S., Hassan I., Groskreutz D., Yarovinsky T.O., Barrett C.W. et al. (2007): Respiratory syncytial virus synergizes with Th2 cytokines to induce optimal levels of TARC/CCL17. *J.Immunol.* **179**:1648-1658
120. Moser B., Clark-Lewis I., Zwahlen R., Baggiolini M. (1990): Neutrophil-activating properties of the melanoma growth-stimulatory activity. *J.Exp.Med.* **171**:1797-1802
121. Moser R., Fehr J., Bruijnzeel P.L. (1992): IL-4 controls the selective endothelium-driven transmigration of eosinophils from allergic individuals. *J.Immunol.* **149**:1432-1438
122. Motta A.C., Vissers J.L., Gras R., Van Esch B.C., van Oosterhout A.J., Nawijn M.C. (2009): GITR signaling potentiates airway hyperresponsiveness by enhancing Th2 cell activity in a mouse model of asthma. *Respir.Res.* **10**:93-
123. Murphy K.M. und Reiner S.L. (2002): The lineage decisions of helper T cells. *Nat.Rev.Immunol.* **2**:933-944
124. Murphy K.M. und Stockinger B. (2010): Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nat.Immunol.* **11**:674-680
125. Nagata M., Sedgwick J.B., Busse W.W. (1995): Differential effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on eosinophil and neutrophil superoxide anion generation. *J.Immunol.* **155**:4948-4954
126. Nakao I., Kanaji S., Ohta S., Matsushita H., Arima K., Yuyama N. et al. (2008): Identification of pendrin as a common mediator for mucus production in bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J.Immunol.* **180**:6262-6269
127. Nickel R., Beck L.A., Stellato C., Schleimer R.P. (1999): Chemokines and allergic disease. *J.Allergy Clin.Immunol.* **104**:723-742
128. Nofziger C., Dossena S., Suzuki S., Izuhara K., Paulmichl M. (2011): Pendrin function in airway epithelia. *Cell Physiol Biochem.* **28**:571-578

129. O'Brien A.D., Standiford T.J., Christensen P.J., Wilcoxon S.E., Paine R., III (1998): Chemotaxis of alveolar macrophages in response to signals derived from alveolar epithelial cells. *J.Lab Clin.Med.* **131**:417-424
130. Okamoto Y., Kim D., Battaglini R., Sasaki H., Spate U., Stashenko P. (2004): MIP-1 gamma promotes receptor-activator-of-NF-kappa-B-ligand-induced osteoclast formation and survival. *J.Immunol.* **173**:2084-2090
131. Olszewska-Pazdrak B., Casola A., Saito T., Alam R., Crowe S.E., Mei F. et al. (1998): Cell-specific expression of RANTES, MCP-1, and MIP-1alpha by lower airway epithelial cells and eosinophils infected with respiratory syncytial virus. *J.Virol.* **72**:4756-4764
132. Openshaw P.J. (1995): Immunity and immunopathology to respiratory syncytial virus. The mouse model. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **152**:S59-S62
133. Osanai A., Sashinami H., Asano K., Li S.J., Hu D.L., Nakane A. (2011): Mouse peptidoglycan recognition protein PGLYRP-1 plays a role in the host innate immune response against *Listeria monocytogenes* infection. *Infect.Immun.* **79**:858-866
134. Paine R., III, Mody C.H., Chavis A., Spahr M.A., Turka L.A., Toews G.B. (1991): Alveolar epithelial cells block lymphocyte proliferation in vitro without inhibiting activation. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **5**:221-229
135. Palaniyandi S., Tomei E., Li Z., Conrad D.H., Zhu X. (2011): CD23-dependent transcytosis of IgE and immune complex across the polarized human respiratory epithelial cells. *J.Immunol.* **186**:3484-3496
136. Pallasaho P., Juusela M., Lindqvist A., Sovijarvi A., Lundback B., Ronmark E. (2011): Allergic rhinoconjunctivitis doubles the risk for incident asthma--results from a population study in Helsinki, Finland. *Respir.Med.* **105**:1449-1456
137. Paolieri F., Battifora M., Riccio A.M., Pesce G., Canonica G.W., Bagnasco M. (1997): Intercellular adhesion molecule-1 on cultured human epithelial cell lines: influence of proinflammatory cytokines. *Allergy* **52**:521-531
138. Park C.S., Choi Y.S., Ki S.Y., Moon S.H., Jeong S.W., Uh S.T. et al. (1998): Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is the main cytokine enhancing survival of eosinophils in asthmatic airways. *Eur.Respir.J.* **12**:872-878
139. Park L.S., Friend D., Sassenfeld H.M., Urdal D.L. (1987): Characterization of the human B cell stimulatory factor 1 receptor. *J.Exp.Med.* **166**:476-488
140. Parronchi P., De C.M., Manetti R., Simonelli C., Sampognaro S., Piccinni M.P. et al. (1992): IL-4 and IFN (alpha and gamma) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones. *J.Immunol.* **149**:2977-2983
141. Pawankar R., Okuda M., Yssel H., Okumura K., Ra C. (1997): Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the Fc epsilonRI, CD40L, IL-4, and IL-13, and can induce IgE synthesis in B cells. *J.Clin.Invest* **99**:1492-1499

142. Peach R.J., Bajorath J., Naemura J., Leytze G., Greene J., Aruffo A. et al. (1995): Both extracellular immunoglobulin-like domains of CD80 contain residues critical for binding T cell surface receptors CTLA-4 and CD28. *J.Biol.Chem.* **270**:21181-21187
143. Pearce N., Pekkanen J., Beasley R. (1999): How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax* **54**:268-272
144. Pfaffl M.W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**:e45-
145. Pichler W.J. (2003): Delayed drug hypersensitivity reactions. *Ann.Intern.Med.* **139**:683-693
146. Piggott D.A., Eisenbarth S.C., Xu L., Constant S.L., Huleatt J.W., Herrick C.A. et al. (2005): MyD88-dependent induction of allergic Th2 responses to intranasal antigen. *J.Clin.Invest* **115**:459-467
147. Pollok K.E., Kim Y.J., Hurtado J., Zhou Z., Kim K.K., Kwon B.S. (1994): 4-1BB T-cell antigen binds to mature B cells and macrophages, and costimulates anti-mu-primed splenic B cells. *Eur.J.Immunol.* **24**:367-374
148. Pollok K.E., Kim Y.J., Zhou Z., Hurtado J., Kim K.K., Pickard R.T. et al. (1993): Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function. *J.Immunol.* **150**:771-781
149. Polte T., Foell J., Werner C., Hoymann H.G., Braun A., Burdach S. et al. (2006): CD137-mediated immunotherapy for allergic asthma. *J.Clin.Invest* **116**:1025-1036
150. Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., Van H.C., Du X. et al. (1998): Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**:2085-2088
151. Poltorak A., Smirnova I., He X., Liu M.Y., Van H.C., McNally O. et al. (1998): Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol.Dis.* **24**:340-355
152. Post M., Batenburg J.J., Schuurmans E.A., Laros C.D., van Golde L.M. (1982): Lamellar bodies isolated from adult human lung tissue. *Exp.Lung Res.* **3**:17-28
153. Propst S.M., Denson R., Rothstein E., Estell K., Schwiebert L.M. (2000): Proinflammatory and Th2-derived cytokines modulate CD40-mediated expression of inflammatory mediators in airway epithelia: implications for the role of epithelial CD40 in airway inflammation. *J.Immunol.* **165**:2214-2221
154. Purello-D'Ambrosio F., Gangemi S., Merendino R.A., Isola S., Puccinelli P., Parmiani S. et al. (2001): Prevention of new sensitizations in monosensitized subjects submitted to specific immunotherapy or not. A retrospective study. *Clin.Exp.Allergy* **31**:1295-1302
155. Qiao J., Li A., Jin X. (2011): TSLP from RSV-stimulated rat airway epithelial cells activates myeloid dendritic cells. *Immunol.Cell Biol.* **89**:231-238
156. Qin Z., Noffz G., Mohaupt M., Blankenstein T. (1997): Interleukin-10 prevents dendritic cell accumulation and vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-modified tumor cells. *J.Immunol.* **159**:770-776

157. Qiu Y., Zhu J., Bandi V., Guntupalli K.K., Jeffery P.K. (2007): Bronchial mucosal inflammation and upregulation of CXC chemoattractants and receptors in severe exacerbations of asthma. *Thorax* **62**:475-482
158. Raes G., De B.P., Noel W., Beschin A., Brombacher F., Hassanzadeh G.G. (2002): Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *J.Leukoc.Biol.* **71**:597-602
159. Reams B.D., Musselwhite L.W., Zaas D.W., Steele M.P., Garantziotis S., Eu P.C.et al. (2007): Alemtuzumab in the treatment of refractory acute rejection and bronchiolitis obliterans syndrome after human lung transplantation. *Am.J.Transplant.* **7**:2802-2808
160. Redecke V., Hacker H., Datta S.K., Fermin A., Pitha P.M., Broide D.H.et al. (2004): Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J.Immunol.* **172**:2739-2743
161. Reibman J., Hsu Y., Chen L.C., Bleck B., Gordon T. (2003): Airway epithelial cells release MIP-3alpha/CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **28**:648-654
162. Robertson, B., van Golde, L.M.G., Batenburg, J.J. (1992): Pulmonary surfactant: from molecular biology to clinical practice. *Elsevier*
163. Robinson D.S., Hamid Q., Ying S., Tscopoulos A., Barkans J., Bentley A.M.et al. (1992): Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N.Engl.J.Med.* **326**:298-304
164. Ruefli-Brasse A.A., French D.M., Dixit V.M. (2003): Regulation of NF-kappaB-dependent lymphocyte activation and development by paracaspase. *Science* **302**:1581-1584
165. Sakaguchi S. und Powrie F. (2007): Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science* **317**:627-629
166. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M. (1995): Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J.Immunol.* **155**:1151-1164
167. Sanderson C.J. (1992): Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* **79**:3101-3109
168. Scarpelli, E.M. (1988): Surfactants and the lining of the lung. *Johns Hopkins University Press*
169. Schachtrup C., Scholzen T.E., Grau V., Luger T.A., Sorg C., Spener F.et al. (2004): L-FABP is exclusively expressed in alveolar macrophages within the myeloid lineage: evidence for a PPARalpha-independent expression. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **36**:2042-2053
170. Schall T.J., Bacon K., Toy K.J., Goeddel D.V. (1990): Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* **347**:669-671

171. Scheicher C., Mehlig M., Zecher R., Reske K. (1992): Dendritic cells from mouse bone marrow: in vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J.Immunol.Methods* **154**:253-264
172. Schleimer R.P., Kato A., Kern R., Kuperman D., Avila P.C. (2007): Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses. *J.Allergy Clin.Immunol.* **120**:1279-1284
173. Schmitz J., Owyang A., Oldham E., Song Y., Murphy E., McClanahan T.K.et al. (2005): IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity.* **23**:479-490
174. Schwarz H., Tuckwell J., Lotz M. (1993): A receptor induced by lymphocyte activation (ILA): a new member of the human nerve-growth-factor/tumor-necrosis-factor receptor family. *Gene* **134**:295-298
175. Sekiya T., Miyamasu M., Imanishi M., Yamada H., Nakajima T., Yamaguchi M.et al. (2000): Inducible expression of a Th2-type CC chemokine thymus- and activation-regulated chemokine by human bronchial epithelial cells. *J.Immunol.* **165**:2205-2213
176. Selvan R.S., Butterfield J.H., Krangel M.S. (1994): Expression of multiple chemokine genes by a human mast cell leukemia. *J.Biol.Chem.* **269**:13893-13898
177. Serhan C.N. und Savill J. (2005): Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat.Immunol.* **6**:1191-1197
178. Sha Q., Truong-Tran A.Q., Plitt J.R., Beck L.A., Schleimer R.P. (2004): Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **31**:358-364
179. Shirato K. und Taguchi F. (2009): Mast cell degranulation is induced by A549 airway epithelial cell infected with respiratory syncytial virus. *Virology* **386**:88-93
180. Sigurs N., Gustafsson P.M., Bjarnason R., Lundberg F., Schmidt S., Sigurbergsson F.et al. (2005): Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **171**:137-141
181. So T., Lee S.W., Croft M. (2006): Tumor necrosis factor/tumor necrosis factor receptor family members that positively regulate immunity. *Int.J.Hematol.* **83**:1-11
182. Sole D., Camelo-Nunes I.C., Wandalsen G.F., Rosario N.A., Sarinho E.C. (2011): Is allergic rhinitis a trivial disease? *Clinics.(Sao Paulo)* **66**:1573-1577
183. Soloperto M., Mattoso V.L., Fasoli A., Mattoli S. (1991): A bronchial epithelial cell-derived factor in asthma that promotes eosinophil activation and survival as GM-CSF. *Am.J.Physiol* **260**:L530-L538
184. Soumelis V., Reche P.A., Kanzler H., Yuan W., Edward G., Homey B.et al. (2002): Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat.Immunol.* **3**:673-680

185. Spencer L.A., Szela C.T., Perez S.A., Kirchhoffer C.L., Neves J.S., Radke A.L. et al. (2009): Human eosinophils constitutively express multiple Th1, Th2, and immunoregulatory cytokines that are secreted rapidly and differentially. *J.Leukoc.Biol.* **85**:117-123
186. Stanciu L.A., Bellettato C.M., Laza-Stanca V., Coyle A.J., Papi A., Johnston S.L. (2006): Expression of programmed death-1 ligand (PD-L) 1, PD-L2, B7-H3, and inducible costimulator ligand on human respiratory tract epithelial cells and regulation by respiratory syncytial virus and type 1 and 2 cytokines. *J.Infect.Dis.* **193**:404-412
187. Stavnezer J. (1996): Immunoglobulin class switching. *Curr.Opin.Immunol.* **8**:199-205
188. Stone K.D., Prussin C., Metcalfe D.D. (2010): IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J.Allergy Clin.Immunol.* **125**:S73-S80
189. Stoner G.D., Kikkawa Y., Kniazeff A.J., Miyai K., Wagner R.M. (1975): Clonal isolation of epithelial cells from mouse lung adenoma. *Cancer Res.* **35**:2177-2185
190. Sweeney C., Fambrough D., Huard C., Diamonti A.J., Lander E.S., Cantley L.C. et al. (2001): Growth factor-specific signaling pathway stimulation and gene expression mediated by ErbB receptors. *J.Biol.Chem.* **276**:22685-22698
191. Szabo S.J., Sullivan B.M., Peng S.L., Glimcher L.H. (2003): Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* **21**:713-758
192. Takeyama K., Dabbagh K., Lee H.M., Agusti C., Lausier J.A., Ueki I.F. et al. (1999): Epidermal growth factor system regulates mucin production in airways. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**:3081-3086
193. Taube C., Dakhama A., Gelfand E.W. (2004): Insights into the pathogenesis of asthma utilizing murine models. *Int.Arch.Allergy Immunol.* **135**:173-186
194. Teran L.M., Noso N., Carroll M., Davies D.E., Holgate S., Schroder J.M. (1996): Eosinophil recruitment following allergen challenge is associated with the release of the chemokine RANTES into asthmatic airways. *J.Immunol.* **157**:1806-1812
195. Thompson C.B., Lindsten T., Ledbetter J.A., Kunkel S.L., Young H.A., Emerson S.G. et al. (1989): CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**:1333-1337
196. Tulic M.K. und Hamid Q. (2006): New insights into the pathophysiology of the small airways in asthma. *Clin.Chest Med.* **27**:41-52
197. Turner H. und Kinet J.P. (1999): Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature* **402**:B24-B30
198. Valverde M.A., Cantero-Recasens G., Garcia-Elias A., Jung C., Carreras-Sureda A., Vicente R. (2011): Ion channels in asthma. *J.Biol.Chem.* **286**:32877-32882
199. van Rijt L.S., Vos N., Willart M., Muskens F., Tak P.P., van der H.C. et al. (2011): Persistent activation of dendritic cells after resolution of allergic airway inflammation breaks tolerance to inhaled allergens in mice. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **184**:303-311

200. Venturi G.M., Conway R.M., Steeber D.A., Tedder T.F. (2007): CD25+CD4+ regulatory T cell migration requires L-selectin expression: L-selectin transcriptional regulation balances constitutive receptor turnover. *J.Immunol.* **178**:291-300
201. Vinay D.S. und Kwon B.S. (1998): Role of 4-1BB in immune responses. *Semin.Immunol.* **10**:481-489
202. Vroiling A.B., Duinsbergen D., Fokkens W.J., van Drunen C.M. (2007): Allergen induced gene expression of airway epithelial cells shows a possible role for TNF-alpha. *Allergy* **62**:1310-1319
203. Wachtler, F. (2005): Histologie: Lehrbuch der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen. *Facultas-Univ.-Verlag*
204. Walsh G.M. (2001): Eosinophil granule proteins and their role in disease. *Curr.Opin.Hematol.* **8**:28-33
205. Wan Y.Y. und Flavell R.A. (2008): TGF-beta and regulatory T cell in immunity and autoimmunity. *J.Clin.Immunol.* **28**:647-659
206. Wang H., Su Z., Schwarze J. (2009): Healthy but not RSV-infected lung epithelial cells profoundly inhibit T cell activation. *Thorax* **64**:283-290
207. Wang S. und Chen L. (2004): Co-signaling molecules of the B7-CD28 family in positive and negative regulation of T lymphocyte responses. *Microbes.Infect.* **6**:759-766
208. Watanabe N., Gavrieli M., Sedy J.R., Yang J., Fallarino F., Loftin S.K.et al. (2003): BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat.Immunol.* **4**:670-679
209. Weckmann M., Collison A., Simpson J.L., Kopp M.V., Wark P.A., Smyth M.J.et al. (2007): Critical link between TRAIL and CCL20 for the activation of TH2 cells and the expression of allergic airway disease. *Nat.Med.* **13**:1308-1315
210. Werninghaus K., Babiak A., Gross O., Holscher C., Dietrich H., Agger E.M.et al. (2009): Adjuvanticity of a synthetic cord factor analogue for subunit Mycobacterium tuberculosis vaccination requires FcRgamma-Syk-Card9-dependent innate immune activation. *J.Exp.Med.* **206**:89-97
211. White J.R., Imburgia C., Dul E., Appelbaum E., O'Donnell K., O'Shannessy D.J.et al. (1997): Cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine that binds to the CCR3 receptor and activates human eosinophils. *J.Leukoc.Biol.* **62**:667-675
212. White S.R., Martin L.D., Abe M.K., Marroquin B.A., Stern R., Fu X. (2009): Insulin receptor substrate-1/2 mediates IL-4-induced migration of human airway epithelial cells. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **297**:L164-L173
213. Williams C.M. und Galli S.J. (2000): The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J.Allergy Clin.Immunol.* **105**:847-859
214. Wills-Karp M. (2001): IL-12/IL-13 axis in allergic asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* **107**:9-18

215. Young D.A., Lowe L.D., Clark S.C. (1990): Comparison of the effects of IL-3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and macrophage colony-stimulating factor in supporting monocyte differentiation in culture. Analysis of macrophage antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J.Immunol.* **145**:607-615
216. Zhao C.Z., Fang X.C., Wang D., Tang F.D., Wang X.D. (2010): Involvement of type II pneumocytes in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir.Med.* **104**:1391-1395
217. Zhu J., Cote-Sierra J., Guo L., Paul W.E. (2003): Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. *Immunity.* **19**:739-748
218. Zhu J., Guo L., Watson C.J., Hu-Li J., Paul W.E. (2001): Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. *J.Immunol.* **166**:7276-7281
219. Zhu J., Min B., Hu-Li J., Watson C.J., Grinberg A., Wang Q.et al. (2004): Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. *Nat.Immunol.* **5**:1157-1165
220. Zhu J., Yamane H., Cote-Sierra J., Guo L., Paul W.E. (2006): GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res.* **16**:3-10
221. Zimmermann N., Hogan S.P., Mishra A., Brandt E.B., Bodette T.R., Pope S.M.et al. (2000): Murine eotaxin-2: a constitutive eosinophil chemokine induced by allergen challenge and IL-4 overexpression. *J.Immunol.* **165**:5839-5846

10. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe. Alle Hilfsmittel und Hilfen habe ich angegeben, insbesondere habe ich die wörtlichen oder dem Sinne nach anderen Veröffentlichungen entnommenen Stellen kenntlich gemacht. Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

11. Danksagung

Die folgenden Zeilen möchte ich dazu nutzen, den Leuten zu danken, die direkt oder indirekt am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren.

Frau Dr. med. Anna-Maria Dittrich danke ich für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe, der Überlassung des Themas und der Betreuung der Arbeit. Die Geduld von Müttern ist unerschöpflich! Dies gilt scheinbar auch für Doktormütter! Bei Prof. Dr. rer. nat. Armin Braun möchte ich mich für die Diskussionsbereitschaft und die zahlreichen Tipps und Hilfestellungen bedanken, die er mir nicht nur montags, sondern stets wenn man gerade ratlos war gab.

Ich danke allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern der Nachwuchsgruppe Dittrich für viele methodische Ratschläge, Hilfestellung bei der Durchführung von Experimenten und vor allem für eine schöne, abwechslungsreiche und lustige Zeit. Mein besonderer Dank gilt:

Frau Dr. Melanie Albrecht für die tausend Fragen, die ich selbst nicht beantworten konnte und für die geduldige und strukturierte Anleitung; Dr. Sandra Lingner für die gemeinsamen Diskussionen und die schöne Zeit, die wir in den letzten Jahren gemeinsam hatten; Subhashree Mahapatra for a totally „over-awesome“ funny and nice time; Sahar Pourebrahim und Janet Remke für ihre tatkräftige Hilfe und stete Unterstützung; Maik Holme und Robin Schuchmann für die schönsten Monate meiner Doktorarbeit.

Bei Dr. Christian Hennig möchte ich mich für die schönen Aufnahmen meiner LA4 Zellen, der Hilfe bei Fragen der Immunhistochemie, der schönen Zeit und der guten Hilfestellungen bedanken. Museumsbesuche mit Christian kann ich darüber hinaus wärmstens empfehlen!

Frau Prof. Dr. Dunja Bruder und ihrer Arbeitsgruppe möchte ich herzlich für die fröhliche und gute Zeit danken, die ich bei ihnen am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig hatte. Besonders möchte ich mich bei Dr. Marcus Gereke und Andrea Autengruber bedanken, die mir bei der Durchführung der Experimente in ihrem Labor immer mit Wort und Tat zur Seite standen. Natürlich möchte ich mich auch für die apparativen und methodischen Möglichkeiten bedanken, die sich aus unserer Kooperation ergaben! Es ist hingegen nicht selbstverständlich, dass man dabei auch so viel Spass hat!

Ich danke der deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie, der European Academy of Allergy and Clinical Immunology, dem Graduiertenkolleg 1441: Regulation der

allergischen Entzündung in Lunge und Haut und dem Institut für Toxikologie und experimentelle Medizin der Fraunhofer Gesellschaft für die vielen Möglichkeiten des wissenschaftlichen Diskurs und Bildungsmöglichkeiten während meiner Promotionszeit.

Mein Dank gebührt Christine Kothe, die diese Arbeit durch ihr Lektorat vor einer orthographischen und grammatikalischen Bachlandung bewahrte! Für Naturwissenschaftler ist es immer von Vorteil, jemanden zu kennen der lesen und schreiben kann!

Zuletzt möchte ich den Menschen danken, die mir das alles letztendlich möglich gemacht haben. Für die aufopferungsvolle Unterstützung auf den vielen Wegen, die ich bis zu diesem Punkt gehen musste, bedanke ich mich bei meinen Eltern und Großeltern. Nicht nur meinen bisherigen Werdegang verdanke ich euch, sondern auch Kraft und Ruhe habt ihr mir in den letzten Jahren gespendet. Der größte Dank kommt allerdings meiner Frau und meinen Kindern zu! Auch während stürmischen und schweren Zeiten hielt sie mit ihrer Liebe und Geduld den Rücken frei und war mir nicht nur eine liebevolle Ehefrau, sondern auch eine Freundin, meine Quelle und Licht an finsternen Orten. Wenn ich nicht weiter wusste und Zweifel an der Fertigstellung der Arbeit sich in mir breit machten, dann baute sie mich wieder auf und gab mir die Energie, die mir fehlte. Auch ohne meine Kinder Jan, Fynn und Hannes hätte ich dies alles nicht vollbringen können. Die Liebe und Zufriedenheit, die ich während der viel zu wenigen Stunden mit euch gewann kann mir nichts auf der Welt ersetzen. Ich liebe euch und werde es immer!

Vielen Dank!

12. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Markus Arnhold
Adresse: Hermann-Blanke-Straße 18
30938 Großburgwedel
Geb. am: 12.10.1979
Geb. in: Großburgwedel
Familienstand: verheiratet, 3 Kinder

Ausbildung

Juni 1999 Abschluss mit Abitur am Gymnasium Großburgwedel
Oktober 1999 - Grundwehrdienst im Sanitätsregiment 2 in Hildesheim
August 2000 Erstimmatrikulation an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
Oktober 2000 zu Braunschweig
Sommer 2001 Vordiplomsprüfungen und Beginn des Hauptstudiums:
Hauptfach: Genetik
Nebenfächer: Zellbiologie / Zoologie
Juli 2006 - Diplomprüfungen:
September 2006
Genetik: 1,3
Zellbiologie 1,0
Zoologie 2,0
Oktober 2006 Beginn der Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Hefegenetik von Prof. Dr. Norbert F. Käufer, Institut für Genetik, Biozentrum, TU Braunschweig (Eingereicht am 05. Juli 2007)
Juli 2007 Abschluss des Diplomstudiengangs Biologie mit Gesamtnote „gut“

November 2007 Beginn der Promotion an der Medizinischen Hochschule Hannover mit dem
Thema:
„Einfluss von Interleukin-4 auf die Pulmonale Sensibilisierung“

Mai 2011 Ende der experimentellen Arbeiten und Fertigstellung der Promotionsarbeit
(Disputation: 06. Juli 2012)