

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Harald Renz

Des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

Titel der Dissertation:

**Immunmodulatorische Effekte von TLR3- und TLR7-
Liganden auf die Pathogenese des chronischen
Asthma bronchiale im Maus-Modell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Sarper Sel
aus Afsin, Türkei

Marburg 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

.....

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. H. Renz

1. Koreferent:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	IV
1 Einleitung	1
1.1 Grundlagen der Immunologie.....	1
1.2 Allergie	3
1.3 Immunologische Grundlagen der Allergie	3
1.4 Das Asthma Bronchiale.....	7
1.4.1 Epidemiologie	7
1.4.2 Ätiologie	8
1.4.3 Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale	10
1.4.4 <i>Airway remodelling</i>	11
1.4.5 Therapie.....	12
1.5 <i>Toll-Like</i> Rezeptoren	14
1.5.1 TLR3	18
1.5.2 TLR7	19
1.5.3 Rolle der <i>Toll-like</i> Rezeptoren in der Pathogenese allergischer Erkrankungen.....	20
2 Material und Methoden.....	24
2.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung.....	24
2.2 Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung	24
2.2.1 Sensibilisierung gegen das Protein Ovalbumin (OVA).....	24
2.2.2 Induktion einer lokalen allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge durch Inhalation von OVA-Aerosol.....	25
2.3 Versuchsprotokolle.....	26
2.3.1 Induktion einer akuten allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge und Immunmodulation durch intranasale (lokale) und intraperitoneale (systemische) Applikation von Poly (I:C).....	26
2.3.2 Induktion einer chronischen allergischen Entzündung in der Lunge und Immunmodulation durch TL3- und TLR7-Liganden.....	28
2.4 Messung der Atemwegsreagibilität	30
2.4.1 Aufbau der Messapparatur.....	30
2.4.2 Messablauf.....	32
2.5 Gewinnung von Probenmaterial	32

2.5.1	Gewinnung der Serumproben	32
2.5.2	Broncho-alveoläre Lavage (BAL)	33
2.6	Zellzählung	34
2.7	Differenzierung von Leukozytensubpopulationen in der BAL	34
2.8	<i>Enzyme Linked immuno Sorbent Assay</i> (ELISA)	34
2.8.1	Konzentrationsbestimmung von Immunglobulinen	35
2.8.2	Konzentrationsbestimmung von Zytokinen der BAL	36
2.9	Lungenhistologie	37
2.9.1	HE-Färbung	37
2.9.2	PAS-Färbung	38
2.10	Immunhistologie	38
2.11	Daten-Analyse und Statistik	39
3.	Ergebnisse	40
3.1	Die systemische Applikation von Poly (I:C) führt gegenüber der lokalen Applikation zu einer deutlicheren Verbesserung des akuten Asthma Phänotyps im Maus-Modell	40
3.1.1	Die systemische und lokale Applikation von Poly (I:C) inhibieren die Sensibilisierungsreaktion	41
3.1.2	Die IL-5-Konzentration in der BAL wird bei systemischer Applikation von Poly (I:C) stärker inhibiert als bei lokaler Anwendung	43
3.1.3	Die Entzündung der Atemwege wird durch Poly (I:C) Applikation verhindert	44
3.1.4	Die allergische Entzündung im Lungenparenchym und die Becherzellhyperplasie werden durch die systemische Poly (I:C) Behandlung unterdrückt	46
3.1.5	Die Lungenfunktion verbessert sich nur nach systemischer Applikation von Poly (I:C)	49
3.2	Einfluss von R-848 und Poly (I:C) auf die Entwicklung von chronischem Asthma Bronchiale im Maus-Modell	51
3.2.1	Die TLR3- oder TLR7-Aktivierung vermindert die Produktion von OVA-spezifischem IgE	52
3.2.2	Die TLR3/7-Liganden Applikationen inhibieren die Produktion von IL-5 und TGF- β und induzieren die Produktion von IL-12 in der Lunge.....	54
3.2.3	Verminderung der Anzahl an eosinophilen Granulozyten in der BAL durch die Aktivierung von TLR3 und 7	56
3.2.4	Die lokale Infiltration der Lunge wird durch R-848 oder Poly (I:C) vermindert	58

3.2.5	Die Atemwegsreagibilität verringert sich nach TLR3/7 Aktivierung im Atemfunktionstest.....	60
3.2.6	TLR3/7 Aktivierung inhibiert die Entwicklung eines <i>Airway remodelling</i> in den distalen Atemwegen	61
4.	Diskussion	64
4.1	Deutliche Verbesserung des akuten Asthma Phänotyps durch systemische Applikation von Poly (I:C) im Maus-Modell	65
4.2	Positiver Einfluss von R-848 und Poly (I:C) auf die Entwicklung von chronischem Asthma bronchiale im Maus-Modell	68
5.	Zusammenfassung	76
6.	Referenzen	78
7.	Verzeichnis der Veröffentlichungen.....	107
8.	Lebenslauf.....	111
9.	Verzeichnis der akademischen Lehrer	113
10.	Danksagung	114
11.	Ehrenwörtliche Erklärung	115

Abkürzungen

% v/v	Prozent auf das Volumen bezogen
AAR	<i>late allergic responses</i>
Abb.	Abbildung
AHR	Atemwegshyperreagibilität
AK	Antikörper
BAL	Broncho-alveoläre Lavage
BHR	Bronchiale Hyperreagibilität
BSA	bovines Serumalbumin
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige RNA
DZ	Dendritische Zellen
EAR	<i>early allergic responses</i>
EF ₅₀	halbmaximaler expiratorischer Atemfluss
Elisa	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
g	Gramm
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
i.n.	Intranasal
i.p.	Intraperitoneal
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
Mch	Metacholine
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MYD88	<i>myeloid differentiation protein 88</i>
NF κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
ng	Nanogramm

OVA	Ovalbumin
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PAS	Perjodsäure-Schiff
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pH	potentia hydrogenii
Poly (I:C)	Polyinosin:Polycytidyl-Säure
PRR	<i>pattern recognition</i> Rezeptoren
R-848	Resiquimod
RNA	Ribonukleinsäure
RSV	respiratorisches Syncitial Virus
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
ssRNA	einzelsträngige RNA
Tab.	Tabelle
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TH	T-Helfer (Zelle)
TIR	Toll/Interleukin-1-Rezeptor
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
ÜN	Über Nacht
x	mal
α -SMA	<i>alpha-smooth muscle actin</i>
μ g	mikrogramm
μ l	Mikroliter

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Immunologie

Die Immunologie ist die Wissenschaft über die Gesamtheit der Abwehrsysteme des Körpers gegen fremde Substanzen und Krankheitserreger wie z.B. Bakterien, Viren, Pilze, Helminthen, Parasiten, toxische Substanzen oder Allergene. Die entsprechende Reaktion des Körpers und die ablaufenden Prozesse gegen die eingedrungene Substanz werden vom Immunsystem gesteuert und rufen eine Immunantwort hervor. Am Ende dieses Prozesses steht die Elimination des Fremdartigens (Chaplin, 2006).

Die initiale Immunantwort wird durch das **angeborene Immunsystem** gewährleistet (Staros, 2005). Zu diesem zählen zum einen physikalische und mechanische Barrieren in Form von intakter Haut und Schleimhaut, zum anderen chemische Barrieren wie zum Beispiel antimikrobielle Peptide, Lysozyme und Magensäure. Außerdem werden eingedrungene Pathogene durch phagozytierende Zellen (Makrophagen, Neutrophile) oder Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) eliminiert.

Dabei erkennt das angeborene Immunsystem pathogene Strukturen anhand hochkonservierter Pathogen-assoziiertes Muster, der sogenannten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) (Akira et al., 2001), beispielsweise Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien. Diese PAMPs werden durch spezifische *pattern recognition* Rezeptoren (PRRs), wie die *Toll-Like* Rezeptoren (TLRs) (Kawai and Akira, 2007) erkannt.

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem, bei dem nur eine sehr limitierte Differenzierung zwischen verschiedenen Krankheitserregern erfolgt, löst die Aktivierung des **adaptiven Immunsystems** eine hochspezifisch gegen bestimmte Antigene gerichtete Immunantwort aus.

Das adaptive Immunsystem ist durch eine hohe Spezifität, Diversität, und Selbstlimitation definiert. Es bildet die späte Phase der Immunantwort bei der Abwehr eines Erstkontakts mit einem Antigen. Durch ein immunologisches Gedächtnis kann der Körper bei einem erneuten Kontakt gegen dasselbe Antigen eine schnellere und hochspezifische Immunantwort auslösen.

Man unterscheidet zwei Typen der adaptiven Immunantwort, die humorale sowie zell-vermittelte Immunität. Die **humorale Immunität** basiert auf der Produktion von Antikörpern durch B-Lymphozyten. Diese erkennen hochspezifisch (z.B. mikrobielle) Antigene und verhindern durch ihre Bindung an das Antigen deren Wechselwirkung mit zellulären Oberflächenstrukturen und somit die Infektion der Zellen. Durch ihre Bindung an Bakterien werden diese darüber hinaus von Phagozyten erkannt und zerstört.

Die **zell-vermittelten** Reaktionen basieren auf direkten Interaktionen zwischen T-Lymphozyten und Peptid-Antigenen von Fremd-Proteinen, die über membrangebundene Glykoproteine (*major histocompatibility complex* MHC) infizierter Zellen oder Phagozyten präsentiert werden.

Während zytotoxische T-Zellen infizierte Zellen direkt erkennen und abtöten, wirken T-Helfer-Zellen (TH-Zellen) unter anderem über die Aktivierung von Makrophagen beziehungsweise B-Lymphozyten. Eine wesentliche Rolle spielt hierbei die Produktion von regulatorisch wirkenden Zytokinen durch TH-Zellen (Abbas et al., 1996).

Das angeborene und adaptive Immunsystem stellen keine separat von einander getrennten Funktionseinheiten dar, sondern bilden ein komplexes Abwehrnetz, das miteinander unter ständiger Kommunikation und Interaktion steht und sich gegenseitig beeinflusst und ergänzt (Kabelitz and Medzhitov, 2007; Medzhitov and Janeway, 1997).

Die Reaktionen beider Immunsysteme unterliegen komplexen Kontroll-Mechanismen, die eine Unterscheidung zwischen „eigen“ und „fremd“ ermöglichen und so eine Abwehrreaktion gegen Bakterien, Viren oder Parasiten hervorrufen, während körpereigene Strukturen keine Immunantwort initiieren.

Die Dysfunktion dieses Systems kann einerseits zu einer gestörten Abwehrreaktion gegenüber Pathogenen führen, während eine gestörte Selbst-Toleranz Autoimmunkrankheiten beispielsweise Autoimmunthyreoiditis oder Typ I Diabetes hervorruft.

Andererseits muss das Immunsystem auch in der Lage sein, zwischen Antigenen pathogener Mikroben und normalerweise harmlosen Umweltantigenen zu unterscheiden. Ein solcher Diskriminierungsverlust liegt bei allergischen Erkrankungen vor.

1.2 Allergie

Allergische Erkrankungen stellen in den meisten industrialisierten Gesellschaften ein enormes Gesundheitsproblem dar. Allergische Erkrankungen wurden zwar bereits im Altertum (Ring, 1985) beschrieben, zum allgegenwärtigen Gesundheitsproblem wurde die stetig steigende Prävalenz allergischer Erkrankungen allerdings erst innerhalb der letzten Dekaden (Taylor et al., 1984; Varjonen et al., 1992).

So zählen allergische Erkrankungen, wie allergisches Asthma bronchiale, allergische Rhinokonjunktivitis („Heuschnupfen“) und atopische Dermatitis aktuell zu den häufigsten chronischen Erkrankungen (Foliaki et al., 2008; Grize et al., 2006; Schernhammer et al., 2008; Talay et al., 2008; Zar et al., 2007).

1.3 Immunologische Grundlagen der Allergie

Eine zentrale Rolle innerhalb der Immunpathogenese allergischer Erkrankungen spielen T-Lymphozyten, die durch die Expression des CD4-Moleküls auf der Zelloberfläche charakterisiert sind, die TH-Zellen. Anhand der von ihnen produzierten Zytokinmuster lassen sich drei verschiedene Subpopulationen, die sich wechselseitig negativ regulieren, unterscheiden (Romagnani, 2000).

TH1-Zellen werden durch die Produktion von Interleukin-2 (IL-2), Interferon- γ (IFN- γ) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) charakterisiert.

Demgegenüber produzieren **TH2-Zellen** hauptsächlich IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 und GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) (Mosmann et al., 1986; Seder and Paul, 1994).

Darüber hinaus existieren **TH3-Zellen**, die durch die Produktion von TGF- β (*transforming growth factor- β*), IL-4 und IL-10 definiert werden (Weiner, 2001).

Diese Zytokinmuster dienen nicht nur der Differenzierung zwischen TH1-, TH2-, und TH-3-Zellen, sondern determinieren auch ihre unterschiedlichen Effektorfunktionen. So sind sämtliche TH2-Zytokine an bestimmten Prozessen der allergischen Entzündung beteiligt.

Die Entstehung von TH2-polarisierten Subpopulationen spielt bei den Pathomechanismen allergischer Erkrankungen somit eine entscheidende Rolle.

Eine Schlüsselrolle bei der Entscheidung, ob sich ausgehend von einer gemeinsamen Vorläuferzelle (TH0-Zelle) TH1- oder TH2-polarisierte T-Zellen entwickeln, spielen Allergen-präsentierende Dendritische Zellen (DZ).

TH0-Zellen sind in der Lage, sowohl TH1- als auch TH2-Zytokine zu produzieren (Firestein et al., 1989).

In Anwesenheit hoher Allergendosen und der Zytokine IL-12, IL-18 und IFN- γ differenzieren sich TH0-Zellen zu TH1-Zellen (Hsieh et al., 1993).

Dem gegenüber entstehen TH2-Zellen unter dem Einfluss des Zytokins IL-4 in der Gegenwart niedriger Allergendosen (Schmitt et al., 1990).

Neben dieser initialen Entstehung von TH1- und TH2-Zellen, wirken die von ihnen produzierten Zytokine als autokrine Wachstumsfaktoren beziehungsweise reziproke Inhibitoren für den jeweils anderen Zelltyp.

So vermittelt das von TH2-Zellen produzierte IL-4 die weitere klonale Expansion dieser Zellen und limitiert die Proliferation von TH1-Zellen. Umgekehrt verstärkt das von TH1-Zellen produzierte IFN- γ deren Wachstum und inhibiert die Entwicklung von TH2-Zellen (Abb.1.1) (de Waal Malefyt, 1997; Gajewski and Fitch, 1988; Gajewski et al., 1988; Gajewski et al., 1989; Romagnani, 1995).

In den letzten beiden Dekaden sind insbesondere die immunologischen Zusammenhänge bei der allergischen Atemwegsentzündung bearbeitet worden. Ein wesentlicher Meilenstein zum besseren Verständnis war hierbei die Identifikation der zentralen Rolle von TH2-Zellen in der allergischen Entzündungsreaktion (Coyle and Tsuyuki, 1995).

Es konnte gezeigt werden, dass TH2-Zellen im Tiermodell tatsächlich in der Lage sind, die charakteristischen Symptome des Asthma bronchiale hervorzurufen.

Hierfür wurden antigenspezifische TH2-Zellen beziehungsweise TH1-Zellen *in vitro* generiert, in Empfänger-Mäuse transferiert und im Respirationstrakt mit inhalativen Allergenen aktiviert.

Dies führte beim TH2-Zelltransfer zu einer Atemwegseosinophilie, Mukus-Hypersekretion und Atemwegshyperreagibilität, während TH1-Zellen zu einer inflammatorischen Immunantwort ohne diese Asthma-Charakteristika führten (Herz et al., 2001; Uthoff et al., 2003).

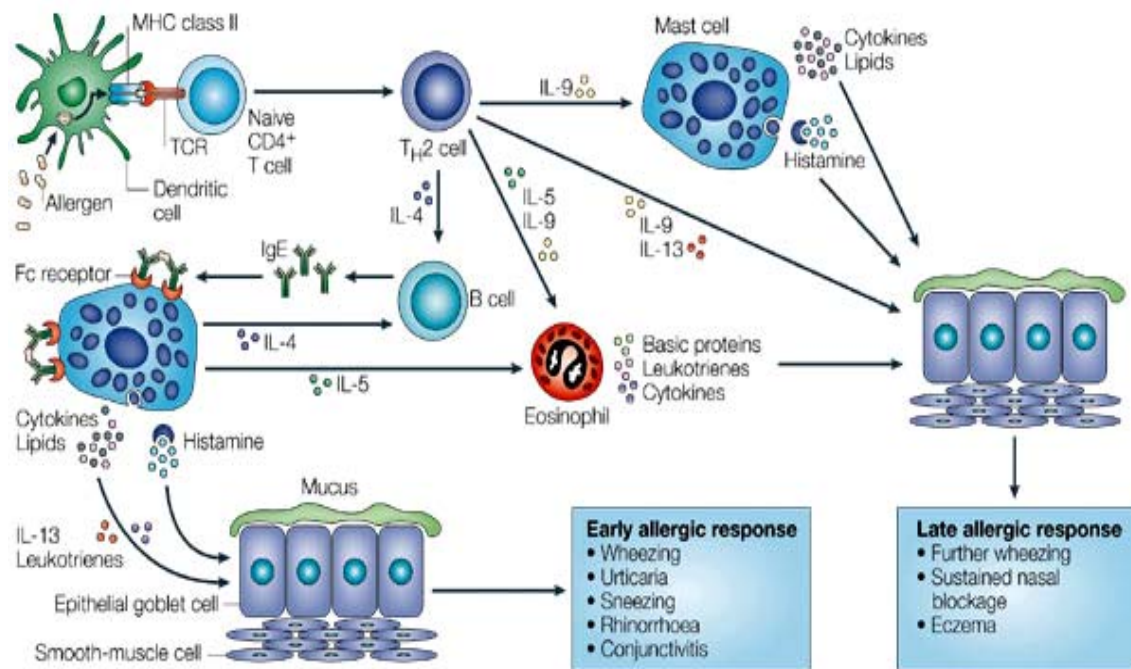


Abbildung 1.1: Mechanismen der allergischen Reaktion. Die Beschreibung der Abbildung erfolgt im Text. [modifiziert nach (Hawrylowicz and O'Garra, 2005)]

In Individuen mit einer allergischen Prädisposition führt der initiale Kontakt mit einem Allergen zur Aktivierung allergen-spezifischer TH2-Zellen und der Synthese von IgE. Dieser Vorgang wird als **allergische Sensibilisierung** bezeichnet.

Nachfolgende Allergen-Expositionen führen dann zur Rekrutierung und Aktivierung inflammatorischer Zellen und zur Ausschüttung von Entzündungsmediatoren. Die daraufhin ablaufenden pathophysiologischen Vorgänge werden in eine Frühphasereaktion (*early allergic responses /EARs*) sowie eine Spätphasereaktion (*late allergic responses /AARs*) eingeteilt.

In der EAR kommt es innerhalb von Minuten nach dem Allergenkontakt in Folge der Quervernetzung von allergen-spezifischem IgE auf der Zelloberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten zur Degranulation dieser Zellen. Die dadurch bedingte Mediatorausschüttung (Histamin, Leukotriene, Zytokine) führt zur Entwicklung der typischen Symptome einer Frühphasereaktion, wie einer verstärkten vaskulären Permeabilität, verstärkter Mukusproduktion und einer erhöhten Bronchokonstruktion.

Die von Mastzellen ausgeschütteten Chemokine sind für die Rekrutierung inflammatorischer Zellen, wie Eosinophile Granulozyten und TH2-Zellen verantwortlich, die wiederum die Reaktionen der LAR bedingen. Eosinophile Granulozyten schütten eine Vielzahl proinflammatorischer Mediatoren aus. Dazu zählen Zytokine (IL-3, IL-5, IL-13), Leukotriene und basische Proteine, wie das Eosinophile Kationische Protein (ECP), die Eosinophilen-Peroxidase (EPO), das Eosinophile Protein X (EPX) und das *Major Basic Protein* (MBP).

Grundlage der beschriebenen pathophysiologischen Veränderungen ist die Produktion von charakteristischen Zytokinen, wie IL-4, IL-5, IL-13 und IL-9 durch antigenspezifische TH2-Zellen.

Transgene Mäuse, die in den Atemwegsepithelien die TH2-Zytokine IL-4, IL-5, IL-13 bzw. IL-9 konstitutiv überexprimieren, zeigen typische allergische Entzündungsreaktionen, wobei die Funktionen der einzelnen Zytokine in der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale bisher nicht eindeutig geklärt ist (Fallon et al., 2001; Lukacs et al., 1997; Temann et al., 2002).

So zeigen Versuche mit neutralisierenden Antikörpern, rekombinanten Proteinen oder „Gene Knockout“ zur Blockierung einzelner Mediatoren widersprüchliche Effekte hinsichtlich der Atemwegshyperreagibilität, Eosinophilie, Mukus- und IgE-Produktion (Tab. 1.1).

Tabelle 1.1: Immun-Modulationsversuche in immunisierten Asthma-Maus-Modellen
(Modifiziert nach (Lloyd et al., 2001a))

Molekül	Behandlung	Effekt	Referenz
IL-4	Neutralisierende Ak	BHR ↓ Eosinophilie →	(Corry et al., 1996)
IL-5	Neutralisierende Ak	Eosinophilie ↓ BHR →	(Hamelmann et al., 1999)
IL-5	Gene-Knockout	Eosinophilie und BHR ↓	(Foster et al., 1996)
IL-13	Lösliche IL-13α 2- IgFc-Fusionsprotein	BHR, Mukus Produktion und Eosinophilie ↓	(Grunig et al., 1998)
IL-13	Rekombinantes Protein	BHR, Mukus Produktion, Eosinophilie und IgE ↑	(Wills-Karp et al., 1998)
IgE	Gene-Knockout	Eosinophilie und BHR →	(Lloyd et al., 2001b)
IgE	Nicht- Anaphylaktogene Ak	Eosinophilie, IL-4 und IL-5 Produktion ↓	(Coyle et al., 1996)

(BHR: Bronchiale Hyperreagibilität; Ak: Antikörper)

1.4 Das Asthma Bronchiale

Asthma bronchiale ist eine chronische Erkrankung, die charakterisiert ist durch eine reversible Atemwegsobstruktion, Atemwegsentszündung, persistierende Atemwegshyperreagibilität (AHR) und strukturelle Veränderungen an den Atemwegen im Sinne eines *Airway remodelling*.

1.4.1 Epidemiologie

Die Anzahl der an Asthma leidenden Menschen steigt weltweit immer weiter an. Vor allem in den industrialisierten beziehungsweise „Erste-Welt“ Ländern ist ein enormer Zuwachs zu verzeichnen, wobei etwa 5% aller Erwachsenen und 10% der Kinder an Asthma leiden (Anderson et al., 1983; Burney et al., 1990; Maziak et al., 2003). Bei Kindern ist Asthma damit die häufigste chronische Erkrankung.

Eine Vielzahl von internationalen epidemiologischen Studien wie ISAAC (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*) und ECHRS (*European Community Respiratory Health Survey*) zeigen, dass sowohl die Prävalenz als auch die Inzidenz des Asthma bronchiale und allergischer Erkrankungen in den letzten 20 – 30 Jahren in industrialisierten Ländern bei Kindern und Erwachsenen beträchtlich gestiegen sind und Asthma damit zu einer gesundheitsökonomisch hochrelevanten „Volkskrankheit“ herangewachsen ist (Smith, 1997), die etwa 1% aller Kosten des Gesundheitssystems verursacht (Rutten van-Molken and Feenstra, 2001).

1.4.2 Ätiologie

Die Ätiologie des Asthma bronchiale ist komplex, wobei sowohl genetische Faktoren als auch verschiedene Umwelteinflüsse, wie intra-uterine Einflüsse, Ernährung, bakterielle sowie virale Infektionen und Bestandteile der Umwelt eine Rolle spielen.

Der **genetische Hintergrund** des Asthma bronchiale ist multifaktoriell und folgt somit nicht den Mendelschen Gesetzen. Erste Hinweise auf eine genetische Komponente bei der Entstehung von Asthma lieferten epidemiologische Studien, die zeigten, dass Kinder von Allergikern signifikant häufiger allergische Reaktionen entwickelten als Kinder mit negativer Familienanamnese (Cookson et al., 1992; Parks et al., 1990).

Durch genetische Kopplungsanalysen ist es innerhalb der letzten Jahre gelungen, Kandidatengene zu identifizieren, die bei der Pathogenese von Allergien/Asthma von Bedeutung sind. Die Grundlage dieser Untersuchungen bilden genetische Polymorphismen, die sogenannten *single nucleotide polymorphisms* (SNPs). Diese entstehen durch die Substitution, Insertion oder Deletion einzelner Basepaare und sind für 90% der interindividuellen Variabilität verantwortlich (Salisbury et al., 2003).

Auf diese Weise konnten auf verschiedenen Genloci Kandidaten-Gene identifiziert werden, die potentiell mit einer Prädisposition für Asthma bronchiale einhergehen, beispielsweise 5q31-32 (Marsh et al., 1994; Postma et al., 1995), 6p21 (Nicolae et al., 2005), 11q13 (Adra et al., 1999), 12q (Raby et al., 2003) und 20p13 (Van Eerdewegh et al., 2002).

Innerhalb dieser Genregionen sind Gene lokalisiert, die bei der Regulation der Asthmapathogenese eine entscheidende Rolle spielen. Dazu zählen unter anderem Zytokine, die vorrangig von TH2-T-Zellen produziert werden (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13; Region 5q31-32) (Daniels et al., 1996; Heinzmann et al., 2000; Marsh et al., 1994), Tumor necrosis factor- α (TNF- α) (Region 6p21) (Randolph et al., 2005), Interferon- γ (IFN- γ , Region 12q) (Hayden et al., 1997; Nakao et al., 2001) und das *clara cell secretory protein* CC16 (11q13) (Mao et al., 1998).

Als erstes Gen, das sich als Marker für die Anfälligkeit einer Asthma-Entwicklung eignet, wurde ADAM33, eine Disintegrin and Metalloprotease (Holgate et al., 2004; Van Eerdewegh et al., 2002) identifiziert.

Neben genetischen Faktoren spielen **Umweltfaktoren** eine entscheidende Rolle bei der Ätiologie des Asthmas. Es ist lange bekannt, dass vor allem Kinder aus wohlhabenden, bildungsnahen Familien an Allergien beziehungsweise Asthma erkranken (Heinrich et al., 1998; Ring, 1997). Die Identifikation der zugrunde liegenden Faktoren ist hingegen bisher nur ansatzweise gelungen und Bestandteil weiterer epidemiologischer Studien.

Die Beobachtung, dass eine allergische Sensibilisierung und in geringerem Ausmaß auch Asthma bei Kindern mit älteren Geschwistern beziehungsweise bei Kindern, die in Kindertagesstätten betreut werden, seltener ist, führte zur Entwicklung der sogenannten „**Hygiene-Hypothese**“ (Ball et al., 2000; Strachan, 2000). Grundlage dieser Hypothese ist die Überlegung, dass eine geringere Infektionsrate eher zu einer Polarisation in Richtung TH2-Zellen als in Richtung TH1 Phänotyp führt und dass dies die Grundlage für ein höheres Risiko einer Allergie-Entwicklung darstellt.

Erklärungsversuche dieser Hypothese beinhalten die höhere Infektionsrate (Illi et al., 2001; Shirakawa et al., 1997), veränderte bakterielle Zusammensetzung der normalen Darmflora (Bjorksten et al., 2001) sowie die höhere Exposition mit bakteriellen Endotoxinen (von Mutius et al., 2000) in Populationen mit geringerem Allergierisiko. Diese Überlegungen würden auch die geringere Erkrankungsrate bei Kindern aus Familien mit landwirtschaftlichen Betrieben erklären (Riedler et al., 2001; Riedler et al., 2000).

In die gleiche Richtung weisen Überlegungen, das eine verminderte Inzidenz an parasitären Infektionen mit einem erhöhten Allergierisiko korrelieren. Für die Abwehr dieser Infektionen spielen, wie bei der Allergie-Pathogenese, IgE-Antikörper eine maßgebliche Rolle.

Darüber hinaus wurde eine Vielzahl weiterer Faktoren mit der Asthma-Entstehung in Verbindung gebracht. Dazu zählen beispielsweise eine zunehmende Umweltverschmutzung, Rauchen sowie die Dauer des Stillens.

1.4.3 Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale

Das Krankheitsbild des allergischen Asthma bronchiale ist komplex und zeigt bei Kindern sowie Erwachsenen ein breites Spektrum an klinischen Symptomen mit unterschiedlichen Ausprägungsgraden, die von leichten über mittelschwere Formen bis hin zu einer starken Minderung der Lebensqualität und letztlich zum Tod führen können, reichen.

Das Leitsymptom des Asthma bronchiale bildet eine anfallsweise auftretende Atemnot in Folge der Bronchialobstruktion unter dem Bild des expiratorischen Stridors aus. Dies ist mit einem pathologisch verlängerten Expirium verknüpft. Die Atemwegsobstruktion ist zum Teil spontan oder durch entsprechende Behandlung reversibel. Weitere klinische Symptome sind hauptsächlich ein „Enge-Gefühl“ in der Brust, expiratorische Stenose-Atmung, Giemen, Husten und zähes Sputum.

In Abhängigkeit von einer bestehenden allergischen Diathese wird zwischen allergischem (extrinsischem) und nicht-allergischen (intrinsischem) Asthma unterschieden. Im Gegensatz zum allergischen Asthma, bei dem die Produktion von IgE-Antikörpern gegen häufige Umwelt-Aero-Allergene, wie Pollen, Hausstaubmilbenkot, Schimmelpilzsporen und Tierhaare, die Grundlage für die Asthma-Entwicklung bildet, sind beim intrinsischen Asthma keine IgE-Antikörper nachweisbar (30-50% der Erwachsenen).

Beim allergischen Asthma verursacht die chronische Entzündung der Atemwege eine Atemwegshyperreagibilität gegenüber einer Vielzahl verschiedener Stimuli, beispielsweise Kälte, Nässe, Zigarettenrauch oder körperliche Anstrengung.

1.4.4 *Airway remodelling*

Das Asthma bronchiale kann bei chronischem und/oder schwerem Verlauf zu einer permanenten strukturellen Veränderung der Atemwegswand, dem *Airway remodelling*, führen. Das *Airway remodelling* ist entlang des gesamten Bronchialsystems und in allen Komponenten der Atemwegswand nachzuweisen (Jeffery, 2001).

Die Bedeutsamkeit des Atemwegsumbaus wurde bereits vor über 85 Jahren durch Huber and Koessler in ihrer Beschreibung des fatalen Asthma bronchiale (HUBER and KOESSLER, 1922) dargelegt.

Die hierbei beteiligten Entzündungs- und Umbauprozesse werden durch hoch komplexe Interaktionen zwischen vielen verschiedenen Zelltypen hervorgerufen. Neben den infiltrierenden Entzündungszellen (Jarman and Lamb, 2004) wie den Eosinophilen Granulozyten, den aktivierten TH-Zellen, Mastzellen und Makrophagen spielen auch Lungengewebszellen (Lungenepithelzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen) als Effektoren durch Freisetzung von verschiedenen Mediatoren, Zytokinen und Chemokinen eine wichtige Rolle (Panettieri, 2002).

Dadurch kommt es zunächst zu einer akuten Immunreaktion, welche durch vermehrte Schleimproduktion, Verlust des Flimmerepithels sowie Gefäßschädigungen charakterisiert ist (Homer and Elias, 2000; Vignola et al., 2000).

Die ständige Zerstörung des Atemwegsgewebes sowie dadurch induzierte Reparaturprozesse, die Persistenz des entzündlichen Infiltrats führen schließlich in der Atemwegswand zu strukturellen Veränderungen.

Dies sind eine zunehmende Verdickung der Basalmembran, fortschreitende Kollageneinlagerung, Hypertrophie und Hyperplasie der glatten Muskulatur und Veränderungen der Mikrozirkulation im Bronchialsystem (Aikawa et al., 1992; Homer and Elias, 2000; Wilson and Bamford, 2001).

Eine wichtige Rolle spielt hier die Sekretion von TGF- β durch Eosinophile Granulozyten, da TGF- β ein Schlüsselregulator bei der Produktion verschiedener Proteine der extrazellulären Matrix, wie von Kollagenen oder Proteoglykanen ist (Annes et al., 2003).

Letztendlich bewirkt die Verdickung der Atemwegswände eine persistierende Verengung der Atemwege, was eine andauernde Verminderung des Respirationsflusses bei gleicher Kraftanstrengung bewirkt und somit die Lungenfunktion entscheidend beeinträchtigt. Zusätzlich erhöht die gesteigerte Mukusproduktion durch die Verringerung der Oberflächenspannung der Lunge das Risiko eines Lungenkollapses.

1.4.5 Therapie

Das allergische Asthma ist, wie bereits erwähnt, definitionsgemäß eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege, die durch eine bronchiale Hyperreagibilität und Atemwegsobstruktion charakterisiert ist.

Bei betroffenen Patienten ist durch die anfallsweise auftretender Hustenattacken mit Dyspnoe die Lebensqualität deutlich reduziert. Die bisher verfügbare medikamentöse Asthmatherapie im klinischen Alltag zielt auf die Bekämpfung und Linderung dieser Symptome ab.

Die Behandlungsstrategien basieren dabei im Wesentlichen auf der Anwendung von Bronchodilatoren, in Form von Kurz- und Langzeitwirksamen β_2 -Sympathomimetika, wie Salbutamol oder Formoterol in Kombination mit Corticosteroiden.

Durch die Inhalation der kurzwirksamen β_2 -Sympathomimetika ist es möglich, während eines akuten Asthma-Anfalls die Atemnot durch Dilatation der glatten Muskulatur der Bronchien aufzuheben beziehungsweise zu reduzieren (Nelson, 1995). Eine optimale Therapieoption stellt diese Substanzklasse dennoch nicht dar, da sie ausschließlich die akute Symptomatik der Bronchokonstriktion positiv beeinflusst, aber keinerlei Einfluss auf die zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen hat.

Die Anwendung inhalativer Corticosteroide (ICS), wie Beclometason oder Budesonid unterdrückt effektiv zahlreiche inflammatorische Prozesse des Asthmas (Barnes, 1998), unter anderem die durch Reduktion der Zytokintranskription (Mori et al., 1997) und Inhibition des Überlebens von Eosinophilen Granulozyten (Wallen et al., 1991). Durch die Behandlung mit Corticosteroiden wird zudem die Becherzellhyperplasie sowie die unspezifische bronchiale Hyperreagibilität reduziert, so dass letztendlich die klinischen Symptome deutlich abgemildert werden. Somit stellen Corticosteroide momentan die *First-line* Therapie eines Asthma bronchiale dar.

Allerdings weisen Corticosteroide eine Reihe von Nebenwirkungen auf, die bei lokaler Therapie vor allem eine oropharyngeale Candidose und Heiserkeit sowie vorrangig bei systemischer Anwendung schwerwiegende Langzeit-Nebenwirkungen wie Wachstumsverzögerung, Osteoporose und Hautveränderungen und Kataraktbildung beinhalten können (Irwin and Richardson, 2006). Außerdem bewirken Corticosteroide keine „Heilung“ des Asthmas, da sie nicht in die zugrunde liegenden Mechanismen eingreifen, so dass circa 2 Wochen nach Absetzen dieser Medikamente die Symptome remittieren (Lazarus et al., 2001; Sovijarvi et al., 2003).

Aus diesem Grund sind neue innovative Ansätze dringend nötig, die möglichst selektiv und nebenwirkungsarm auf die immunologischen Ursachen dieser Erkrankung einwirken.

Momentan verfügbare Alternativ-Behandlungen stellen Leukotrien-Synthese-Inhibitoren und Rezeptorantagonisten (Dahlen, 2006) sowie Anti-IgE-Antikörper zur Verminderung der Entzündung und der Frequenz der Asthma Exazerbationen dar.

Diese werden zurzeit als Corticosteroid-sparende Therapiealternativen eingesetzt und bewirken wie diese ausschließlich eine Reduktion der Symptome und beeinflussen nicht die zugrunde liegenden Mechanismen.

Die zentrale Bedeutung der TH2-Zellen bei der Pathogenese des allergischen Asthmas weist diese als potentiell Target bei der Entwicklung neuer Behandlungsansätze aus. Während Strategien, die auf einer allgemeinen Suppression der T-Zell-Funktion basieren, erhebliche Risiken bergen, sind diese Nebenwirkungen bei der spezifischen Inhibition der TH2-Zellen nicht zu erwarten, da diese Zellen zwar eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr, vor allem bei der Abwehr von Darm-Parasiten, spielen, solche Infektionen in industrialisierten Ländern jedoch relativ selten auftreten.

So modulieren neuere Therapieansätze direkt TH2-vermittelte Immunfunktionen und die assoziierten Zytokin-Signalwege. Dazu zählen Strategien, deren Zielstrukturen direkt mit Th2-Zellen assoziiert sind, wie zum Beispiel: Costimulatorische Moleküle, Homing-Moleküle, Tyrosin-Kinasen oder Transkriptionsfaktoren (Edwards et al., 2009; Lewis, 2002; Suzaki et al., 2008; Wegmann, 2009; Wong, 2005). Demgegenüber stehen Konzepte, die sezernierte TH2-Zytokine oder Chemokine inhibieren, beziehungsweise intermediäre Signalwege modulieren (Lewis, 2002; Wegmann, 2009). Eine herausragende Stellung nehmen hierbei neuartige Strategien ein, die in Signalwege der so genannten *Toll-Like* Rezeptoren (TLR) eingreifen.

1.5 *Toll-Like* Rezeptoren

TLRs spielen eine zentrale Rolle innerhalb der angeborenen Immunität, in dem sie hochkonservierte pathogen-assoziierte Strukturen (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMPS) erkennen und Signale generieren, die zur Expression von Effektormolekülen, wie Zytokinen, Chemokinen und kostimulatorischen Molekülen führen. Diese wiederum aktivieren eine Antigen-spezifische adaptive Immunantwort.

Darüber hinaus können TLR-Signalwege modulierend in die ablaufende adaptive Immunantwort eingreifen (Akira et al., 2001).

Bisher wurden in der Maus 11 funktionale Toll-like-Rezeptoren identifiziert (Takeda et al., 2003; Zhang et al., 2004) (Abb. 1.2).

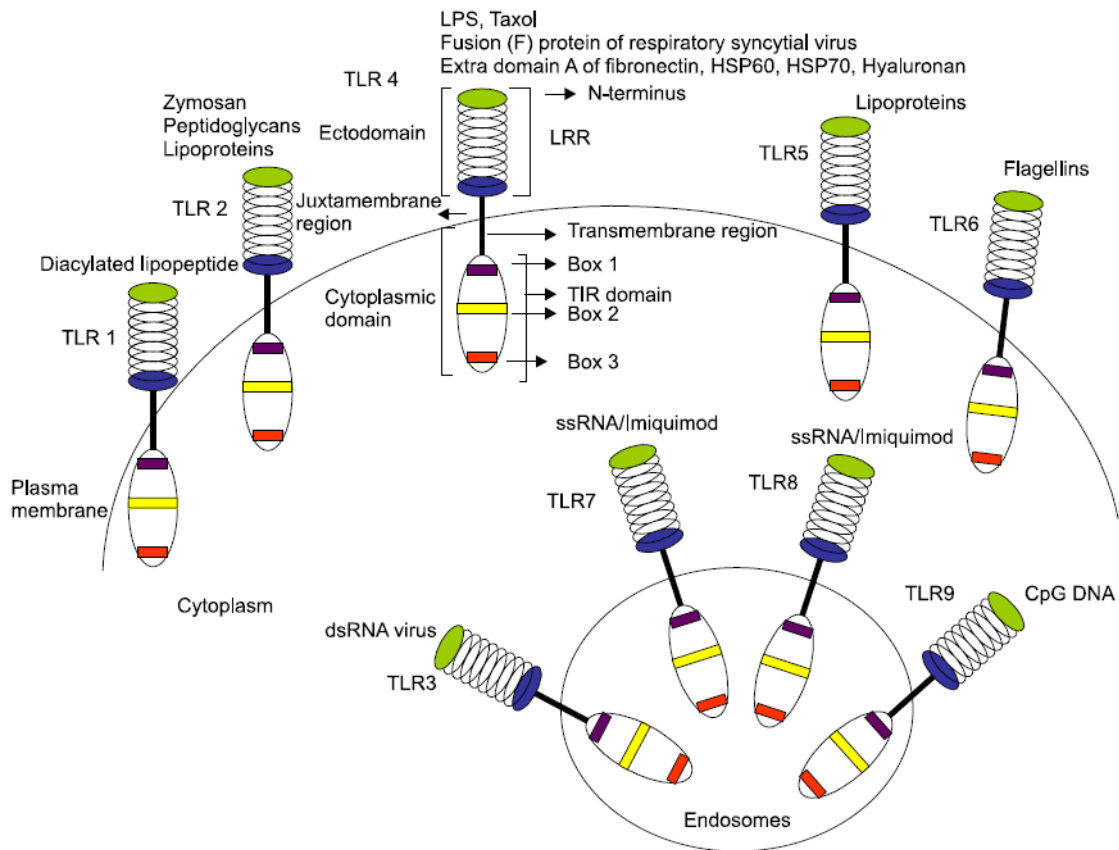


Abbildung 1.2: Lokalisation von TLRs in der Zelle. TLR1, 2, 4, 5 und 6 sind auf der Plasmamembran und TLR3, 7, 8 und 9 sind auf Membran der Endosomen lokalisiert. (modifiziert nach (Krishnan et al., 2007))

Bei den TLRs handelt es sich um integrale Membran-Glykoproteine, die auf Grundlage ihrer Homologie in der zytoplasmatischen Domäne zu Superfamilie der Toll/Interleukin-1-Rezeptoren (TIR) gehören.

Die TIR Domäne ist ungefähr 160 Aminosäuren lang und enthält drei Regionen, die sogenannten Boxen 1-3, mit besonderer Bedeutung innerhalb der Signaltransduktion (Yamamoto et al., 2004).

Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die extrazellulären Domänen von TLRs und IL-1Rs erheblich. Die extrazelluläre Domäne der TLRs enthält Leucinreiche Wiederholungen (leucin-rich repeats, LLR-Motive) (Kobe and Deisenhofer, 1995), während die extrazelluläre Region der IL-1Rs drei Immunglobulin-Domänen enthält.

Die Aktivierung der TLRs führt zur Initiation von **Signalkaskaden**, die in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B, IRF3/7/5 oder AP-1 münden. Die Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren bildet die Grundlage der Expression von inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen sowie costimulatorischer Moleküle, die in ruhenden Zellen nicht detektierbar sind.

Ausgangspunkt der Signaltransduktion über TLRs ist die Toll-Interleukin1-Rezeptor-ähnliche Domäne (TIR) des Rezeptors. Diese wiederum interagiert mit TIR-Domänen verschiedener Adaptermoleküle und führt damit zu deren Aktivierung. Prinzipiell können die TLR-vermittelten Signalwege in MYD88 („*myeloid differentiation protein 88*“)-abhängige und –unabhängige Signalwege (Takeda and Akira, 2004) unterteilt werden, wobei das Adapterprotein MyD88 als universelles Adaptor-Protein für alle TLRs mit Ausnahme von TLR3 fungiert (Fitzgerald et al., 2001).

Die Hauptwege der nachfolgenden Signaltransduktion verlaufen über die Aktivierung der I κ B Kinase (IKK), MAP-Kinasen sowie Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt (Kawai and Akira, 2007). Diese regulieren die Balance zwischen zellulärem Überleben und Entzündung.

Die Expression von TLRs wurde für zahlreiche Immunzellen (Muzio et al., 2000b) aber auch einer Vielzahl weiterer Zellen, wie Endothelzellen, Adipozyten, Myocyten und Epithelzellen nachgewiesen, wobei sie innerhalb der Zelle sowohl in der Zellmembran (TLR1, 2, 4, 5 und 6) als auch in der Membran von Endosomen (TLR3, 7, 8 und 9) lokalisiert sein können. Wie von Barton et al. gezeigt wurde (Barton et al., 2006), ist diese subzelluläre Lokalisation von entscheidender Bedeutung bei der Unterscheidung zwischen viralen Nukleinsäuren und zell-eigenen Nukleinsäuren.

Die Klassifikation der einzelnen TLR-Rezeptoren erfolgt über ihre Lokalisation, die rekrutierten Adapter-Proteine und die Liganden, die die TLRs aktivieren (Abb.1.2). Nachdem 1997 für TLR4 eine Aktivierung durch Lipopolysaccharid (LPS), einem Bestandteil gram-negativer Bakterien nachgewiesen wurde (Medzhitov et al., 1997), ist für eine große Bandbreite mikrobieller Bestandteile (PAMPs) eine Erkennung durch TLRs nachgewiesen worden, wobei einzelne TLRs durchaus verschiedene, strukturell nicht homologe, PAMPs erkennen können.

Obwohl der genaue Mechanismus der Liganden-Erkennung bisher nicht bekannt ist, scheint eine direkte Bindung der Liganden an den Rezeptor zu erfolgen, so dass diese als sogenannte *pattern recognition receptors* (PRRs) fungieren.

Beispielsweise wurde für den TLR4-Rezeptor neben LPS eine Aktivierung durch Lipoteichonsäure gram-positiver Bakterien oder durch das Fusions (F)-Protein des respiratorischen Syncytial Virus (RSV) nachgewiesen. Auch für TLR2 wurde eine große Bandbreite an Liganden identifiziert, beispielsweise das Peptidoglykan gram-positiver Bakterien, bakterielle Lipoproteine, Zellwandbestandteile von Mykobakterien, atypische Lipopolysaccharide von *Leptospira interrogans* und *Porphyromonas gingivitis* oder Zymosan (Hefe). Diese außerordentliche Bandbreite kann teilweise durch die Kooperation von TLR2 und mindestens zwei weiteren TLRs: TLR1 und TLR6 erklärt werden.

TLR3 erkennt doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA), die bei den meisten Viren an verschiedenen Punkten ihrer Replikation entsteht.

Neben einzelsträngiger RNA (ssRNA) als natürlichem Liganden (Diebold et al., 2004a), wurde eine Aktivierung von TLR7 auch für eine Gruppe kleiner synthetischer Komponenten der Imidazoquinolin-Familie, wie Imiquimod und R-848 (Jurk et al., 2002a) nachgewiesen.

Das bemerkenswerteste Beispiel für die Erkennung mikrobieller Strukturen ist die Aktivierung von TLR9 durch charakteristische unmethylierte Desoxyribonukleinsäure (DNA) -Abschnitte, die Cytosin-Guanosin-Dinukleotid-Motive (CpG-Motive) (Wagner, 2001).

Da bakterielle sowie virale DNA keine Methylierung an Cytosin-Resten aufweist, während die meisten CpG-Motive im Säuger-Genom methyliert sind, ermöglicht die Aktivierung von TLR9 durch unmethylierte CpG-Motive eine Erkennung und Reaktion auf bakterielle beziehungsweise virale Infektionen.

Des Weiteren ist eine Aktivierung von TLR9 auch durch synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die nicht methylierte CpG-Dinukleotide enthalten (*synthetic oligodeoxynucleotides*, ODNs) möglich.

1.5.1 TLR3

TLR3 erkennt doppelsträngige RNA (dsRNA), die als Intermediär-Produkt bei der Replikation von einzelsträngigen RNA (ssRNA)-Viren sowie DNA-Viren vorkommt (Matsumoto et al., 2004) und wurde im Menschen zunächst in mDCs (*myeloid dendritic cells*) und NK-Zellen (Natürliche Killer Zellen) identifiziert (Muzio et al., 2000a). Neuere Untersuchungen belegen allerdings eine breitgefächere Expression von TLR3 beispielsweise in Makrophagen (Jiang et al., 2005), bronchialen Muskelzellen (Niimi et al., 2007) oder pulmonalen Epithelzellen (Ritter et al., 2005a). Interessanterweise wird TLR3 in pulmonalen Epithelzellen auf der Zelloberfläche expremiert und nicht endosomal wie in allen anderen Zelltypen (Hewson et al., 2005).

Da dsRNA ein universelles virales PAMP darstellt, nimmt TLR3 eine Schlüsselstellung in der antiviralen Immunantwort ein. Dennoch gibt es Viren, bei denen TLR3 keine Rolle in der Immunantwort spielt, wie das murine Cytomegalivirus (MCMV), das vesikuläre Stomatitis Virus (VSV) oder Reoviren (Edelmann et al., 2004).

Im Kontrast dazu nutzt das West Nil Virus (WNV) [ein ssRNA Flavivirus, das eine letale Enzephalitis auslösen kann], die von TLR3 vermittelte Produktion des proinflammatorischen Zytokins TNF- α für eine erleichterte Passage der Blut-Hirn-Schranke, da erhöhte TNF- α - Spiegel die Funktion der Blut-Hirn-Schranke herabsetzen (Wang et al., 2004).

Die Aktivierung von TLR3 durch dsRNA resultiert in der Expression von Typ1-Interferonen (IFN- α , IFN- β), die sowohl antiviral als auch immunstimulatorisch wirken (Matsumoto and Seya, 2008).

Auch synthetische dsRNA-Analoga wie Polyinosin-Polycytidyl-Säure (Poly (I:C)) entfalten ihre immunstimulatorische Wirkung durch Bindung an TLR3-Rezeptoren (Takeuchi et al., 2004).

TLR3 hebt sich in seiner Struktur von den anderen TLRs ab. So ist ein Prolin-Rest, der in allen anderen TLRs konserviert ist, in TLR3 nicht vorhanden. Dies hat auch einen Einfluss auf die Signaltransduktion, die bei TLR3, entgegen den anderen TLRs, nicht MyD88-abhängig ist (Takeda and Akira, 2004).

1.5.2 TLR7

TLR7 wurde initial als Rezeptor für Imidazoquinoline, eine Gruppe synthetischer, antiviraler Wirkstoff, wie Resiquimod (R-848) oder Imiquimod, beschrieben (Hemmi et al., 2002; Jurk et al., 2002b).

Später zeigte sich, dass auch einzelsträngige (ss) Guanodin- und /oder Uridinreiche RNA-Abschnitte von ssRNA-Viren wie Influenza oder HIV von TLR7 erkannt werden (Diebold et al., 2004b; Heil et al., 2004; Lund et al., 2004).

Die Tatsache, dass ssRNA auch physiologisch in menschlichen Zellen vorkommt, normalerweise aber nicht von TLR7 erkannt wird, kann durch die Lokalisation von Nukleinsäure-erkennenden TLRs (TLR3, TLR7/8, TLR9) erklärt werden. Diese sind endosomal lokalisiert, also in einem Kompartiment, in das „körpereigene“ ssRNA nicht gelangt.

TLR8 zeigt sowohl strukturell -die Gene beider Rezeptoren liegen auf dem X-Chromosom (Du et al., 2000) und sind homolog (Chuang and Ulevitch, 2000)- als auch funktionell eine hohe Übereinstimmung zu TLR7. Dementsprechend erkennt auch der humane TLR8 Imidazoquinoline und ssRNA. Im Gegensatz dazu kann der murine TLR8 durch diese Liganden nicht aktiviert werden und ist somit in der Maus vermutlich inaktiv (Forsbach et al., 2008).

TLR7 wird im Menschen hauptsächlich in B-Zellen (Shen et al., 2008) und pDCs (*plasmacytoid dendritic cell*) (Edwards et al., 2003), aber auch neutrophilen Granulozyten (Hattermann et al., 2007b) Eosinophilen Granulozyten (Nagase et al., 2003) und Makrophagen expremiert.

1.5.3 Rolle der *Toll-like* Rezeptoren in der Pathogenese allergischer Erkrankungen

Ganz allgemein resultiert die TLR-vermittelte Aktivierung von Immunzellen in der Produktion von Interferon- α , proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1 und IL-6 aber auch regulatorischer Zytokine wie IL-12 und IL-18, die wiederum eine TH1-Differenzierung fördern. Diese deutliche TH1-induzierende Aktivität von TLRs hat diese in den Fokus zur Behandlung TH2-vermittelter allergischer Erkrankungen gerückt.

Basierend auf dem Konzept der „Hygiene-Hypothese“ (siehe oben) führt die allgemeine Reduktion der mikrobiellen Exposition und damit geringere Aktivierung der TLRs zu einer abgeschwächten TH1-Antwort bei gleichzeitiger unbeschränkter TH2-Antwort, was die Entstehung von Allergien fördert.

Epidemiologische Studien haben TLR4 als eine Komponente der Allergie-Entstehung identifiziert. So wurde eine inverse Korrelation zwischen der LPS-Exposition, also dem TLR4-Liganden, und der Atopie-Rate in Bauernfamilien nachgewiesen (Braun-Fahrländer et al., 2002). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Polymorphismen von CD14, einem Korezeptor für LPS, den Schweregrad der Allergie beeinflussen (Koppelman et al., 2001).

Auch für TLR2 wurde eine solche Modulation der Allergie-Entwicklung nachgewiesen. So weisen Kinder von Bauern, die ein erniedrigtes Allergierisiko haben, erhöhte TLR2 mRNA Spiegel auf (Lauener et al., 2002). Weiterhin wurden Polymorphismen im TLR2-Gen als wichtiger Faktor bei der Anfälligkeit für allergische Erkrankungen (Eder et al., 2004) und dem Schweregrad der Erkrankung (Ahmad-Nejad et al., 2004) identifiziert.

Obwohl der Einfluss anderer TLRs in dieser Hinsicht kaum untersucht wurde, gibt es zahlreiche Strategien, bei denen TLRs den Angriffspunkt in der Intervention sowie Behandlung allergischer Erkrankungen bilden.

Da eine TLR9-Aktivierung durch synthetische Oligodeoxynukleotide mit CpG-Motiven (CpGs) eine ausgeprägte TH1-gerichtete Zytokin-Produktion induziert, die den allergischen Phänotyp unterdrückt, waren CpGs die erste Substanzgruppe, deren therapeutischer Einsatz in Tiermodellen für Allergien getestet wurde. Hier konnte gezeigt werden, dass die therapeutische Anwendung von CpGs in Maus-Modellen für allergische Erkrankungen, in einer deutlichen Besserung der Hypersensitivitätssymptome bei allergischem Asthma, allergischer Konjunktivitis und allergischer Rhinitis führen (Horner et al., 2001; Nguyen et al., 2001).

Dabei konnte sowohl die Etablierung einer allergischen Reaktion (im Rahmen einer Ko-Administration während der OVA-Sensibilisierung) verhindert (Agrawal et al., 2004) als auch eine bestehende Symptomatik deutlich gebessert (Zhu et al., 2004) werden.

Klinische Studien, die einen therapeutischen Einsatz am Menschen untersuchen, wurden bereits initiiert (Horner, 2006). Darüber hinaus existieren erfolgversprechende präklinische und klinische Studien, die den Einsatz von CpGs als Adjuvantien in Kombination mit Protein-, Peptid- oder DNA-Vaccinen untersuchen (Heeg et al., 2008; Johansson and Hellman, 2007).

Neben den zahlreichen Untersuchungen hinsichtlich einer Anwendung von TLR9-Agonisten ist auch der Einsatz von TLR7- und TLR8-Liganden, wie Resiquimod (R-848), durch ihre starke Induktion von Th1-Zytokinen in den Fokus der Allergie-Behandlung gerückt (Vasilakos et al., 2000b).

Initiale Untersuchungen zeigten, dass die Applikation von R-848 im Maus-Modell eine Allergen-induzierte Atemwegsentzündung und Hyperreaktivität durch Modulation der TH2-Immunantwort inhibiert (Quarcoo et al., 2004). Ein derartiger Shift von TH2-polarsierten T-Zellen in Richtung TH1 wurde auch durch *in vitro* Versuche mit humanen T-Helfer-Zellen nachgewiesen (Brugnolo et al., 2003).

Somit stellen insbesondere TLR-Liganden für Nukleinsäuren (TLR3, TLR7, TLR9) vielversprechende neue Targets bei der Behandlung allergischer Erkrankungen dar.

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Innerhalb dieser Arbeit soll der Einfluss des TLR3-Liganden Poly (I:C) sowie des TLR7-Liganden R-848 auf die Pathophysiologie des chronischen allergischen Asthma bronchiale am Maus-Modell untersucht werden.

Dabei sollte zunächst die optimale Applikationsroute für Poly (I:C) im Maus-Modell für akutes Asthma bronchiale ermittelt werden.

Dafür erfolgten Vergleichsuntersuchungen im akuten Maus-Modell für Asthma bronchiale. Entsprechend einem standardisierten Protokoll wurden die Tiere nach erfolgter Sensibilisierung und Exposition gegen Ovalbumin (OVA) mit Poly (I:C) behandelt. Dabei wurde die intranasale, also lokale, Applikation, einer systemischen Applikation durch intraperitoneale Injektion von Poly (I:C) gegenübergestellt.

Anschließend wurden Parameter bestimmt, die ein akutes allergisches Asthma charakterisieren und der Einfluss von Poly (I:C) auf diese Parameter ermittelt.

Im Einzelnen sollten folgenden Aspekte des akuten allergischen Asthma untersucht werden:

- Konzentration von OVA-spezifischen Immunglobulinen im Serum
- Konzentration von IL-4, IL-5 und IFN- γ in der Broncho-alveolären Lavage (BAL)
- Entzündliche Infiltration der Lunge
- Becherzellhyperplasie der Lunge
- Lungenfunktion

Diese Untersuchungen zeigten, dass die systemische Applikation mittels intraperitonealer Injektion von Poly (I:C) sowohl einen positiven Einfluss auf einzelne Parameter der akuten allergischen Entzündung in der Lunge (Abnahme des OVA-spezifischen IgE im Serum, Abnahme der IL-5-Konzentration in der BAL, Verminderung der eosinophilen Granulozyten in der BAL, Verhinderung der Becherzellhyperplasie) hat, als auch die Lungenfunktion der systemisch behandelten Tiere deutlich verbessert wird.

Dies führte zu der Entscheidung in den weiterführenden Untersuchungen Poly (I:C) und R-848 systemisch zu applizieren.

Anhand eines Maus-Modells für chronisches allergisches Asthma bronchiale sollte im zweiten Teil dieser Arbeit der Einfluss dieser TLR-Liganden auf die Ausprägung folgender Charakteristika untersucht werden:

- Konzentration von OVA-spezifischen Immunglobulinen im Serum
- Konzentration von IL-5 und IL-12 und TGF- β in der BAL
- Entzündliche Infiltration der Lunge
- Becherzellhyperplasie der Lunge
- Lungenfunktion
- *Airway remodelling*

Insgesamt sollte in diesen Untersuchungen ermittelt werden, ob Poly (I:C) beziehungsweise R-848 einen positiven Einfluss auf die Ausprägung diese Parameter haben und sie sich somit als potentielle Therapeutika für die Asthma-Behandlung im Menschen eignen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Zur Durchführung der Tierexperimente wurden 6 bis 8 Wochen alte weibliche BALB/c Mäuse von Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Die Tiere hatten ein Gewicht von 18 bis 22 Gramm. Unter Standardbedingungen wurden jeweils vier Tiere pro Käfig bei keimarmen Bedingungen in gleichmäßig belüfteten Käfigsystemen bei konstanter Raumtemperatur von 20°C gehalten. Die Tiere bekamen Ovalbumin-freies Wasser und Futter ad libitum. Im Tierraum wurde ein künstlicher Lichtrhythmus von je 12 Stunden Hell/Dunkel erzeugt.

2.2 Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung

Grundlage der hier durchgeführten *in vivo* Studien ist ein Tiermodell für experimentelles Asthma bronchiale in der BALB/c-Maus. Dieses Standardmodell, wurde in unserer Arbeitsgruppe etabliert (Herz et al., 1998; Herz et al., 1996a; Herz et al., 1996b) und basiert auf der Sensibilisierung der Mäuse gegen Ovalbumin mit anschließender Induktion einer akuten allergischen Entzündungsreaktion der Lunge.

2.2.1 Sensibilisierung gegen das Protein Ovalbumin (OVA)

Prinzip:

Um die immunmodulatorische Wirkung von Poly (I:C), einem synthetischen Liganden des *Toll-Like* Rezeptors 3 (TLR3), auf das akute Asthma in BALB/c Mäusen zu untersuchen, wurde mit dem oben beschriebenen murinen Maus-Modell für Allergie und akutes Asthma gearbeitet.

Um eine lokale Entzündung in der Lunge zu etablieren, ist die Sensibilisierung gegen ein artfremdes Protein Grundvoraussetzung. Die Sensibilisierung der Tiere gegen das Protein Ovalbumin (OVA) wurde durch die intraperitoneale systemische Applikation von OVA-adsorbiert an ein Adjuvans- erreicht. Dies führte in den Mäusen zur Ausbildung einer TH2-vermittelten Immunantwort mit Entwicklung eines charakteristischen Phänotyps, der mit dem des humanen allergischen Asthma vergleichbar ist.

Für den Nachweis einer Sensibilisierungsreaktion wurden im Serum OVA-sensibilisierter Tiere OVA-spezifische Immunglobuline mittels Elisa-Technik bestimmt (siehe 2.8.1).

Material:

- | | |
|--------------------------------------------|------------------------------------|
| 1. BALB/c Mäuse, w, 6-8 Wochen alt, 18-22g | Harlan Winkelmann, Borcheln, D |
| 2. Sensibilisierungslösung bestehen aus: | |
| Ovalbumin | OVA Grade VI, Sigma, Steinheim, D |
| Aluminiumhydroxyd (Al(OH) ₃) | Inject Alum, Pierce, USA |
| Gelöst in PBS | PAA Laboratories, Linz, Österreich |
| 3. 1ml Spritzen (BD Plastipak) | Beckton Dickinson, Heidelberg, D |
| 4. Kanülen (Microlance3 24G 0,55x25) | Beckton Dickinson, Heidelberg, D |

Durchführung:

Die Tiere wurden systemisch durch drei intraperitoneale (i.p.) Injektionen des artfremden Proteins Ovalbumin (OVA) sensibilisiert. Dafür wurden 10 µg OVA in 100µl PBS (*phosphate buffered saline*) gelöst und mit 100 µl Aluminiumhydroxyd (Inject Alum, Pierce, San Diego, USA) als Adjuvans versetzt. Diese Lösung wurde steril mit 1ml Spritzen und dünnen Subkutankanülen an den Tagen 1, 14, 21 des Versuchprotokolls appliziert. Dabei wurde den zu sensibilisierenden Tieren pro Tier jeweils 200µl der Sensibilisierungslösung injiziert. Die Tiere der PBS-Negativ-Kontrollgruppe wurden ausschließlich mit PBS behandelt.

2.2.2 Induktion einer lokalen allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge durch Inhalation von OVA-Aerosol

Prinzip:

Zur Etablierung einer lokalen allergenspezifischen Entzündungsreaktion und Generierung bronchialer Hyperreagibilität in den Atemwegen wurden die Tiere einem OVA-Aerosol exponiert. Dadurch kommt es zu einem Antigenkontakt in der Lunge, der eine lokale Entzündungsreaktion in den Atemwegen der Tiere initiiert.

Das Aerosol wurde hierbei von einem Generator (PARI® Master, Pari, Starnberg, D) und dem dazugehörigen Nebulisator (PARI® Boy, Pari, Starnberg, D) gebildet, so dass lungengängige Tröpfchen der Größe 1-2µm entstanden. Die Nebulisation fand unter der Sterilbank statt.

Material:

- | | |
|------------------------------------------------------|----------------------------|
| 1. OVA-Lösung (1% OVA Grad V in PBS) | Sigma, Steinheim, D |
| 2. PBS-Puffer (Dublecco`s Phosphate Buffered Saline) | PAA Laboratories, Linz, AU |
| 3. Kompressor (PARI® Master) | Pari, Starnberg, D |
| 4. Nebulisator (PARI® Boy) | Pari, Starnberg, D |
| 5. Plexiglaskasten 22x23x14 cm | Spezialanfertigung |

Durchführung:

Maximal 12 Tiere einer Gruppe wurden in speziellen luftdichten Acrylglas-Expositionskammern an den jeweiligen Protokollzeitpunkten (siehe unten) für 20 Minuten dem OVA-Aerosol (1% OVA gelöst in PBS) ausgesetzt.

Die Analyse der Tiere fand jeweils 24 Stunden nach der letzten OVA-Aerosol Exposition statt.

2.3 Versuchsprotokolle

Im Weiteren sind die zeitlichen Abläufe der durchgeführten Tierexperimente ausführlich dargestellt. Wobei bei allen *in vivo* Studien das Standardmodell für das experimentelle Asthma in der BALB/c-Maus als Grundlage diente. Für die verschiedenen Fragestellungen in dieser Arbeit wurden dabei zwei Varianten angewandt.

Zum einem wurde anhand des Maus-Modells für akutes allergisches Asthma beispielhaft für Poly (I:C) untersucht, welchen Einfluss die lokale im Vergleich zur systemische Applikation, auf den bereits etablierten Asthma-Phänotypen hat. Im zweiten Teil dieser Arbeit, wurde dann der Einfluss der TLR3 [Poly (I:C)] und TLR7 [R-848] -Liganden im Modell für chronisches Asthma bronchiale untersucht.

2.3.1 Induktion einer akuten allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge und Immunmodulation durch intranasale (lokale) und intraperitoneale (systemische) Applikation von Poly (I:C)

Zur Untersuchung der Fragestellung, welchen Einfluss der TLR3-Ligand Poly (I:C) auf die akute allergische Entzündungsreaktion beim Asthma bronchiale ausübt, wurden die Versuchstiere zunächst, wie oben beschrieben, gegen OVA sensibilisiert und die Entzündungsreaktion der Lunge durch OVA-Aerosol induziert.

Im Weiteren sollte untersucht werden, inwiefern die Applikationsform des TLR-Liganden einen Einfluss auf die erzielten Effekte ausübt. Dafür wurde Poly (I:C) zum einen intranasal, also lokal, zum anderen systemisch durch intraperitoneale Injektionen appliziert (Tab. 2.1).

Tabelle 2.1: Übersicht der einzelnen Gruppen und der jeweiligen Verfahrensweise.

Gruppen	BALB/c Anzahl	i.p. Sensibilisierung	Aerosol (1% OVA in PBS)	Immunmodulation
1. PBS-Negativ-Kontrollgruppe	8	PBS	OVA	-
2. OVA-Positiv-Kontrollgruppe	8	OVA	OVA	-
3. Poly (I:C)-Behandlungsgruppe i.p.	8	OVA	OVA	Poly (I:C) i.p.
4. Poly (I:C)-Behandlungsgruppe i.n.	8	OVA	OVA	Poly (I:C) i.n.

Durchführung

Die Sensibilisierung gegen Ovalbumin wurde bei der OVA-Positiv-Kontrollgruppe und den beiden Poly (I:C) Behandlungsgruppen durch drei intraperitoneale (i.p.) OVA-Injektionen (10 µg OVA / 100µl PBS + 100µl Al(OH)₃) an den Tagen 0, 14 und 21 des Versuchsprotokolls induziert (Abb.2.1). Den Tieren der PBS-Negativ-Kontrollgruppe wurde stattdessen PBS verabreicht. Zur Induktion der Immunreaktion in der Lunge wurden die Tiere aller vier Gruppen an den Tagen 26-29 täglich für 20 Minuten in einer luftdichten Expositionskammer einer 1%igen OVA-Lösung ausgesetzt. In der Behandlungsphase wurden die Tiere an den Tagen 46 und 47 erneut einer OVA-Exposition ausgesetzt.

Die systemische intraperitoneale (i.p.) Poly (I:C) Applikation [200 µg Poly (I:C) in 200 µl PBS] sowie die lokale intranasale (i.n.) Applikation von Poly (I:C) [200 µg Poly (I:C) in 20 µl PBS] erfolgte an den Tagen 40, 42, 44, 46 und 47 des Versuchsprotokolls.

Die Analyse erfolgte 24 Stunden nach der letzten OVA-Aerosol Behandlung am Tag 48.

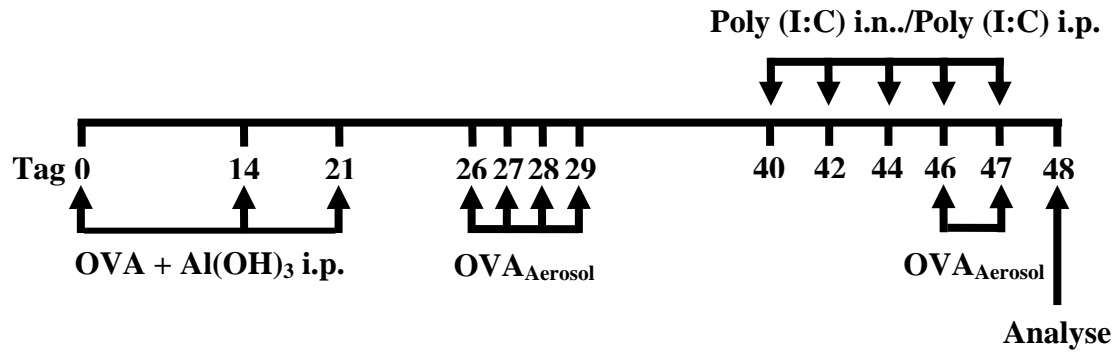


Abbildung 2.1: Protokoll zur allergischen Sensibilisierung, Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung und Immunmodulation der sekundären Immunantwort durch TLR3-Aktivierung.

2.3.2 Induktion einer chronischen allergischen Entzündung in der Lunge und Immunmodulation durch TLR3- und TLR7-Liganden

Die bisher beschriebenen Tiermodelle reflektieren den akuten Phänotyp des humanen Asthma bronchiale, da hier ausschließlich eine akute Entzündungsreaktion der Lunge induziert wird. Ein wichtiges Charakteristikum des humanen Asthma bronchiale ist darüberhinaus der chronisch entzündliche Verlauf mit fortwährendem Allergenkontakt, der letztendlich in strukturellen Veränderungen der Lunge, dem *Airway remodelling* mündet.

Deshalb wurden die folgenden Analysen mit Hilfe eines erweiterten Tiermodells durchgeführt, bei dem die Antigenexposition in den Luftwegen über einen Zeitraum von 8 Wochen einen Phänotyp induziert, der dem des humanen chronischen Asthma bronchiale vergleichbar ist.

Tabelle 2.2: Übersicht der einzelnen Gruppen und der jeweiligen Verfahrensweise.

Gruppen	BALB/c Anzahl	i.p. Sensibilisierung	Aerosol (1% OVA in PBS)	Immunmodulation
1. PBS-Negativ-Kontrollgruppe	8	PBS	OVA	-
2. OVA-Positiv-Kontrollgruppe	8	OVA	OVA	-
3. Poly (I:C)-Behandlungsgruppe i.p.	8	OVA	OVA	Poly (I:C) i.p.
4. R-848-Behandlungsgruppe i.p.	8	OVA	OVA	R-848 i.p.

Anhand dieses Modells wurde dann der Einfluss der TLR3 [Poly (I:C)-] und TLR7 [R-848] -Liganden auf die Etablierung der chronischen Entzündung untersucht (Tab. 2.2).

Durchführung

BALB/c Mäuse wurden durch drei intraperitoneale Injektionen von Ovalbumin (10 µg OVA / 100µl PBS + 100µl Al(OH)₃) an den Tagen 0, 14 und 21, wobei den Tieren der PBS-Negativ-Kontrollgruppe stattdessen PBS appliziert wurde. Anschließend wurden die Tiere aus allen vier Gruppen an jeweils zwei aufeinander folgenden Tagen pro Woche für 20 Minuten in einer luftdichten Expositionskammer einer 1%igen OVA-Lösung ausgesetzt. Diese Behandlung wurde über einen Zeitraum von 8 Wochen durchgeführt (Abb. 2.2).

Für die Immunmodulation wurde den Mäusen 24 Stunden vor der ersten OVA-Exposition sowie jeweils 30 Minuten vor den folgenden Expositionen intraperitoneal Poly (I:C) (200 µg) Poly (I:C) in 200 µl PBS) beziehungsweise R-848 (50 µg R-848 in 100 µl PBS) appliziert.

Die Analyse erfolgte in Abhängigkeit der zu untersuchenden Parameter am Tag 48 beziehungsweise 24 Stunden nach der letzten OVA-Aerosol Behandlung am Tag 75.

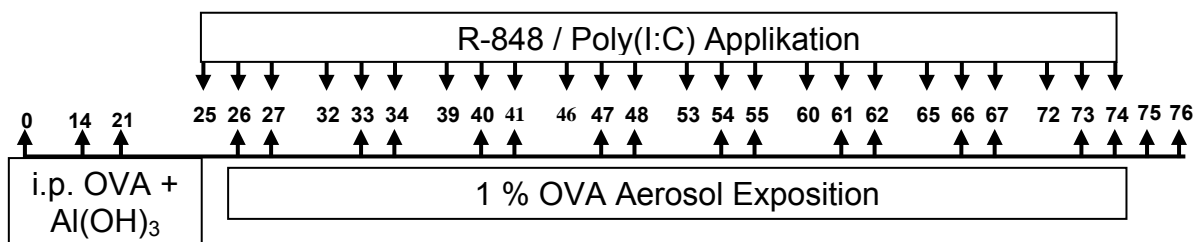


Abbildung 2.2: Protokoll zur allergischen Sensibilisierung, Induktion einer chronischen allergischen Atemwegsentzündung und Immunmodulation durch TLR3 und TLR7-Aktivierung.

2.4 Messung der Atemwegsreagibilität

Mit Hilfe der so genannten Head-out Body-Plethysmographie ist es möglich, synchron verschiedene Parameter zu bestimmen, die Rückschlüsse auf die Lungenfunktion erlauben. An spontan atmenden, nicht-anästhesierten Tieren werden neben dem halbmaximalen expiratorischen bzw. inspiratorischen Atemfluss auch das Atemzugvolumen, die Expirations- bzw. Inspirationszeit, sowie die Atemfrequenz bestimmt.

Grundlage der Messung sind die atmungsbedingten Druckveränderungen, die durch einen Pneumotachographen ermittelt werden, und bei dem sowohl expiratorischer als auch inspiratorischer Atemfluss berechnet werden können.

Durch die Zugabe des Acetylcholin-Derivats Metacholin (MCh) wird die Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur induziert. Dies bedingt die Erhöhung des Atemwegswiderstands, was wiederum zu einer Verringerung des halbmaximalen expiratorischen Atemflusses (EF_{50}), das heißt des Atemflusses in der Mitte der Expirationsphase, führt. Letztlich wird die MCh-Konzentration ermittelt, bei der es zu einer 50%igen Reduktion des Ausgangswerts des halbmaximalen expiratorischen Atemflusses kommt (MCh_{50}).

2.4.1 Aufbau der Messapparatur

Die Basis der Messapparatur bildet eine 2,5 Liter fassende Glas-Expositions-kammer (Forschungswerkstätten, Medizinische Hochschule Hannover, D), die über einen Eingang belüftet, sowie mit Aerosolen versorgt werden kann. Durch eine Membran-Vakuum-Pumpe wird die Abluft mit einem Sog von 14l/min über einen Ausgang kontinuierlich abgesaugt.

In die Expositions-kammer sind vier Head-out Body-Plethysmographen eingefügt, so dass 4 Mäuse parallel gemessen werden können.

Die Mäuse werden derart in die Messapparatur eingebracht, dass ihre Köpfe in die Expositions-kammer hineinragen, während sich der Rumpf im jeweiligen Plethysmographen befindet. Die luftdichte Abtrennung der Expositions-kammer zum Plethysmographen erfolgt durch eine individuell angefertigte, luftdicht abschließende Halskrause. Diese Latex-Kofferdam-Manschette (9mm ID, Roeko, Langenau, D) besitzt mittig ein kreisrundes Loch für den Durchtritt des

Mäusekopfes und wird mit Gewebefband an der vorderen Öffnung des Plethysmographen befestigt.

Im Plethysmographen wird die Luft durch die Atembewegung des Brustkorbes komprimiert beziehungsweise gedehnt. Der entstehende Luftstrom am Ableitungsrohr der einzelnen Plethysmographen wird durch einen Pneumotachographen (PTM 378/1.2, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, D) gemessen (Abb. 2.3). Hierbei entsprechen die Fluktuationen am Pneumotachographen den Druckunterschieden in der Kammer und sind somit direkt proportional zu Atemstromstärke.

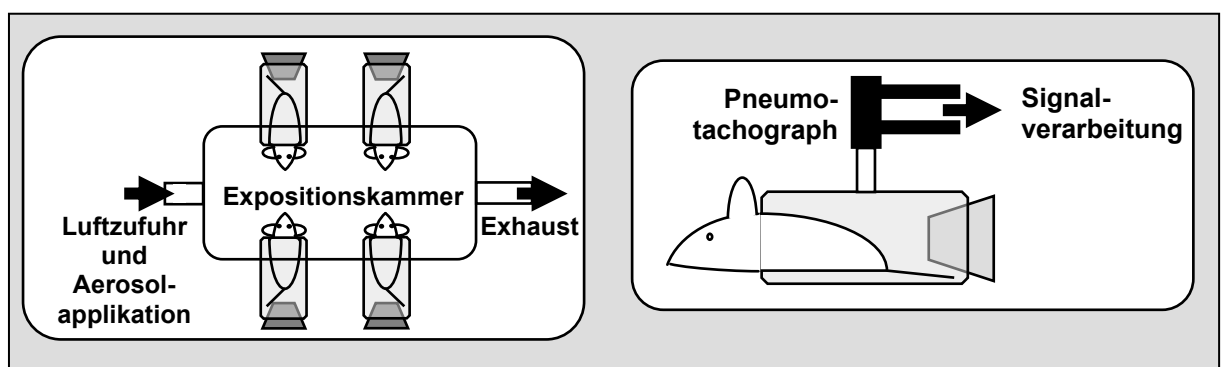


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung eines Head-out Body-Plethysmographen. Die Bestimmung der *in vivo*-Lungenfunktion erfolgte mittels Head-out Body-Plethysmography. Dieses computer-assistierte System erlaubt die simultane Messung verschiedener Atemparameter an vier nicht-anästisierten, spontan atmenden Tieren. (Die detaillierte Beschreibung der Methode erfolgte in (Neuhaus-Steinmetz et al., 2000).

Das Atemflusssignal wird durch ein Potentiometer (CFBA, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, D) verstärkt und über einen Analog/Digital Konverter (DT 301 PCI D/A converter, Data translation, Marlboo, MA, USA) an einen Computer weitergeleitet. Die Signale werden in Perioden von jeweils 14 Sekunden unter Zuhilfenahme der NOTOCORD hem 3.5 Software (Notocord, Paris, F) gemittelt und oszillographisch dargestellt. Die weitere Auswertung erfolgt mit Hilfe des Microsoft Exel-Programms.

2.4.2 Messablauf

Die Mäuse werden vor Beginn jeder Messung zur Beruhigung zunächst 10 Minuten in der Messapparatur belassen, um eine Beeinflussung der Messparameter durch unverhältnismäßig starke Atembewegung aufgrund von Stress zu vermeiden. Anschließend wird 15 Minuten lang die sogenannte Baseline $X \pm SD$ für den EF_{50} ermittelt. In diese Zeit atmet die Maus etwa 4000 Mal ein und aus, diese Werte werden gemittelt und gleich 100 gesetzt. Dadurch werden davon abweichende Werte in der Messperiode prozentuale Abweichungen von der Baseline erfasst.

Zur Messung der akuten Atemwegshyperreagibilität (AHR) wird anschließend eine MCh-Lösung (β -Methyl-Metacholin in PBS, Sigma, Steinheim, D) mit Hilfe eines Pari-Boys (Pari-Werke, Starnberg, D) in die Expositionskammer vernebelt. Durch die Bindung an cholinerge Rezeptoren der glatten Atemwegsmuskulatur führt dieses Pharmakon zu einer Obstruktion der Atemwege.

Dieser Provokationstest wird alle 5 Minuten für jeweils 70 Sekunden durchgeführt, während die Lungenfunktionsparameter weiterhin kontinuierlich aufgenommen werden. Folgende MCh-Konzentrationen wurden in aufsteigender Reihenfolge verwendet: 0 mg/ml, 12,5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml und 125 mg/ml.

Die Untersuchung der einzelnen Tiere wird bei einem 50%igen Abfall des halbmaximalen expiratorischen Atemflusses abgebrochen. Der Vergleich der Atemfunktion der einzelnen Tiere erfolgt letztendlich durch die Bestimmung der MCh-Konzentration, bei der es zu 50%igen Abfall der EF_{50} kommt (MCh_{50} [mg/ml]).

2.5 Gewinnung von Probenmaterial

2.5.1 Gewinnung der Serumproben

Damit eine gute Ausbeute an Serum aus der Maus erzielt werden kann, werden die zu untersuchenden Tiere zuerst für circa 10 Minuten in einen Heißluft-Wärmeinkubator bei 60°C eingebracht. Durch die Wärmebehandlung wird eine Dilatation der peripheren Blutgefäße herbeigeführt. Als nächstes wird die zuvor desinfizierte Schwanzvene mit einem Skalpell angeritzt und das entweichende

Blut in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Das hierbei maximal entnommene Blutvolumen beträgt im Durchschnitt ca. 500 µl. Das Blut wird im weiteren Verlauf zu nächst für drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, bis dass das Blut vollständig geronnen ist. Anschließend wird das Blut für 20 Minuten bei 2000g sowie Raumtemperatur zentrifugiert und der Serumüberstand in ein 1,5 ml Probenröhrchen überführt. Diese wurden dann bis zur weitem Analyse bei -20°C gelagert.

Material:

1. Wärmeinkubator: Temperaturregler GTR199	Greisinger, Landsberg, D
2. Skalpell (Disposable Scalpell No. 10)	Feather, J
3. 1,5ml Reaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg, D
4. alkoholische Lösung (Sterilium)	Braun, Melsungen, D
5. Zentrifuge (Rotina 48RS)	Hettich Zentrifugen, D
6. Pipette	Eppendorf, Hamburg, D
7. 1,5 ml Reaktionsgefäß (Röhrchen)	Greiner Bio-One, Solingen, D

2.5.2 Broncho-alveoläre Lavage (BAL)

Charakteristisch für das akute allergische Asthma ist das Einwandern von Entzündungszellen in das broncho-alveoläre Lumen. Um die Zellen, die in die Atemwegen infiltriert sind, zu untersuchen und näher charakterisieren zu können, wurde eine Broncho-alveoläre Lavage (BAL) durchgeführt.

Die BAL dient der Gewinnung von Zellen und sämtlicher Proteine, die sich im Broncho-alveolären Lumen befinden. Hierzu wird die Maus durch Zervikaldislokation getötet, fixiert und ventral mit 70%igem Ethanol benetzt. Anschließend wird die Trachea komplett von den umliegenden Strukturen freipräpariert. Dann erfolgt mit einer Schere ein kleiner Schnitt in die Trachea. In diese Öffnung wird eine Kanüle (Trachealkanüle, 1.1 mm, Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, D) eingeführt und mittels Ligatur fixiert. Über diese Kanüle wird 5mal jeweils 1ml eiskaltes PBS (NO H15-002, PAA, D) mit Protease-Inhibitor (complete™, Mini, Roche, Mannheim, D) in die Lunge gespült und zügig wieder entnommen. Die so gewonnenen BAL wird 5 Minuten bei 500 g und 4°C zentrifugiert und der zellfreie Überstand bei -20°C gelagert.

2.6 Zellzählung

Die Zellzählung wurde mit dem Casy-Cell-Counter durchgeführt (Casy[®]Modell TT; Schärfe Systems, Reutlingen, D). Dieses Gerät ermittelt die Zellzahl in einer Suspension nach dem Prinzip der Pulsflächenanalyse, bei der eine Änderung des elektrischen Widerstands beim Durchtritt der Zellen durch eine elektrolytgefüllte Messpore als Messgröße für das Zellvolumen herangezogen wird.

Durchführung

Die Zellsuspension wurde 1:2000 mit einer gerätespezifischen Salzlösung verdünnt (Casy[®]-Ton; Schärfe Systems, Reutlingen, D) und entsprechend den Angaben des Geräteherstellers gemessen, dabei wurden die Messparameter für den jeweiligen Zelltyp standardisiert.

2.7 Differenzierung von Leukozytensubpopulationen in der BAL

Für die Differenzierung der Leukozytensubpopulationen in der BAL wurden jeweils 50 µl der BAL-Flüssigkeit mit 150 µl PBS verdünnt. Durch Zytozentrifugation (Cytospin 3, Shandon, Frankfurt, D) für 5 Minuten bei 320g wurden die in der Probe befindlichen Zellen schonend auf Objektträger (76 mm x 26 mm, Mattrand, Marienfeld, D) aufgebracht und anschließend für 30 Minuten an der Luft getrocknet. Die Färbung erfolgte mit Diff-Quick[®]-Lösungen (Dade-Behring, Marburg, D) entsprechend den Herstellerangaben. Die Differenzierung der Zellen wurde lichtmikroskopisch anhand zelltypischer, morphologischer Kriterien bei einer Vergrößerung von 400 durchgeführt.

2.8 *Enzyme Linked immuno Sorbent Assay (ELISA)*

Beim ELISA handelt es sich um einen serologische Test, bei dem Antikörper oder an Antikörpergebundene Antigene durch einen Enzym-vermittelten Farbwechsel nachgewiesen werden. Beim hier verwendeten „*Sandwich-ELISA*“ werden die nachzuweisenden Proteine zunächst an Oberflächen-gekoppelte Antikörper gebunden („*Capture*“) und anschließend durch die Verwendung eines zweiten Antikörpers nachgewiesen („*Detektion*“).

D) zugegeben. Innerhalb einer 15minütigen Inkubation bei RT im Dunkeln tritt eine Farbreaktion auf, die durch die Zugabe von 50 µl Schwefelsäure (2M, H₂SO₄, Merck, Darmstadt, D) abgestoppt wurde. Dadurch kommt es zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Intensität der Gelbfärbung wurde durch Absorptionsmessung bei 450 nm im Absorptionsphotometer (Tecan Sunrise, Salzburg, A) gemessen. Die Auswertung der Analyse erfolgte unter Zuhilfenahme der Magelan 2-Photometersoftware (Tecan, Salzburg, A)

2.8.2 Konzentrationsbestimmung von Zytokinen der BAL

Der verwendete „*Cytometric Bead Array*“ (CBA) erlaubt in einem so genannten Multiplex-Ansatz die simultane Konzentrationsbestimmung mehrerer Zytokine in einer Probe. Diese Methode basiert auf der durchflusszytometrischen Analyse von Fluoreszenz-Intensitäten in Kombination mit einem Partikel (*bead*) – gekoppelten Immunassay.

Durchführung:

Für die CBA-Messungen der Zytokine in den zell-freien BAL-Überständen wurden folgende Kits (BD Bioscience, San Diego, USA) verwendet:

Th1/Th2 Zytokine Kit (IL-2, IL-4, IL-5, IFN-γ, Tumor Nekrose Faktor-α (TNF-α) Inflammation Kit (IL-6, IL-10, Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), IL-12p70).

Die Durchführung des CBA erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Zusammengefasst wurden jeweils 50 µl der „Capture Beads“ sowie 50 µl des PE „*Detection Reagent*“ in Analyseröhrchen pipettiert und 50 µl der Probe beziehungsweise des Standards in serieller Verdünnung dazugegeben, die Zytokinstandards wurden hierbei in neun seriellen Verdünnungen zwischen 20-5000 pg/ml eingesetzt. Im Anschluss an eine 3stündige Inkubation im Dunkeln bei RT wurden die Proben gewaschen und in 300 µl Waschpuffer aufgenommen.

Die Proben wurden nach der Gerätekalibrierung im FACS-Gerät (FACScan, BD Bioscience, San Diego, USA) analysiert. Die Analyse der Messdaten wurde mit Hilfe der BD CBA Software sowie Microsoft Excel-Programm durchgeführt.

2.9 Lungenhistologie

Die lungenhistologischen Untersuchungen erfolgten an Tieren, bei denen keine Broncho-alveoläre Lavage durchgeführt wurde. Nach Freipräparation der Trachea und Lunge, wurde diese durch Einspülen von 4% (w/v) Formaldehyd (Merck, Darmstadt, D) über die Trachea *in situ* fixiert.

Im Anschluss wurde die Lunge entfernt und bis zur Einbettung in Paraffin in 4% Formaldehyd gelagert. Nach der Einbettung in Paraffin wurden am Mikrotom (Accu-Cut® SRM™ 200 Rotary Microtome, Sakura, J) Dünnschnitte von 3 µm Dicke auf Objektträger (76 mm x 26 mm, Mattrand, Marienfeld, D) aufgebracht und bis zur Färbung bei RT gelagert.

2.9.1 HE-Färbung

Durch die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung von histologischen Lungenschnitten wurden morphologische Veränderungen und entzündliche Infiltrate im Lungenparenchym dargestellt.

Bei dieser Färbung werden im ersten Schritt die basophilen Zellbestandteile wie die Zellkerne durch Hämatoxylin blau bzw. dunkelviolett angefärbt. Im zweiten Schritt wurde mit Eosin, einem kontrastreichen Farbstoff, der kationische/eosinophile Strukturen des Zytoplasmas anfärbt, rosa bis rot gegengefärbt.

Durchführung:

Vor der eigentlichen Färbung wurden die Proben mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 80%, 70% v/v) deparafiniert und in destilliertem Wasser gewaschen.

Anschließend wurde für 8 Minuten mit Hämatoxylin (Hämatoxylin II nach Gill, Merck, Darmstadt, D) gefärbt und nach dem Waschen mit fließendem lauwarmem Wasser sowie destilliertem Wasser für 5 Minuten mit Eosin (Eosin G, Merck, Darmstadt, D) gegengefärbt.

Die gefärbten Schnitte wurden mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (70%, 96%, 100%) an der Luft getrocknet und eingedeckt (Histomount mounting solution, Zymed Laboratories, San Francisco, USA).

2.9.2 PAS-Färbung

Mit Hilfe der Perjodsäure-Schiff-Färbung (PAS-Färbung) werden kohlenhydrathaltige Mukus-Bestandteile (reduzierende Polysaccharide, neutrale Mukopolysaccharide und Glykoproteine) angefärbt. Dadurch werden Mukusproduzierende Becherzellen durch eine intensive violette Färbung dargestellt.

Durchführung

Die Präparate werden, wie bei der HE-Färbung erläutert, entparafiniert und entwässert. Nach dem Waschen mit destilliertem Wasser werden die Schnitte für 5 Minuten mit Perjodsäure (PAS-Färbekit, Merck, Darmstadt, D) behandelt und für 3 Minuten unter fließendem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Präparate für 15 Minuten in Schiffs-Reagenz gefärbt und unter fließendem Wasser sowie destilliertem Wasser gewaschen.

Die Zellkerne wurden durch 2minütige Färbung mit Hämatoxylin (Hämatoxylin II nach Gill, Merck, Darmstadt, D) gegengefärbt. Abschließend wurden die Schnitte gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (70%, 96%, 100%) an der Luft getrocknet und eingedeckt (Histomount mounting solution, Zymed Laboratories, San Francisco, USA).

2.10 Immunhistologie

Ein Charakteristikum des strukturellen Atemwegsumbaus im Rahmen eines Asthma bronchiale ist die Proliferation der Myozyten und Myofibroblasten im Lungenparenchym. Die dadurch resultierende Verdickung der glatten Muskelschicht lässt sich durch immunhistologische Färbung von *alpha-smooth muscle actin* (α -SMA), das glatte Muskel-Aktin, einem Bestandteil von Myozyten und Myofibroblasten darstellen.

Durchführung

Wie oben bereits beschrieben wurden 3 μ m dicke Lungeschnitte angefertigt und entparafiniert und anschließend mit einer Antikörperlösung gegen α -SMA (Ratte monoclonal anti-Maus- α -SMA-IgG, clone 1 A4, Immunotech, Marseille, F) für 20 Minuten bei 18°C inkubiert.

Nach 4maligem Waschen mit PBS wurde für 30 Minuten bei 20°C mit dem biotinylierten Sekundär-Antikörper (Maus-anti-Ratte-IgG [Vector Lab, Grünber, D]) inkubiert. Für die anschließende Farbreaktion wurde das Vecta-Stain[®]-Kit (Vector Lab, Grünber, D) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

Diese Methode wurde im Rahmen einer Kooperation mit der klinischen Forschergruppe „Chronische Atemwegserkrankungen“ unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Fehrenbach am Institut für Pathologie der Universität Marburg durchgeführt.

2.11 Daten-Analyse und Statistik

Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung wurden die Programme Microsoft Excel oder GraphPad Prism[®] verwendet. Bei den dargestellten Daten handelt es sich um Original-Messungen. Balkendiagramme repräsentieren Mittelwerte \pm SEM („standard error of mean“). Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde der Student's *t*-Test angewandt, wobei ausschließlich Differenzen unterhalb eines *p*-Wertes von 0,05 als signifikant angesehen wurden.

3. Ergebnisse

3.1 Die systemische Applikation von Poly (I:C) führt gegenüber der lokalen Applikation zu einer deutlicheren Verbesserung des akuten Asthma Phänotyps im Maus-Modell

In vorausgegangenen Experimenten konnten wir zeigen, dass die systemische intraperitoneale (i.p.) Applikation von Poly (I:C), einem TLR3-Liganden, im akuten Modell für allergisches Asthma einen bereits etablierten Asthma Phänotypen supprimiert (Sel et al., 2007).

Die Epithelzellen des Respirationstraktes bilden die äußere Barriere der Lunge und tragen durch die Synthese von antimikrobiellen Peptiden, Zytokinen und Chemokinen zur Immunabwehr bei. Diese Rolle wird durch die Expression von TLR-Rezeptoren vermittelt. Entgegen der endosomalen Lokalisation von TLR3, die bisher für andere Zelltypen beschrieben wurde, konnte für pulmonale Epithelzellen eine konstitutive Expression von TLR3 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

Daraus ergab sich die Fragestellung, ob die lokale intranasale (i.n.) Applikation von Poly (I:C) der systemischen möglicherweise überlegen ist.

Hierfür wurden Vergleichsuntersuchungen im akuten Maus-Modell für experimentelles Asthma bronchiale, entsprechend einem standardisierten Schema, durchgeführt:

Die Tiere wurden gegen Ovalbumin (OVA) - ein artfremdes Protein - durch dreimalige intraperitoneale (i.p.) Injektionen sensibilisiert und anschließend einem OVA-Aerosol exponiert („OVA-Challenge“). Hierdurch entwickelten die Tiere den Phänotypen des experimentellen Asthma bronchiale mit den typischen Charakteristika. Die Poly (I:C) Behandlung erfolgte circa zwei Wochen später. Während der letzten beiden Behandlungstage wurden die Tiere erneut dem OVA-Aerosol exponiert.

24 Stunden nach der letzten Behandlung wurden zur Charakterisierung des Asthma-Phänotyps folgende Parameter bestimmt: OVA-spezifische Immunglobulin-Titer, Zytokinkonzentration im Serum und Leukozytensubpopulationen in der BAL-Flüssigkeit.

Zur Beurteilung der Entzündungsreaktion sowie Becherzellhyperplasie wurden HE- und PAS-Färbungen von histologischen Lungenschnittpräparaten durchgeführt. Die Atemwegshyperreagibilität gegenüber Metacholin (MCh) wurde mittels Head-out Body-Plethysmographie analysiert. Um den Gesundheitszustand der Tiere zu dokumentieren wurde darüber hinaus das Körpergewicht ermittelt.

3.1.1 Die systemische und lokale Applikation von Poly (I:C) inhibieren die Sensibilisierungsreaktion

Um die systemische und lokale Wirkung von Poly (I:C) auf die Sensibilisierung zu untersuchen, wurden den Versuchstieren am Analysetag Blutproben entnommen, und anschließend die OVA-spezifischen Immunglobulin-Titer (anti-OVA IgE, anti-OVA IgG1 und anti-OVA IgG2a) im Serum mittels ELISA-Technik bestimmt.

Hierdurch sollte geklärt werden, ob die Gabe von Poly (I:C) die TH2 induzierte Expression von IgE- und IgG1-Immunglobulinen unterdrückt, beziehungsweise ein „switch“ zur TH1 gesteuerten Expression der Immunglobulinklasse IgG2a in B-Zellen induziert wird.

Die OVA-Sensibilisierung führte gegenüber PBS-behandelten Tieren zu erhöhten IgE- ($0,20 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$) und IgG1- ($6,15 \pm 0,48 \text{ ng/ml}$) Konzentrationen (Abb.3.1). Dies entspricht einer erfolgreichen Sensibilisierung gegen Ovalbumin in der Positiv-Kontrollgruppe.

Beide Applikationsformen von Poly (I:C) zeigten eine signifikante Erniedrigung der IgE-Serumkonzentration im Gegensatz zur Positiv-Kontrollgruppe. Dieser Effekt war bei systemischer Applikation ($0,05 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$) signifikant höher ausgeprägt als bei lokaler Applikation ($0,10 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$).

Die IgG1- und IgG2a-Konzentrationen wurden weder durch die lokale noch systemische Applikation von Poly (I:C) beeinflusst.

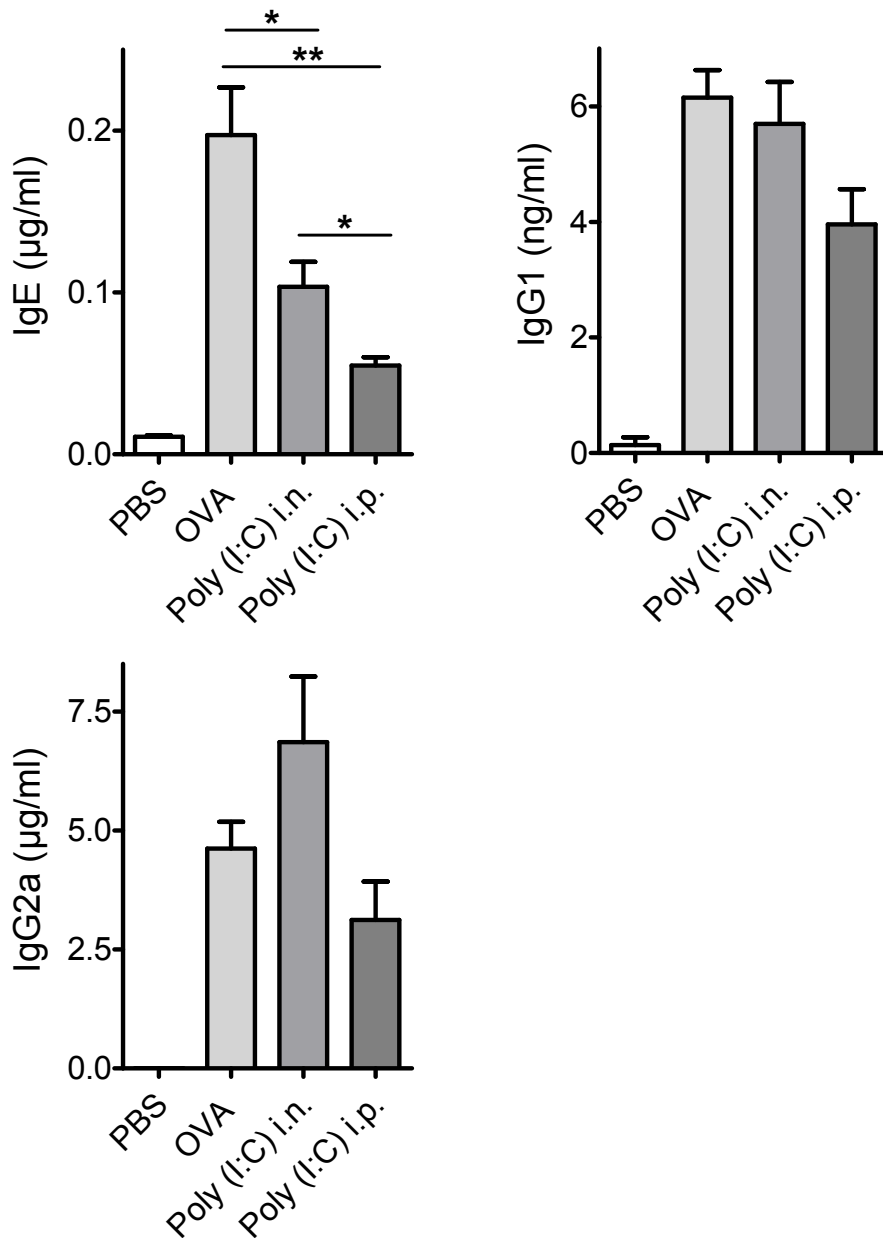


Abbildung 3.1: OVA-spezifische Immunglobulin-Konzentrationen im Serum nach Applikation von Poly (I:C) im akuten Asthma-Maus-Modell. Nach Abnahme des Blutes am Analysetag aus der Schwanzvene wurde Serum gewonnen. Anschließend wurden mittels ELISA-Technik die Konzentrationen an OVA-spezifischem-IgE, -IgG1 und -IgG2a im Serum gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. (* p < 0,05; ** p < 0,01).

3.1.2 Die IL-5-Konzentration in der BAL wird bei systemischer Applikation von Poly (I:C) stärker inhibiert als bei lokaler Anwendung

Die beschriebene Verminderung der IgE-Konzentrationen im Serum bei Tieren, die mit Poly (I:C) behandelt wurden weist auf eine Unterdrückung TH2-vermittelter Immunreaktionen hin. Zur weiterführenden Analyse der vermuteten TH2-Zell-Inhibition wurden weiterhin die Konzentration von IL-4, IL-5 und IFN- γ in der BAL-Flüssigkeit bestimmt.

Die Konzentration von IL-4 und IFN- γ lagen in allen Gruppen unterhalb des Detektionslimits.

Erwartungsgemäß wurde in der OVA-Kontrollgruppe eine deutlich erhöhte IL-5-Konzentration ($0,12 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$) ermittelt. Bei Behandlung der Tiere mit Poly (I:C) lagen hingegen deutlich niedrigere Werte vor. Während die IL-5-Konzentration in der BAL nach lokaler Behandlung bei $0,06 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ lag, wurden nach systemischer Behandlung nur noch $0,03 \pm 0,006 \mu\text{g/ml}$ detektiert (Abb. 3.2).

Wie bereits hinsichtlich der IgE-Konzentration im Serum beschrieben, war der Effekt somit nach intraperitonealer Injektion ausgeprägter.

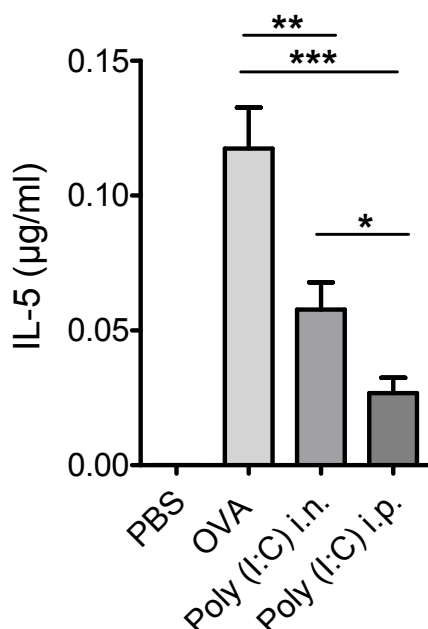


Abbildung 3.2: IL-5 Zytokin-Konzentration in der BAL-Flüssigkeit. Am Analysetag erfolgte die Freipräparation der Lunge und Trachea, die Trachea wurde kanüliert und die Lunge mit kaltem PBS lavagiert. Anschließend wurde mittels CBA-Technik die Konzentration von IL-5 ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.1.3 Die Entzündung der Atemwege wird durch Poly (I:C) Applikation verhindert

Ein Hauptcharakteristikum der inflammatorischen Reaktion der Lunge im Rahmen eines Asthma bronchiale ist die Infiltration von Eosinophilen Granulozyten in das Atemwegslumen.

Durch die Differenzierung der Leukozyten in der Broncho-alveolären Lavage (BAL) wurde das Auftreten einer Eosinophilie in den Versuchsgruppen untersucht.

Hierfür wurde eine Broncho-alveoläre Lavage mit einer kalten PBS-Lösung durchgeführt. Nach Bestimmung der Gesamt-Zellzahl wurden Zytospinpräparate angefertigt und anschließend für die morphologische Zelldifferenzierung gefärbt.

Wie in Abb. 3.3 dargestellt, kommt es in den Tieren der OVA-Kontrollgruppe zu einem deutlichen Anstieg der Leukozytenzahl ($1,98 \times 10^5$ Leukozyten/BAL) in der BAL.

Während die zusätzliche i.p. Poly (I:C) Behandlung zu einer signifikanten Reduktion der Leukozytenzahl ($0,91 \times 10^5$ Leukozyten/BAL) führte, war ein solcher Effekt nach der i.n. Poly (I:C) Behandlung ($2,25 \times 10^5$ Leukozyten/BAL) nicht zu beobachten.

Erwartungsgemäß stellen eosinophile Granulozyten mit rund 78% den Hauptanteil der eingewanderten Leukozyten in der BAL der OVA-Kontrollgruppe dar. Hier liegt mit $1,55 \times 10^5$ Eosinophilen Granulozyten pro BAL eine deutliche Eosinophilie vor. Die Applikation von Poly (I:C) intraperitoneal ($0,134 \times 10^5$ Eosinophilen/BAL) wie auch intranasal ($0,31 \times 10^5$ Eosinophilen/BAL) führte im Vergleich dazu zu einer deutlichen Verminderung der Eosinophilen Granulozyten. Dies weist auf eine Abnahme der Entzündungsreaktion in der Lunge hin.

In der Makrophagenpopulation weist die OVA-Kontrollgruppe mit $0,24 \times 10^5$ Makrophagen/BAL eine signifikante Reduktion im Unterschied zu den anderen drei Gruppen auf.

Die Zellzahlen in der Population der Lymphozyten sowie der Neutrophilen Granulozyten zeigte eine enorme Streuung, so dass keine signifikanten Unterschiede zu bestimmen waren.

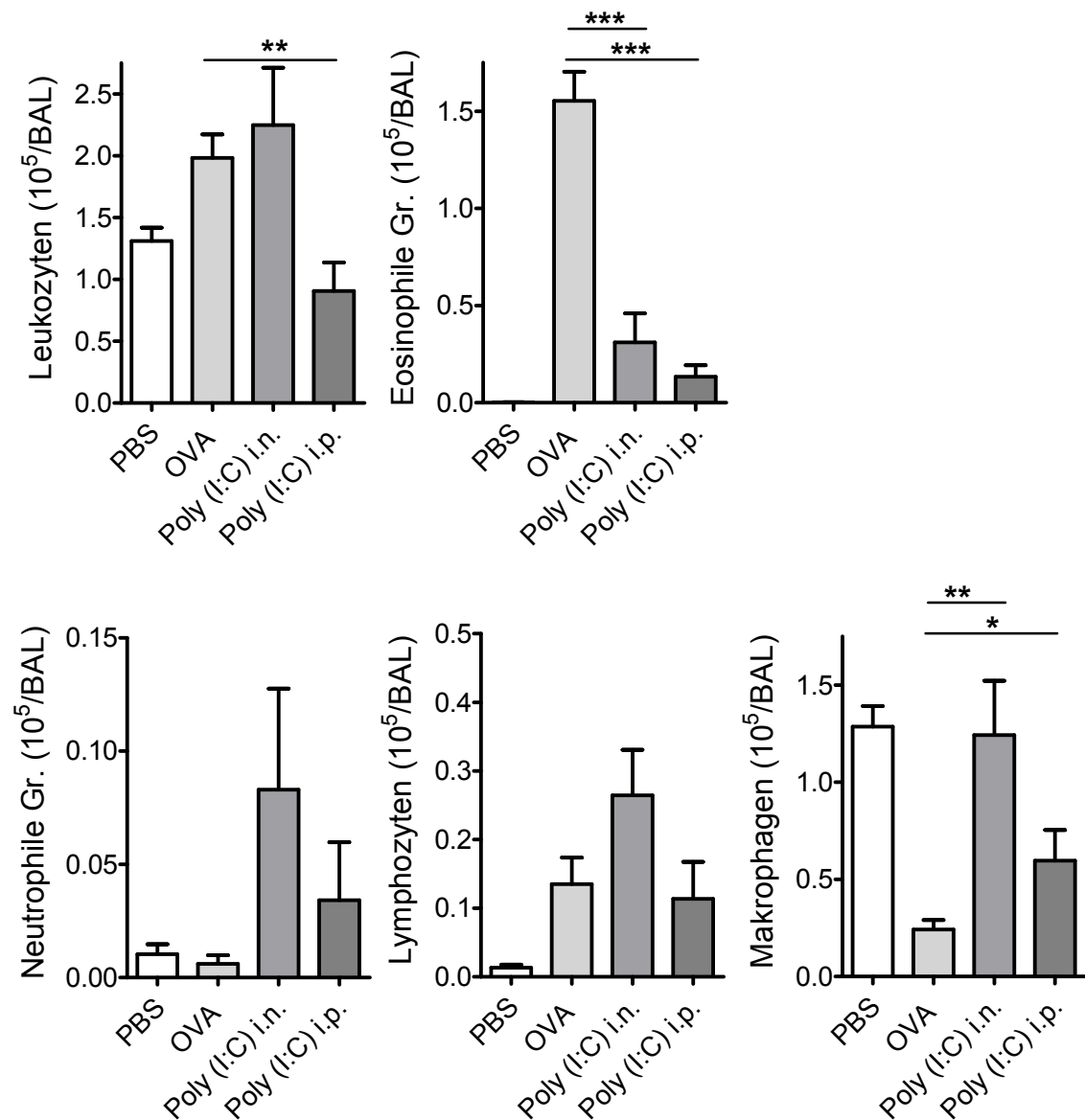


Abbildung 3.3: Mikroskopische Differenzierung von Zellen aus der BAL-Flüssigkeit. Am Analysetag (48. Tag) des Behandlungsprotokolls erfolgte die Freipräparation der Lunge und Trachea. Die Trachea wurde kanüliert und die Lunge mit kaltem PBS lavagiert. Von der gewonnenen BAL wurden Zytospins auf Objektträgern angefertigt. Die BAL-Zellen wurden mit Quick-Diff gefärbt und anschließend nach morphologischen Kriterien unter dem Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung differenziert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.1.4 Die allergische Entzündung im Lungenparenchym und die Becherzellhyperplasie werden durch die systemische Poly (I:C) Behandlung unterdrückt

Wie im vorhergehenden Abschnitt gezeigt, führt die intranasale Poly (I:C) Behandlung zu einer Verminderung der Entzündung im Atemwegslumen. Für weiterreichende Untersuchungen einer Entzündung im Lungenparenchym wurden lungenhistologische Schnittpräparate angefertigt und eine HE-beziehungsweise PAS-Färbung durchgeführt (Abb.3.4 und Abb.3.5).

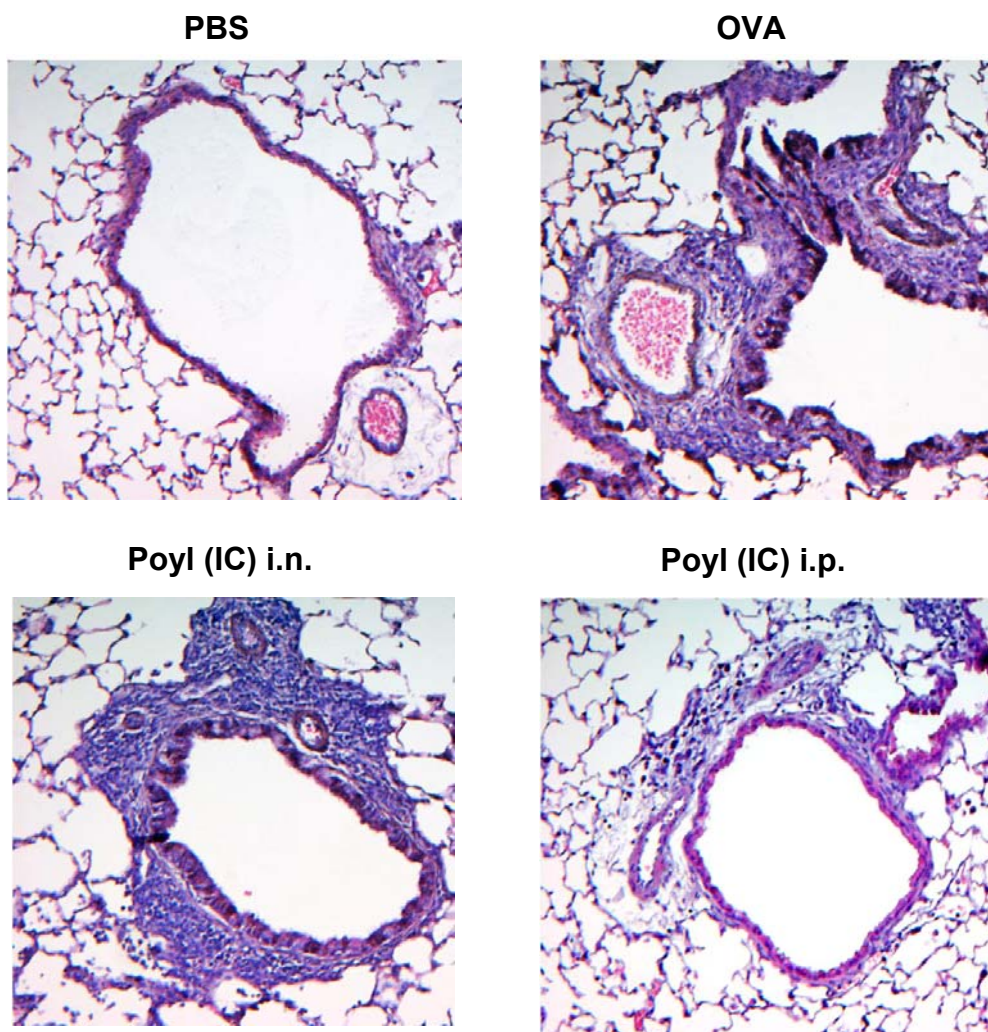


Abbildung 3.4: HE-Färbung von lungenhistologischen Schnittpräparaten. Am 48. Tag des Behandlungsprotokolls wurden die Lungen, nach vorheriger Durchführung der BAL, entnommen, in Formalin fixiert und in Parafin eingebettet. An den anschließend angefertigten Schnittpräparaten wurde eine PBS-Färbung durchgeführt. Dargestellt sind repräsentative Lungenschnittpräparate der Negativ-Kontrollgruppe (PBS), Positiv-Kontrollgruppe (OVA), Poly (I:C) i.n. Behandlung und Poly (I:C) i.p. Behandlung (Vergrößerung jeweils 200-fach).

Die HE-gefärbten Schnittpräparate der PBS-Negativ-Kontrollgruppe zeigen keinerlei Anzeichen einer Entzündung.

Im Gegensatz dazu wurde in der OVA-Kontrollgruppe eine ausgeprägte leukozytäre Infiltration in die Mukosa der peribronchialen und perivaskulären Bronchien (Abb.3.4) nachgewiesen. Wobei das inflammatorische Infiltrat vornehmlich aus Eosinophilen Granulozyten und in geringerem Umfang aus Lymphozyten bestand.

Die i.n. (also lokale) Behandlung der Mäuse mit Poly (I:C) Behandlung hatte keinen Einfluss auf das Ausmaß der Entzündung, auch hier wurde eine deutliche Infiltration von Eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten in die Atemwegsmukosa nachgewiesen.

Ein deutlich positiver Effekt auf die inflammatorische Infiltration der Lunge wurde durch intraperitonealer (also systemische) Poly (I:C) Behandlung erzielt. Innerhalb dieser Gruppe waren entzündliche Leukozyten im Infiltrat in deutlich geringerem Ausmaß nachweisbar.

Zur Beurteilung der Becherzellhyperplasie wurden PAS-gefärbte Lungenschnitte angefertigt, bei denen im Mukus enthaltene Glykosaminoglykane, Kohlenhydrate und Glykogen rot angefärbt werden (Abb.3.5).

Das respiratorische Epithel der PBS-Negativ-Kontrollgruppe zeigt einen physiologischen Aufbau mit Flimmerzellen sowie Bürstensaumzellen, jedoch keine mukus-produzierenden Becherzellen und erscheint sowohl in den zentralen als auch peripheren Anteilen gleichmäßig.

In den Atemwegen der OVA-behandelten Tiere wurden demgegenüber zahlreiche Mukus-produzierende Becherzellen nachgewiesen.

Das Ausmaß der Becherzellhyperplasie wurde durch die intranasale Poly (I:C) Behandlung nicht beeinflusst. Wie bereits in der OVA-Gruppe beschrieben, liegt hier eine deutliche Becherzellhyperplasie vor.

Im Gegensatz dazu sind nach intraperitonealer Poly (I:C) Behandlung nur noch vereinzelt Becherzellen nachweisbar.

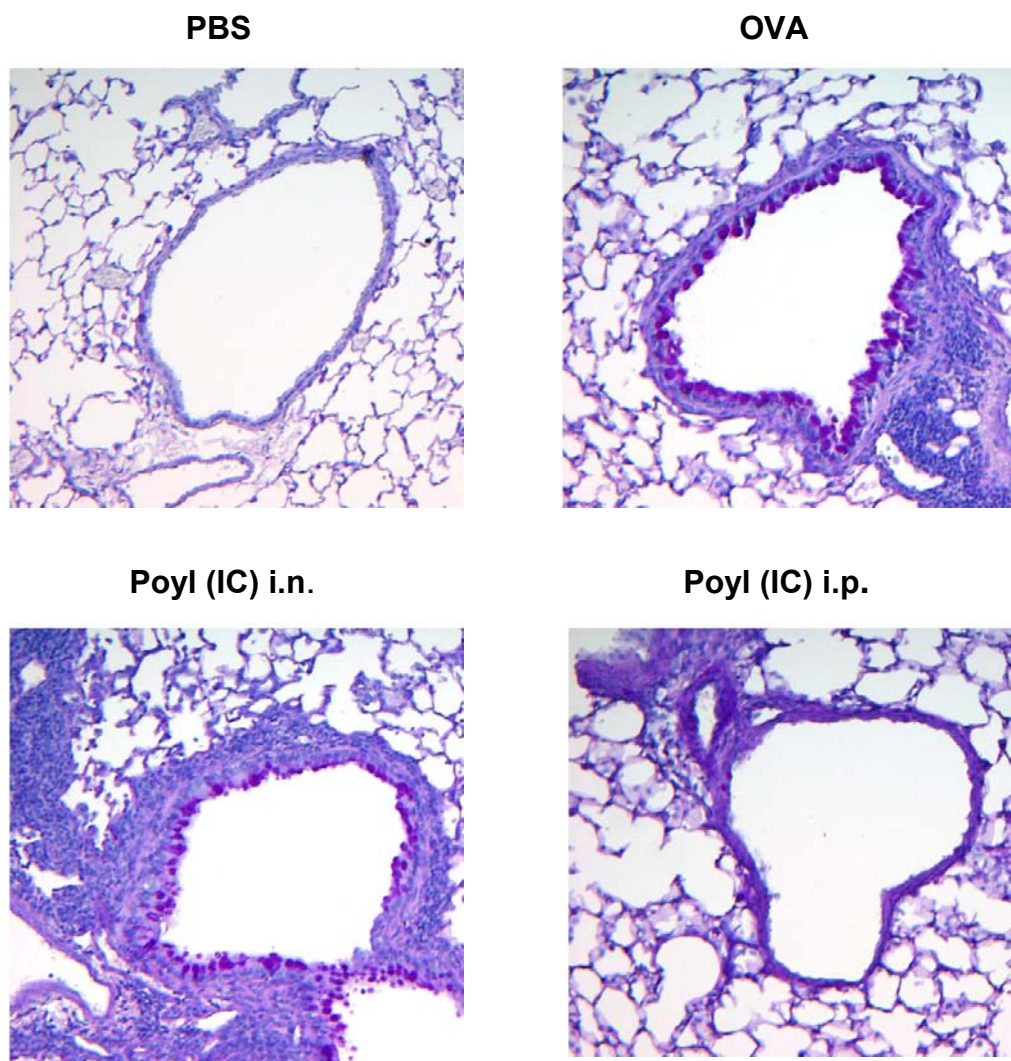


Abbildung 3.5: PAS-Färbung von lungenhistologischen Schnittpräparaten. Am 48 Tag der Analyse wurden die Lungen, nach vorheriger Durchführung der BAL, entnommen, zuerst in Formalin fixiert und dann in Parafin eingebettet. An Schnittpräparaten wurde eine PAS-Färbung durchgeführt. Dargestellt sind repräsentative Lungenschnittpräparate der Negativ-Kontrollgruppe (PBS), Positiv-Kontrollgruppe (OVA), Poly (I:C) i.n. Behandlung und Poly (I:C) i.p. Behandlung (Vergrößerung 200-fach).

Die histopathologischen Untersuchungen der Lunge zeigen zusammenfassend, dass durch eine intraperitoneale Behandlung mit Poly (I:C) (im Gegensatz zur intranasalen Behandlung) sowohl die entzündliche Infiltration der Lunge mit eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten als auch die Becherzellhyperplasie deutlich vermindert.

3.1.5 Die Lungenfunktion verbessert sich nur nach systemischer Applikation von Poly (I:C)

Nachdem gezeigt wurde, dass durch die systemische und in eingeschränktem Maße auch durch die lokale Applikation von Poly(I:C) zentrale pathophysiologische Charakteristika des allergischen Asthma, wie IgE-Produktion, IL-5-Sekretion, eosinophile Infiltration der Lunge sowie Becherzellhyperplasie vermindert werden, wurde im letzten Schritt als klinischer Parameter die Lungenfunktion bestimmt.

Die Messung der Lungenfunktion wurde mit der Head-out Body-Plethysmographie durchgeführt. Bei dieser Analyse wird die Lungenfunktion der Mäuse in einer speziellen Expositions-kammer (siehe Material und Methoden) untersucht, wobei jeweils der halbmaximale expiratorische Atemfluss (EF_{50}) unter aufsteigenden Konzentrationen von Metacholin (MCh) ermittelt wird. Die MCh-Provokation bedingt eine Bronchoobstruktion, die vor allem die expiratorische Atemphase beeinflusst. Um das Ausmaß der Atemwegshyperreagibilität (AHR) zu messen, wurde jeweils die Metacholin-Konzentration ermittelt, bei der es zu einem 50%igen Abfall des EF_{50} kommt.

Diese Erniedrigung des EF_{50} auf 50% wurde in der PBS-Gruppe bei einer MCh-Konzentration von 102.2 ± 5.3 mg/ml erreicht (Abb. 3.6).

Die OVA sensibilisierte Kontrollgruppe weist im Vergleich dazu eine signifikant erhöhte AHR auf. Hier führt bereits eine MCh-Konzentration von 44.86 ± 4.8 mg/ml zu einer solchen Erniedrigung des Atemflusses.

Die Atemwegsreagibilität der i.n. mit Poly(I:C) behandelten Mäuse ist gegenüber der PBS-Gruppe ebenfalls deutlich erhöht. Sie unterscheidet sich nicht signifikant von der Situation, die in der OVA-Gruppe beschrieben wurde.

Demgegenüber führte die i.p. Behandlung mit Poly(I:C) zu einer deutlich verbesserten Lungenfunktion. Die Lungenfunktion war gegenüber der Negativ-Gruppe nicht signifikant unterschiedlich (81.63 ± 10 mg/ml).

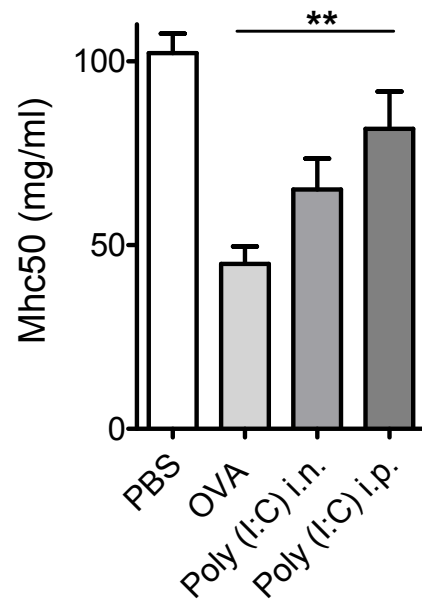


Abbildung 3.6: Atemwegsreaktivität nach Behandlung mit TLR-Liganden im Maus-Modell für akutes Asthma bronchiale (Messung mittels Head-out Body-Plethysmographie).

Am Tag 48 des Behandlungsprotokolls wurde die Atemwegsreagibilität von allen Gruppen mittels der Head-out Body-Plethysmographie (HOBP) durch einen Provokationstest gemessen. Hierbei wird die Reagibilität der glatten Bronchialmuskulatur auf Acetyl- β -Methylcholin-Hydrochlorid (MCh), einem unspezifischen Reiz untersucht. Als Maß für die Atemwegsreagibilität (Bronchoobstruktion) wurde der halbmaximale expiratorische Atemfluss (EF₅₀-Wert) erfasst und diejenige Konzentration an Metacholin (MCh) ermittelt, bei der der EF₅₀-Wert unter 50 % des Wertes unter Normal-Bedingungen gefallen war. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (** p < 0,01).

Somit konnte gezeigt werden, dass durch die systemische Behandlung mit dem TLR3-Liganden Poly (I:C) nicht nur die entzündlichen Parameter eines Asthma bronchiale vermindert werden, sondern auch die Lungenfunktion im Tiermodell für akutes Asthma deutlich verbessert wird.

3.2 Einfluss von R-848 und Poly (I:C) auf die Entwicklung von chronischem Asthma Bronchiale im Maus-Modell

Im ersten Teil konnte gezeigt werden, dass die systemische Applikation von Poly (I:C) im akuten Modell für allergisches Asthma einen bereits vollständig ausgeprägten Asthma-Phänotypen positiv beeinflusst. Eine lokale Applikation zeigte hingegen nur eingeschränkte Effekte.

In den folgenden Untersuchungen wurde Poly (I:C) aus diesem Grund ausschließlich systemisch durch intraperitoneale Injektion appliziert.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde neben dem Einfluss des TLR3-Liganden Poly (I:C) auch der Einfluss des TLR7-Liganden R-848 auf die Pathogenese eines allergischem Asthma analysiert. Diese Untersuchungen wurden an einem chronischen Modell für allergisches Asthma durchgeführt, da hier neben den entzündlichen Veränderungen der Lunge, die ein akutes Asthma-Modell reflektiert, auch strukturelle Veränderungen der Atemwege im Sinne eines *Airway remodelling* untersucht werden können und dieses Modell somit weitaus besser dem Phänotypen des chronischen allergischen Asthma im Menschen entspricht.

Im Gegensatz zur i.p. Applikation von Poly (I:C) wurde R-848 allerdings subkutan injiziert, da die subkutane Injektion in vorausgegangen Versuchen gegenüber der intraperitonealen und intranasalen Applikation einen deutlicheren Einfluss auf die untersuchten Asthma-Charakteristika zeigte (Sel et al., 2007).

Die Untersuchungen wurden an dem, in der Arbeitsgruppe bereits etabliertem Maus-Modell für chronische Allergie und Asthma eingesetzt (Wegmann, 2008; Wegmann et al., 2005; Wegmann and Renz, 2005). Dieses Modell basiert auf der intraperitonealen OVA-Injektionen mit anschließender OVA-Aerosol-Exposition jeweils an zwei Tagen in der Woche für insgesamt acht Wochen (OVA Positiv-Kontrollgruppe). Die Behandlung mit den TLR-Liganden erfolgte jeweils einen Tag vor sowie am Tag der Aerosol-Exposition (siehe Material und Methoden). Die Negativ-Kontrollgruppe wurde anstelle von OVA mit PBS behandelt.

3.2.1 Die TLR3- oder TLR7-Aktivierung vermindert die Produktion von OVA-spezifischem IgE

Initial wurde die Wirkung der TLR-Liganden auf die Sensibilisierung im chronischen Asthma-Modell untersucht. Hierfür wurde von den Tieren nach 30 und 75 Tagen Serum zur Konzentrationsbestimmung von OVA-spezifischem IgE, IgG1 und IgG2a entnommen (Abb.3.7).

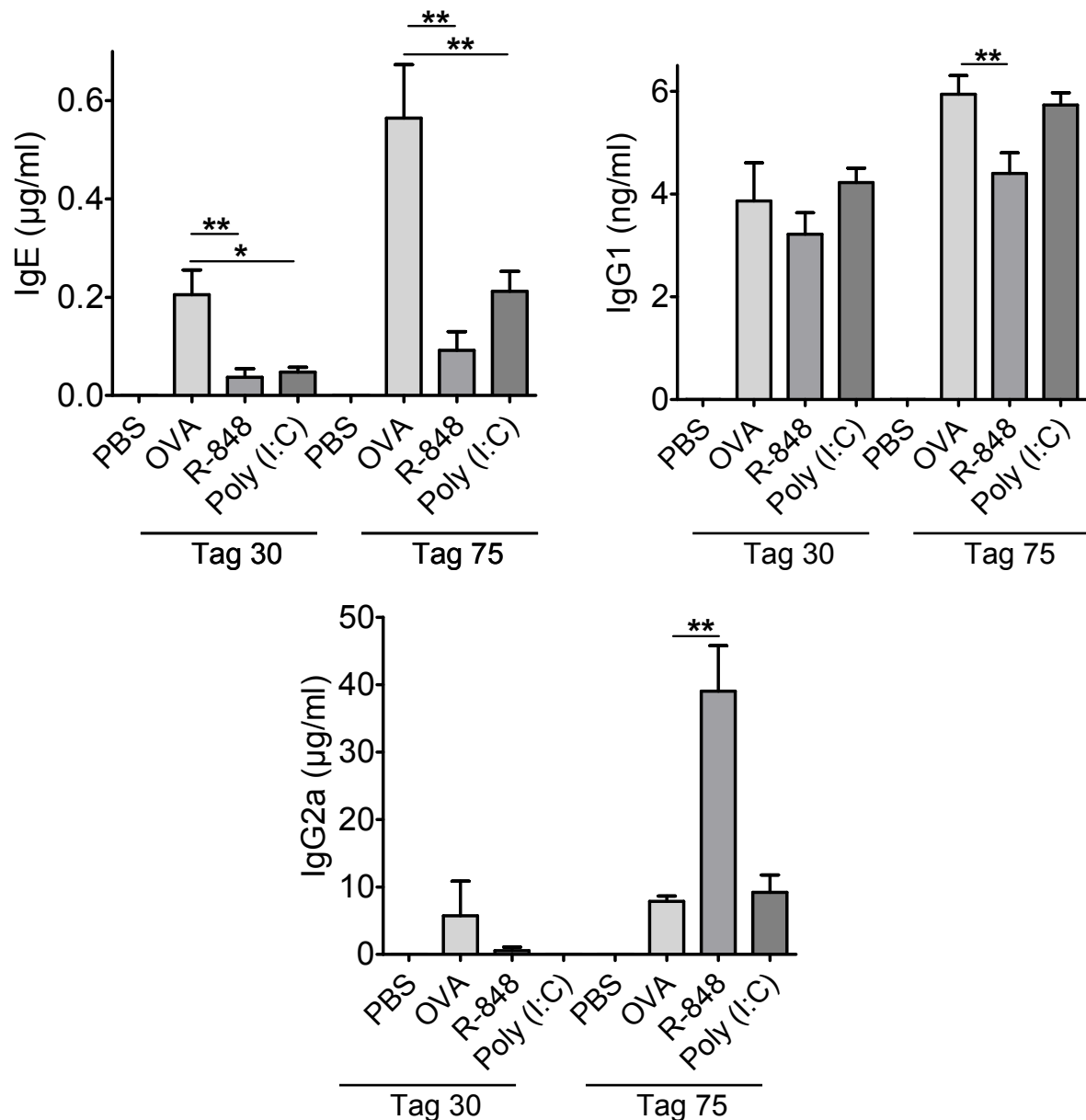


Abbildung 3.7: OVA-spezifische Immunglobulin Konzentrationen im Serum nach Applikation von TLR-Liganden im chronischen Asthma-Maus-Modell. Nach Blutentnahme am Tag 30 und 75 des Behandlungsprotokolls wurde Serum gewonnen. Anschließend wurden mittels ELISA-Technik die Konzentrationen an OVA-spezifischem IgE, IgG1 und IgG2a im Serum ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. (* p < 0,05; ** p < 0,01).

Die Sensibilisierung und anschließende Vernebelung von OVA-Aerosol führte in der Positiv-Kontrollgruppe zu einem deutlichen Anstieg der Konzentration von OVA-spezifischem IgE ($0,21 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$) (Abb. 3.7). Im Verlauf der Chronifizierung stieg dieser Wert am Tag 75 auf das 2,7fache an ($0,56 \pm 0,11$).

Demgegenüber wiesen, Mäuse die mit R-848 oder Poly (I:C) behandelt wurden, sowohl nach der ersten Applikation (Tag 30) als auch nach acht Wochen (Tag 75) deutlich niedrigere IgE-Spiegel auf. Die Anwendung von R-848 führte im Vergleich zur OVA-Kontrollgruppe bereits nach der ersten Applikation zu einer 5,7fachen Abnahme der IgE-Konzentration ($0,037 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$).

Nach 75 Tagen lag der IgE-Spiegel um den Faktor 6,2 unter der OVA-Kontrolle ($0,09 \pm 0,04 \mu\text{g/ml}$). Ähnliche Effekte wurden auch nach der Anwendung von Poly (I:C) beobachtet. Hier lag die IgE-Konzentration nach einer Anwendung bei $0,048 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$ und nach 75 Tagen bei $0,21 \pm 0,04 \mu\text{g/ml}$.

Darüber hinaus führte die 8-wöchige Behandlung (Tag75) mit R-848 im Vergleich zur OVA-Kontrollgruppe ($5,94 \pm 3,6 \text{ ng/ml}$) zu einer Erniedrigung der IgG1-Spiegel auf $4,4 \pm 0,4 \text{ ng/ml}$. Die Anwendung von Poly (I:C) hatte keinen Einfluss auf die IgG1-Konzentration.

Dem gegenüber erhöhte sich die Konzentration von IgG2a- einem TH1 typischen und somit nicht mit allergischen Reaktionen assoziiertem Immunglobulin- nach R-848 Behandlung signifikant.

Während die IgG2a-Konzentration in der OVA-Kontrollgruppe am Tag 75 bei $7,88 \pm 0,77 \mu\text{g/ml}$ lag, wurden nach R-848 Behandlung zu diesem Zeitpunkt um den Faktor 5 höhere Werte ($39,02 \pm 6,7$) ermittelt. Im Gegensatz dazu führte die Anwendung von Poly (I:C) zu keiner signifikanten Änderung der IgG2a-Konzentration.

In der PBS-Kontrollgruppe waren weder OVA-spezifische IgE- noch IgG1- und IgG2a-Antikörper nachweisbar.

3.2.2 Die Applikationen von TLR3/7-Liganden inhibiert die Produktion von IL-5 und TGF- β und induziert die Produktion von IL-12 in der Lunge

Im nächsten Schritt wurden zur näheren Charakterisierung, der in das bronchoalveolären Lumen infiltrierten Lymphozytenpopulationen, die Konzentrationen repräsentativer Zytokine bestimmt. Aufgrund ihrer charakteristischen Zytokinexpression lassen sich hierdurch allergie-assoziierte TH2-Zellen (IL-4 und IL-5) von TH1-Zellen (IFN- γ und IL-12) und TH3-Zellen (TGF- β) unterscheiden.

Erwartungsgemäß wurde in der OVA-Kontrollgruppe ($0,166 \pm 0,03$ ng/ml) im Vergleich zu PBS-behandelten Mäusen ($0,06 \pm 0,01$ ng/ml) entsprechend dem allergischen Phänotyp eine hohe IL-5 Konzentration in der BAL detektiert.

Nach der Behandlung durch die TLR-Liganden R-848 ($0,04 \pm 0,003$ ng/ml) oder Poly (I:C) ($0,06 \pm 0,01$ ng/ml) wurden signifikant niedrigere IL-5-Spiegel bestimmt (Abb. 3.8).

Parallel dazu lag die Konzentration des TH1 Zytokins IL-12 in den behandelten Gruppen verglichen mit der OVA-Gruppe signifikant höher.

Die IL-12-Konzentration war sowohl in der Poly (I:C) Behandlungsgruppe ($860,3 \pm 183,9$ pg/ml) als auch nach R-848 Behandlung ($809,3 \pm 187,7$ ng/ml) etwa 3-fach höher als in der Positiv-Kontrollgruppe ($269,3 \pm 106,6$ pg/ml), welche selbst kaum einen Unterschied zur PBS-Negativ-Kontrollgruppe ($106,4 \pm 70,3$ pg/ml) aufwies.

Hinsichtlich der Expression des TH3-typischen Zytokins TGF- β wurde gegenüber der OVA-Kontrollgruppe ($1152 \pm 144,6$ pg/ml) nach der Applikation von R-848 ($229,1 \pm 59,07$ pg/ml) eine Konzentrationsabnahme nachgewiesen. Bei Poly (I:C) war eine Tendenz zu sehen.

Die Konzentration der Zytokine IFN- γ und IL-4 war in allen vier Gruppen unterhalb des Detektionslimits (Daten nicht gezeigt).

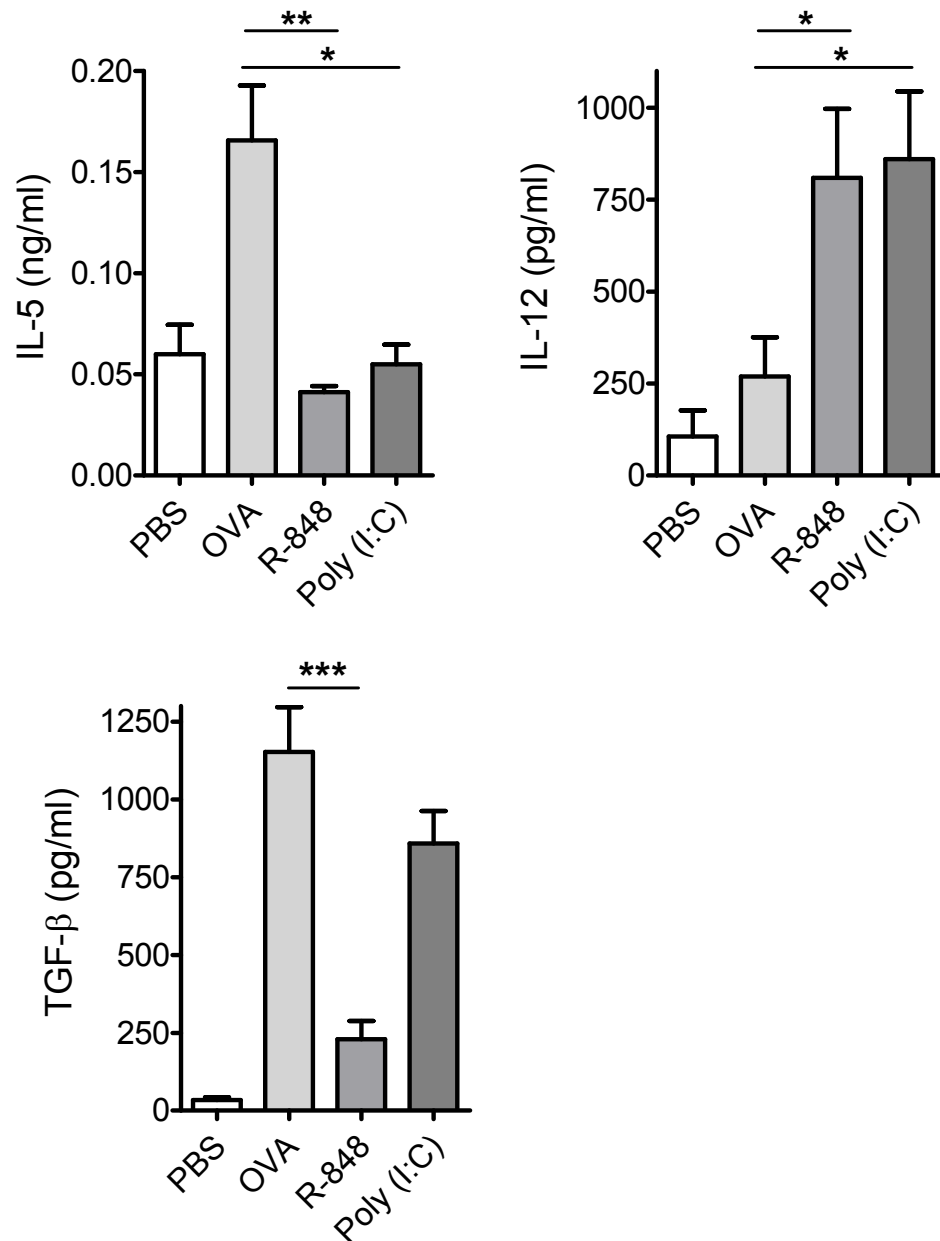


Abbildung 3.8: Zytokinkonzentrationen in der BAL-Flüssigkeit nach Applikation von R-848 oder Poly (I:C) im chronischen Modell für das Asthma bronchiale. IL-5, IL-12 und TGF-β Konzentrationen wurden mittels ELISA detektiert. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen wurde mittels *students-t*-Test analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$).

3.2.3 Verminderung der Anzahl an Eosinophilen Granulozyten in der BAL durch die Aktivierung von TLR3 und 7

Zur Charakterisierung der lokalen Entzündung in den Atemwegen wurden die Leukozytenzahl in der Broncho-alveoläre Lavage (BAL) quantifiziert und die Subpopulationen morphologisch differenziert. Dazu wurde den Tieren 24 Stunden nach der letzter OVA-Exposition post mortem die komplette Lunge entnommen und mit 800 µl eiskalter PBS Lösung lavagiert. Die Gesamtzellzahl wurde im Anschluss mittels Cell Counter quantifiziert. Die Differenzierung erfolgte nach Anfärbung (Diff-Quick) von Zytospins unter dem Mikroskop (siehe Material und Methoden).

Dabei wurden im Durchschnitt in der Positiv-Kontrollgruppe etwa 6×10^5 Leukozyten je BAL detektiert (Abb. 3.9). Im Gegensatz dazu war die leukozytäre Infiltration in der Negativ-Kontrollgruppe im Durchschnitt mit circa 4×10^5 Leukozyten pro BAL deutlich niedriger.

Den Hauptanteil der Leukozytenpopulation in der Positiv-Kontrollgruppe stellen Eosinophilen Granulozyten mit durchschnittlich 4×10^5 Zellen pro BAL dar. Im Gegensatz dazu war die Anzahl der Eosinophilen Granulozyten nach R-848 ($0,3 \times 10^5$ Eosinophile/BAL) oder Poly(I:C) Behandlung ($1,7 \times 10^5$ Eosinophile/BAL) signifikant niedriger, wobei der Effekt von R-848 deutlicher ausgeprägt war als der Einfluss von Poly (I:C).

In der BAL von Tieren der Negativ-Kontrollgruppe stellen Makrophagen mit $3,2 \times 10^5$ Zellen pro BAL die dominierende Leukozytenpopulation dar. Auch nach der Behandlung mit TLR-Liganden wurde mit rund $3,8 \times 10^5$ Makrophagen pro BAL (R-848) sowie $3,4 \times 10^5$ Makrophagen pro BAL (Poly (I:C)) eine vergleichbare Verteilung festgestellt.

Die Anzahl an neutrophilen Granulozyten war bezogen auf die OVA-Kontrollgruppe nach R-848 Behandlung mit dieser vergleichbar, während sie in der Poly (I:C)-Gruppe signifikant niedriger lag. In der PBS-Kontrollgruppe wurden demgegenüber nahezu keine neutrophilen Granulozyten detektiert.

Die Anzahl der Lymphozyten wies in allen Gruppen kaum Unterschiede auf und zeigte zudem eine deutliche Streuung innerhalb der einzelnen Gruppen.

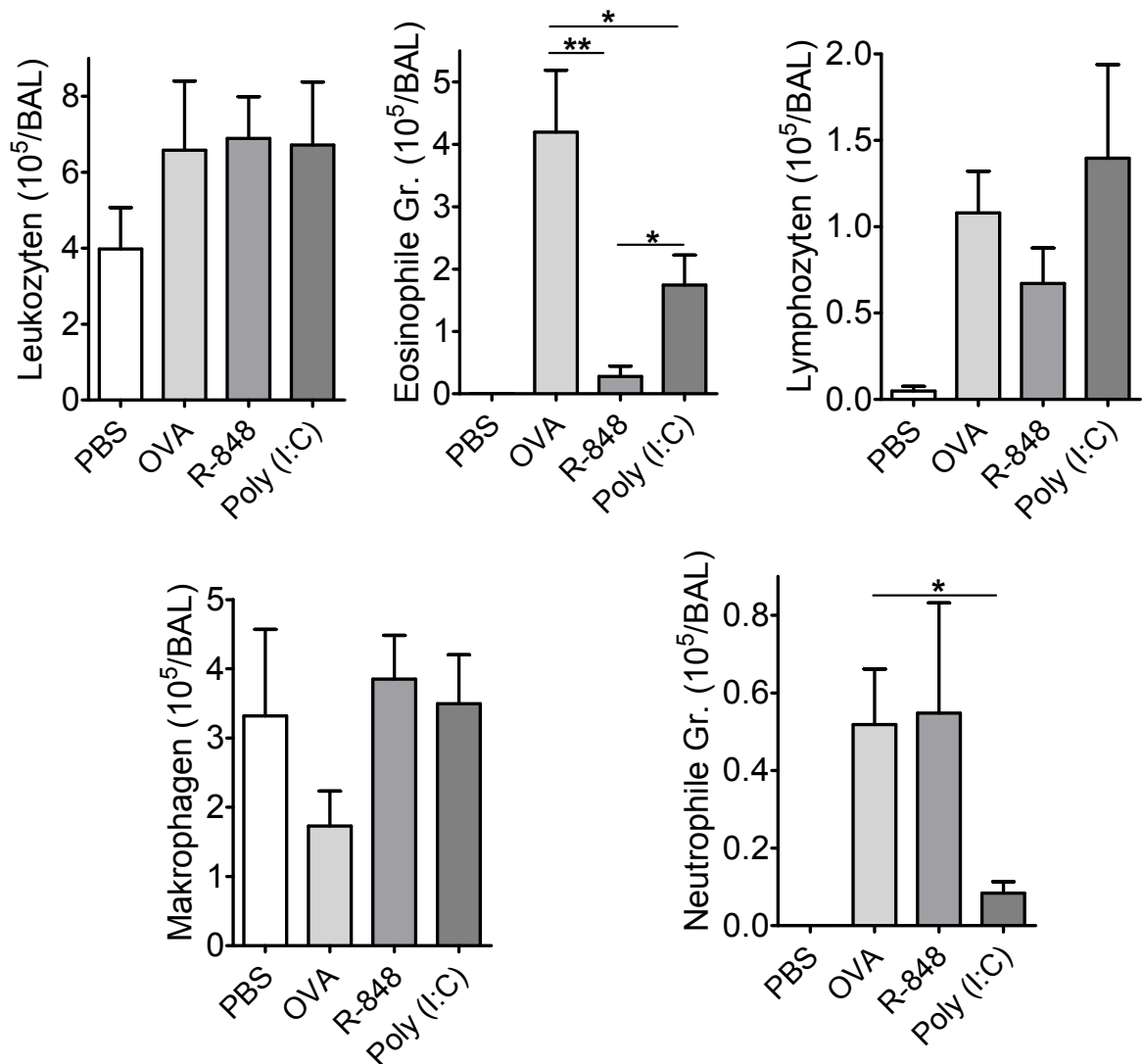


Abbildung 3.9: Mikroskopische Differenzierung der Leukozytensubpopulationen in der Broncho-alveolären Lavage. Am Analysetag (75. Tag) des Behandlungsprotokolls wurde die Trachea kanüliert und die Lunge mit kaltem PBS lavagiert. Von der gewonnenen BAL wurden Zytospins auf Objektträger angefertigt, die BAL-Zellen wurden mit Quick-Diff gefärbt und anschließend nach morphologischen Kriterien unter dem Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung differenziert. Die gesamte Zellzahl wurde im Casy Cell Counter bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (* p < 0,05; ** p < 0,01).

3.2.4 Die lokale Infiltration der Lunge wird durch R-848 oder Poly (I:C) vermindert

Zur Beurteilung des bronchialen Infiltrats wurde nach Sensibilisierung und Exposition der Balb/c Mäuse mit OVA und der Behandlung mit R-848 oder Poly (I:C) wie unter Material und Methoden beschrieben lungenhistologische Schnittpräparate angefertigt und mit PAS gefärbt.

Erwartungsgemäß zeigten Tiere, die einer Sensibilisierung gegen OVA und einer anschließenden OVA-Aerosol-Exposition ausgesetzt wurden (Positiv-Kontrolle), eine massive Infiltration der Atemwegsmukosa und der Atemwegsadventitia hauptsächlich durch eosinophile Granulozyten und in geringerem Umfang durch Lymphozyten (Abb.3.10). Die Lokalisation der Entzündung weist in den Atemwegen auf eine peribronchiale Infiltration hin und ist mit einer Entzündung der umliegenden Gefäße assoziiert.

Zusätzlich weisen die proximalen und distalen Atemwege ein dichtes Vorkommen von Becherzellen auf. Die Becherzellhyperplasie des Atemwegsepithels lässt auf eine erhöhte Mukusproduktion schließen. Diese Erscheinungsform der allergischen Atemwegsentzündung, ist mit dem des menschlichen Phänotyps „akutes allergisches Asthma“ vergleichbar.

Im Gegensatz zur Positiv-Kontrollgruppe sind bei PBS-behandelten Tieren in der Atemwegsmukosa keinerlei Entzündungszeichen zuerkennen und nur vereinzelt Becherzellen in den proximalen Abschnitten der Hauptbronchien nachweisbar.

Die Tiere, die mit R-848 oder Poly (I:C) behandelt wurden, zeigen im Vergleich zur Positiv-Kontrollgruppe eine deutliche Reduktion des leukozytären Infiltrats. In der Atemwegsmukosa und in der Atemwegsadventitia wurden nur vereinzelt eosinophile Granulozyten und Lymphozyten identifiziert. Becherzellen lassen sich nur stellenweise in den Atemwegsarealen der proximalen Bronchien nachweisen. Eine Becherzellhyperplasie wie bei den Positiv-Kontrolltieren ist weder nach der Behandlung mit R-848 noch mit Poly (I:C) feststellbar.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Behandlung mit den TLR-Liganden R-848 und Poly (I:C) zu einer eindeutigen Abnahme der entzündlichen Infiltration der Lunge mit Eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten sowie zu einer Reduktion der Becherzellhyperplasie mit folglich verminderter Schleimproduktion führt.

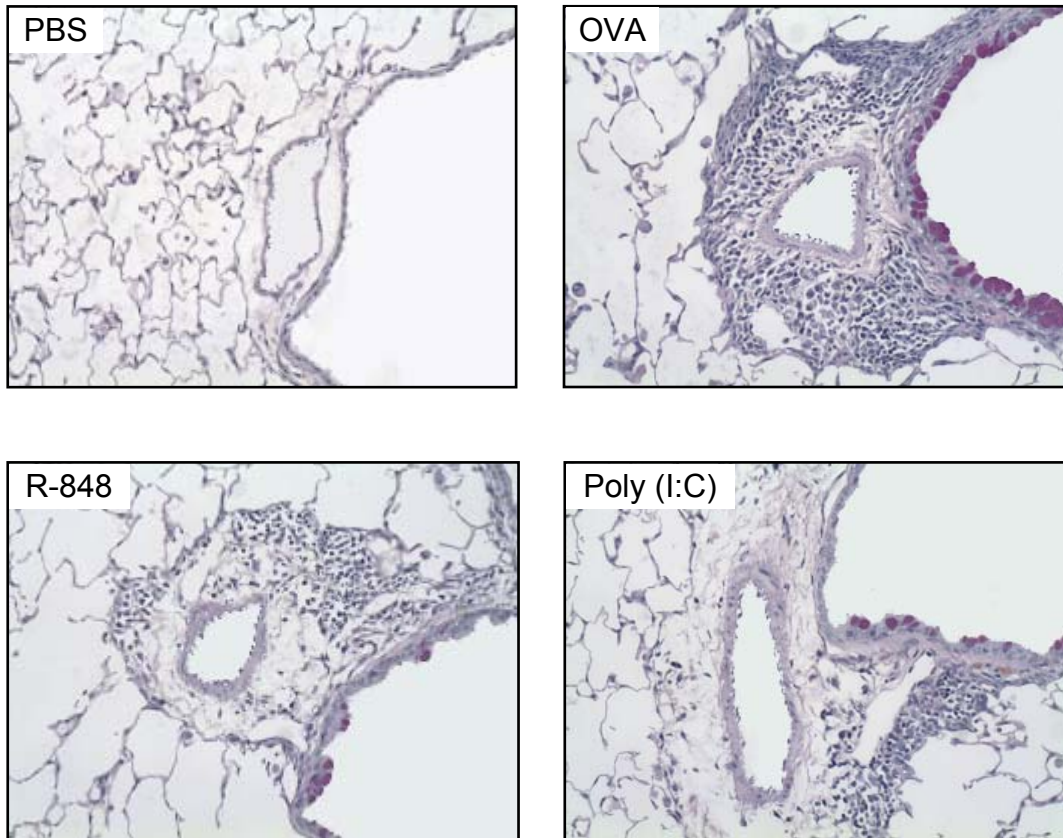


Abbildung 3.10: PAS-Färbung von lungenhistologischen Schnittpräparaten zur Charakterisierung des inflammatorischen Infiltrats. Am 75. Tag der Analyse wurden die Lungen, nach vorheriger Durchführung der BAL, entnommen, zuerst in Formalin fixiert und dann in Parafin eingebettet. An den anschließend angefertigten Schnittpräparaten wurde eine PAS-Färbung durchgeführt. Dargestellt sind repräsentative Lungenschnittpräparate von der Negativ-Kontrollgruppe, der Positiv-Kontrollgruppe, der R-848- und der Poly (I:C)-Behandlungsgruppe (Vergrößerung: 200fach)

3.2.5 Die Atemwegsreagibilität im Atemfunktionstest verringert sich nach TLR3/7 Aktivierung

Um die funktionelle Wirkung von R-848 und Poly (I:C) Behandlung auf die Atemwegsreagibilität zu untersuchen, wurden Lungenfunktionstests mittels Head-out- Body-Plethysmographie durchgeführt.

Initial wurden die Tiere zur Ermittlung der Lungenfunktion in normaler Ruhephase 15 Minuten im Head-out- Body-Plethysmographen belassen und der Ausgangswert des halbmaximalen expiratorischen Atemflusses (EF_{50}) ermittelt. Anschließend wurden die Tiere mit β -Acetyl-Methylcholin (MCh) Aerosol provoziert und diejenige Konzentration an MCh ermittelt, die zu einer 50%igen Reduktion dieses Ausgangswertes führte.

Hierbei zeigt sich, wie in der Abbildung 3.11 dargestellt, dass die Tiere aus der OVA-Positiv-Kontrollgruppe signifikant stärker auf MCh reagieren. Hier wurde die 50%ige Reduktion des halbmaximalen Atemflusses bereits bei einer MCh-Konzentration von $63,33 \pm 5,68$ mg/ml erreicht, während diese Abnahme der Lungenfunktion bei PBS-behandelten Tieren erst bei einer Konzentration von $105,3 \pm 8,45$ mg/ml erreicht war. Dies entspricht der Entwicklung einer Atemwegshyperreaktivität bei den OVA-behandelten Tieren.

Die Behandlung mit R-848 oder Poly (I:C) zeigte im Atemfunktionstest einen positiven Effekt auf die Atemwegshyperreagibilität, dass heißt, die Hyperreaktivität auf MCh war signifikant geringer ausgeprägt als in der Positiv-Kontrollgruppe. So wurde eine 50%ige Reduktion des halbmaximalen Atemflusses erst bei einer MCh-Konzentration von $129,1 \pm 2,09$ mg/ml (R-848) beziehungsweise $84,52 \pm 7,44$ mg/ml (Poly (I:C)) erreicht.

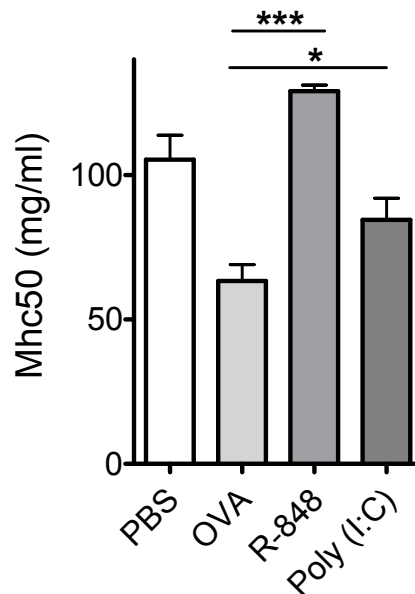


Abbildung 3.11: Atemwegsreaktivität nach Behandlung mit TLR-Liganden im Maus Modell für chronisches Asthma bronchiale (Messung mittels Head-out Body-Plethysmographie).

Am Tag 75 des Behandlungsprotokolls wurde die Atemwegsreaktivität von allen Tiergruppen mittels der Head-out Body-Plethysmographie (HOBP) durch einen Provokationstest, der die Reaktivität der glatten Bronchialmuskulatur auf die Entwicklung einer Atemwegshyperreagibilität (AHR) bestimmt, untersucht. Die Provokation der Atemwegshyperreagibilität wurde mit Acetyl- β -Methylcholin-Hydrochlorid (MCh), eines Bronchokonstriktors das einen unspezifischen Reiz auslöst, durchgeführt. Als Maß für die Atemwegsreaktivität (Bronchoobstruktion) wurde der EF_{50} -Wert erfasst und diejenige Konzentration an Metacholin (MCh) berechnet, bei der der EF_{50} -Wert unter 50 % des Baseline-Wertes gefallen war. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen wurden mittels t-Test analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (* $p \leq 0,05$ und *** $p \leq 0,001$).

3.2.6 TLR3/7 Aktivierung inhibiert die Entwicklung eines *Airway remodelling* in den distalen Atemwegen

Eine der charakteristischen Spätfolgen des chronischen Asthma bronchiale ist das so genannte *Airway remodelling*. Dieser strukturelle Umbau der Atemwege ist charakterisiert durch eine Becherzellhyperplasie, eine Hypertrophie des Atemwegepithels sowie die Hypertrophie und Hyperplasie von Myozyten in den distalen Atemwegen.

Um diese strukturellen Veränderungen nach einer Behandlung mit TLR3/7-Liganden im chronischen Maus-Modell für Asthma bronchiale zu untersuchen, wurden PAS-Färbungen von Lungenschnittpräparaten angefertigt. Die Becherzellmetaplasie in den kleinen Atemwegen wurden mittels *High Power Field* Mikroskopie durch die Auszählung von Becherzellen bei 50facher Vergrößerung quantifiziert. Hierzu wurden jeweils zehn Abschnitte pro Präparat ausgezählt und die Ergebnisse jeder Gruppe gemittelt.

Die, durch die OVA Exposition herbeigeführte Inflammation, induzierte in den distalen Lungenabschnitten eine Becherzellhyperplasie (Abb. 3.12 A) mit circa 34 Becherzellen in jedem ausgezähltem Ausschnitt.

Die, mit TLR-Liganden behandelten, Gruppen wiesen eine deutlich niedrigere Becherzellhyperplasie auf. Während nach Poly (I:C) Behandlung nur noch etwa 29 Becherzellen je Ausschnitt nachweisbar waren, so wurden in der R-848-Behandlungsgruppe sogar nur circa 18 Becherzellen nachgewiesen. In der Negativ-Kontrollgruppe wurden keine Becherzellen nachgewiesen.

Auch eine Verdickung des Atemwegsepithels war nach der TLR-Behandlung im Vergleich zur Negativ-Kontrollgruppe nicht nachweisbar (Abb. 3.12 B). Während die Dicke des Atemwegsepithels hier mit $6,41 \pm 0,32 \mu\text{m}$ (R-848) beziehungsweise $6,64 \pm 0,27 \mu\text{m}$ (Poly (I:C)) der Dicke des Atemwegsepithels bei PBS-behandelten Mäusen ($6,46 \pm 0,32 \mu\text{m}$) entsprach, wurde bei den OVA-behandelten Mäusen ($9,31 \pm 0,51 \mu\text{m}$) eine deutliche Verdickung durch Einlagerung der kollagen Fasern im Sinne eines *Airway remodelling* nachgewiesen.

Diese Ergebnisse wurden durch Färbung von *alpha-smooth muscle actin* (α -SMA), einem Marker für glatte Muskelzellen und Myofibrozyten in Lungenpräparaten bestätigt. Die oben beschriebene Verdickung des Atemwegsepithels wird unter anderem durch die Proliferation von Muskelzellen und Myofibrozyten bedingt.

So wurde in der OVA-Kontrollgruppe ($1,79 \pm 0,08 \mu\text{m}$) erwartungsgemäß eine Verdickung der α -SMA-positiven Zellschicht gegenüber der PBS-Kontrollgruppe ($1,57 \pm 0,08 \mu\text{m}$) nachgewiesen (Abb. 3.12 C), während die Dicke der α -SMA-positiven Zellschicht sowohl nach Poly (I:C) ($1,38 \pm 0,06 \mu\text{m}$) als auch R-848 Behandlung ($1,47 \pm 0,10 \mu\text{m}$) im Wesentlichen der Negativ-Kontrolle entsprach.

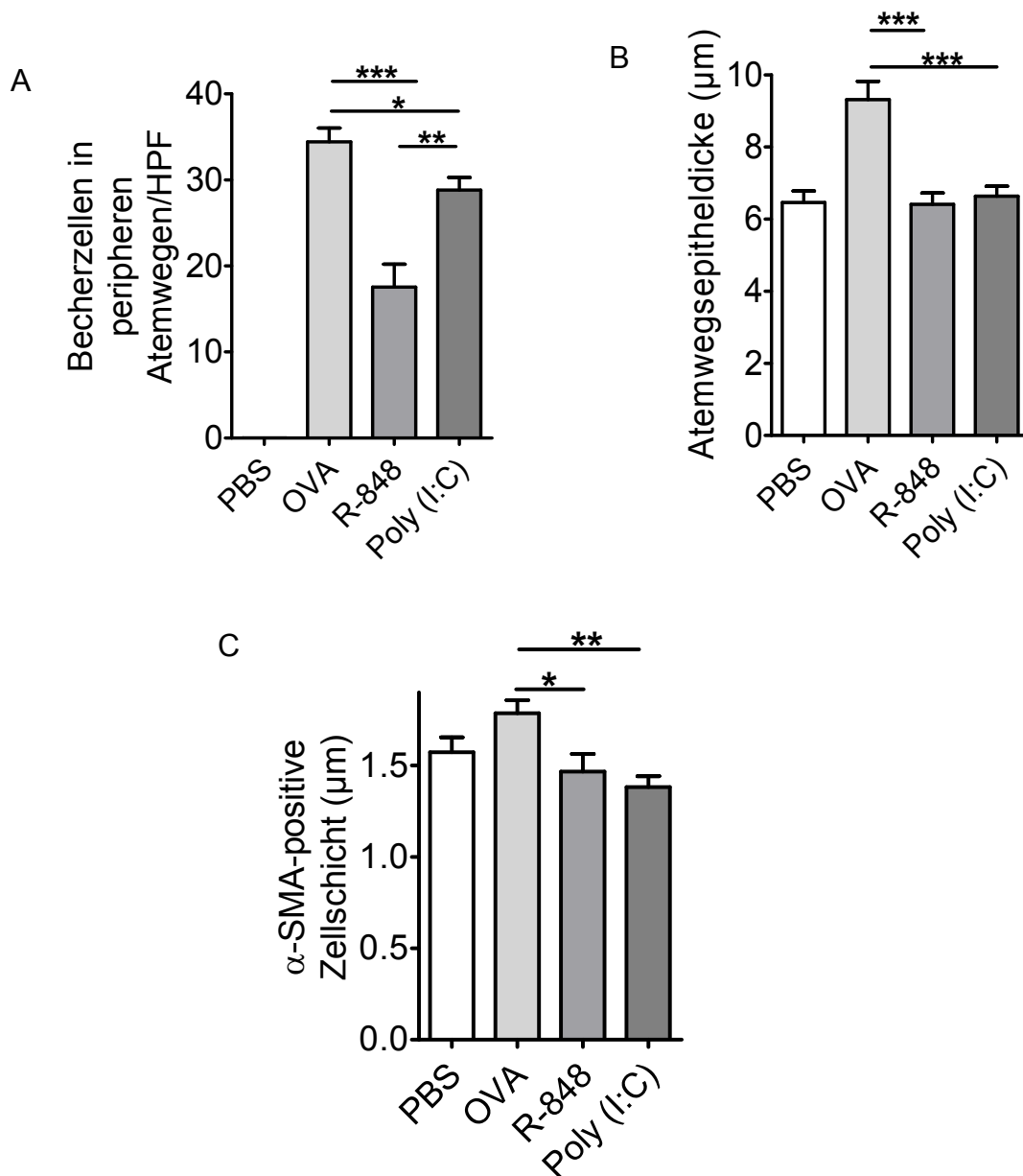


Abbildung 3.12: Becherzellhyperplasie und morphologische Veränderung werden durch die Applikation von R-848 oder Poly (I:C) im chronischen Modell für Asthma bronchiale inhibiert. Die Anzahl der Becherzellen in PAS gefärbten Lungenschnittpräparaten wurde im High Power Field Mikroskopie ermittelt (**A**). Die Schichtdicke des Atemwegsepithels (**B**) und des α -smooth muscle actin (α -SMA)-positive glatte Muskelzellen (**C**) wurden in Lungenparafinschnitten quantifiziert. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen wurde mittels t-Test analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$).

4. Diskussion

Virale Infektionen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale. So wurden frühkindliche RSV-Infektionen als wichtige Risikofaktoren in Entwicklung von Asthma bronchiale bei entsprechend empfänglichen Individuen identifiziert. Darüber hinaus triggern virale Infektionen bei Patienten mit bereits etabliertem Asthma eine akute Exazerbation (Mallia and Johnston, 2002; Potena et al., 2007).

Demgegenüber stehen epidemiologische sowie experimentelle Untersuchungen die zeigen, dass wiederholte virale Infektionen der oberen Atemwege einen protektiven Effekt auf die Entwicklung eines allergischen Asthma aufweisen (Alm et al., 1999; Martinez, 2005; Shaheen et al., 1996; von Mutius et al., 1999).

Einen möglichen Mechanismus stellt die Bindung virale Nukleinsäuren an die *Toll-like* Rezeptoren 3 und 7 dar, wodurch es über die Aktivierung des angeborenen Immunsystems zu einer Verschiebung der TH2-dominierte Immunantwort in Richtung TH1-Antwort kommt und somit die allergische Immunantwort abgemildert werden könnte.

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe synthetischer Liganden der Einfluss von TLR3 (Poly (I:C)) und TLR7 (R-848) auf den allergischen Phänotyp im Maus-Modell für akutes und chronisches Asthma untersucht. Initial wurde hierbei zunächst die optimale Applikationsroute dieser Immunmodulatoren ermittelt.

Die Epithelzellen des Respirationstraktes bilden die äußere Barriere der Lunge und stellen die initiale Kontaktstelle sowohl für Pathogene als auch für inhalierte Allergene dar. Dabei wirken die Epithelzellen nicht nur als einfache physikalische Barriere, sondern tragen durch die Synthese von antimikrobiellen Peptiden, Zytokinen und Chemokinen zur Immunabwehr bei (Bals and Hiemstra, 2004; Hamilton et al., 2001; Holgate et al., 2000).

Diese Rolle wird durch die Expression von TLR-Rezeptoren unterstützt (Armstrong et al., 2004; Ewaschuk et al., 2007; Greene and McElvaney, 2005; Hornef and Bogdan, 2005; Lin et al., 2007; Ritter et al., 2005b).

Interessanterweise wurde für pulmonale Epithelzellen eine konstitutive Expression von TLR3 auf der Zelloberfläche nachgewiesen (Hewson et al., 2005), während TLR3, wie auch TLR7 und TLR8, typischerweise endosomal lokalisiert sind (Hattermann et al., 2007a; Matsumoto et al., 2003).

Darüber hinaus ist die Expression von TLR3 beziehungsweise TLR7 für glatte Muskelzellen der Lunge (Sukkar et al., 2006), sowie infiltrierende Immunzellen, wie Neutrophile Granulozyten (Hayashi et al., 2003; Mytar et al., 2004; Werling et al., 2004) aber auch für residente Zellen wie Makrophagen (Zarembek and Godowski, 2002) nachgewiesen worden.

Somit stellt die lokale pulmonale Applikation von Poly (I:C) beziehungsweise R-848 durchaus eine Möglichkeit dar, durch eine relativ schonende Behandlung, immunmodulatorisch in die Pathophysiologie des Asthma bronchiale einzugreifen.

Da auch Makrophagen des Peritonealraums TLR3 und TLR7 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren und bereits gezeigt wurde, dass diese in Reaktion auf eine *in-vitro* Stimulation durch Poly (I:C) beziehungsweise R-848 mit der Ausschüttung von IL-12, IFN- und IL-10 (Mytar et al., 2004; Werling et al., 2004) reagieren, wurde zur Ermittlung der optimalen Applikationsroute Poly (I:C) systemisch mittels intraperitonealer Injektion appliziert und vergleichend den Effekten einer lokalen intranasalen Applikation gegenübergestellt.

4.1 Deutliche Verbesserung des akuten Asthma Phänotyps durch systemische Applikation von Poly (I:C) im Maus-Modell

Sowohl die intranasale als auch die systemische Applikation von Poly (I:C) führt zu einer deutlichen Reduktion der IgE-Spiegel im Serum von OVA-sensibilisierten Mäusen, wobei dieser Effekt nach systemischer Poly (I:C) Gabe signifikant stärker war.

Hinsichtlich der IgG1- und IgG2a-Konzentrationen konnten gegenüber der OVA-Kontrollgruppe weder nach intranasaler noch nach systemischer Applikation Veränderungen detektiert werden.

Mit Poly (I:C) behandelte Tiere weisen unabhängig von der Applikationsroute im Vergleich zur OVA-Kontrollgruppe erniedrigte IL-5 Konzentrationen in der BAL-Flüssigkeit auf. Auch hier ist der Effekt nach systemischer Applikation deutlicher ausgeprägt.

Ein Charakteristikum der allergischen Entzündungsreaktion im Rahmen eines Asthma bronchiale ist die Infiltration von Leukozyten (vornehmlich eosinophiler Granulozyten) in das Lungenparenchym sowie Lumen. Die intraperitoneale (i.p.) wie auch intranasale (i.n.) Applikation von Poly (I:C) führte in OVA-sensibilisierten Mäusen zu einer deutlichen Reduktion eosinophiler Granulozyten in der BAL und somit im Atemwegslumen. Dies belegt eine verminderte allergische Entzündung innerhalb des Lumens bei Poly (I:C) behandelten Mäusen.

Innerhalb des Lungenparenchyms konnte dieser positive Effekt auf die allergische Entzündung allerdings nur nach i.p. Applikation von Poly (I:C) nachgewiesen werden.

Der positive Effekt von Poly (I:C) auf die eosinophile Infiltration kann durch die beschriebene Absenkung der IL-5-Spiegel im Serum erklärt werden, da IL-5 eine herausragende Rolle bei der eosinophilen Entzündung, hinsichtlich der Differenzierung (Ochiai et al., 1995), Aktivierung (Pazdrak et al., 1995), Priming (Sampson, 2001) sowie dem zellulären Überleben (Yamaguchi et al., 1988a; Yamaguchi et al., 1988b) einnimmt.

Ein weiterer Aspekt der entzündlichen Veränderungen im Rahmen eines Asthma bronchiale ist die Hyperplasie des Epithels in Mukus-produzierende Zellen (Becherzellhyperplasie). Durch PAS-Färbung von lungenhistologischen Schnittpräparaten konnte gezeigt werden, dass die systemische Behandlung von OVA-sensibilisierten Mäusen mit Poly (I:C), nicht jedoch die lokale Applikation, eine Becherzellhyperplasie effektiv unterdrückt. Die histologische Morphologie entspricht hierbei im Wesentlichen der Kontrollgruppe.

Erwartungsgemäß zeigten die systemisch behandelten Tiere auch bei der Lungenfunktionsmessung keinen Unterschied zu PBS behandelten Tieren, während lokal behandelte Tieren entsprechend den OVA-sensibilisierten Mäusen eine deutlich erhöhte Atemwegsreagibilität aufwiesen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die lokale (i.n.) Applikation von Poly (I:C) nur partielle Effekte auf einen bestehenden Asthma-Phänotyp hat. Durch die systemische Applikation wurden jedoch sowohl die Charakteristika einer akuten allergischen Entzündung als auch die Lungenfunktion positiv beeinflusst. Somit ist die systemische Applikation der lokalen Anwendung von Poly (I:C) deutlich überlegen.

Gegen eine lokale Applikation von Poly (I:C) sprechen auch neuere Untersuchungen von Stowell et al. (Stowell et al., 2009), die zeigten, dass die wiederholte intranasale Gabe von Poly (I:C) in C57B6- Mäusen (WT) eine deutliche Entzündungsreaktion der Lunge induziert, gekennzeichnet durch eine Infiltration der Lunge mit Entzündungszellen (hauptsächlich Neutrophilen), der Ausschüttung inflammatorischer Zytokine und einer verminderten Lungenfunktion. Es ist anzunehmen, dass diese Effekte ursächlich auf die Aktivierung von TLR3 zurückgehen, da TLR3-*knock-out* Mäuse von diesen entzündlichen Veränderungen ausgenommen sind.

Die Tatsache, dass derartige Effekte in dieser Arbeit nicht beobachtet wurden, kann auf die deutlich kürzere Expositionszeit beziehungsweise die geringere Expositionsfrequenz im Rahmen dieser Arbeit zurückgeführt werden.

Bei der Untersuchung der Effekte von Poly (I:C) und R-848 auf die Pathophysiologie eines chronischen Asthma bronchiale wurden diese deshalb systemisch appliziert.

4.2 Positiver Einfluss von R-848 und Poly (I:C) auf die Entwicklung von chronischem Asthma bronchiale im Maus-Modell

Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, welchen Effekt die TLR-Liganden Poly (I:C) (TLR3) und R-848 (TLR7) innerhalb eines Maus-Modells für chronischen Asthma-Modells aufweisen.

Dieses Modell reflektiert eine Reihe von Charakteristika, die auch die Pathophysiologie des humanen chronischen Asthma bronchiale kennzeichnen, wie die fortschreitende Entzündung der Atemwege sowie strukturelle Veränderungen der Lunge (*Airway remodelling*), und basiert auf der Sensibilisierung von Balb/C-Mäusen gegen Ovalbumin mit wiederholter OVA-Aerosol-Exposition (Wegmann, 2008; Wegmann and Renz, 2005).

Basierend auf dem beschriebenen chronischen Asthma-Modell konnte gezeigt werden, dass sowohl die Applikation von Poly (I:C) als auch R-848 im Vergleich zur Positiv-Kontrollgruppe zu einer deutlichen Reduktion der IgE-Spiegel im Serum führt. Dies liegt in Konkordanz zu den Poly (I:C) Effekten im akuten Maus-Modell. Zusätzlich wurden bei den mit R-848 behandelten, nicht jedoch bei mit Poly(I:C) behandelten, Mäusen erniedrigte IgG1- und erhöhte IgG2a-Konzentrationen nachgewiesen. Dies könnte durch die beobachteten erhöhten IL-12-Spiegel erklärt werden und weist auf die Induktion einer OVA-spezifischen TH1-Antwort hin. Es ist bekannt, dass IL-12 die Produktion IgG2a erhöht sowie die Produktion von IgE und IgG1 unterdrückt, während IL-4 die Synthese von IgE und IgG1 fördert (Germann et al., 1995; Stavnezer, 1996).

Die durch IL-12 vermittelte Induktion der IFN- γ -Produktion antagonisiert zudem viele Effekte, die durch IL-4 und IL-5 hervorgerufen werden (Elser et al., 2002), wie den Influx Eosinophile Granulozyten in die Atemwege oder die Produktion von IgE und IgG1.

Diese unterschiedlichen Effekte von Poly (I:C) und R-848 auf die Produktion OVA-spezifischer Antikörper konnten wir auch in anderen Untersuchungen belegen (Sel et al., 2007). Auch hier führte nur die Verabreichung von R-848 zum Anstieg der IgG2a-Produktion.

Dies könnte auf die differentielle Expression von TLR3 und TLR7 auf APCs und T-Zellen zurückgeführt werden (Kabelitz, 2007; Zarembler and Godowski, 2002), da murine T-Zellen zwar TLR7 nicht jedoch TLR3 exprimieren und somit R-848 einen direkten Einfluss auf diese Zellen ausüben kann, nicht jedoch Poly (I:C). Für humane T-Zellen wurde *in vitro* in diesem Zusammenhang unter dem Einfluss von R-848 bereits ein direkter Shift von IL-4 produzierenden T-Zellen in IFN- γ produzierende T-Zellen beschrieben (Brugnolo et al., 2003).

Darüber hinaus ist auch ein direkter Effekt auf B-Lymphozyten anzunehmen, da *in vitro* Untersuchungen bereits gezeigt haben, dass die Zugabe von R-848 direkt die IgE-Synthese durch B-Lymphozyten erniedrigt, was zum Teil durch eine verminderte Zellteilung nach R-848 Zugabe erklärt werden kann (Shen et al., 2008).

Die Konzentration des TH2-Zytokins Interleukin-5 (IL-5) lag in der BAL-Flüssigkeit sowohl bei Poly (I:C), als auch bei R-848 behandelten Mäusen, auf dem Niveau der Negativ-Kontrolle. Im Gegensatz dazu weisen die Mäuse der OVA-Kontrollgruppe deutlich erhöhte IL-5 Werte auf.

Es wurde bereits anhand von *in vitro* Untersuchungen nachgewiesen, dass die Inhibition der IL-5 Produktion durch R-848 durch IFN- α vermittelt wird (Gibson et al., 1995; Wagner et al., 1999), welches von humanen Monozyten und murinen Makrophagen nach Stimulation mit Imidazoquinolinen ausgeschüttet wird (Gibson et al., 1995; Reiter et al., 1994). Da IFN- α darüber hinaus eine Reihe weitere TH2 vermittelter Immunreaktionen inhibiert, wie die Entwicklung von TH2-Zellen (Parronchi et al., 1996), die IL-4 Synthese durch TH2-Zellen (Parronchi et al., 1992), die IgE Produktion (Finkelman et al., 1991) sowie die Allergie-assoziierte Eosinophilie (Nakajima et al., 1994; Paukkonen et al., 1993), sollte in weiterführenden Untersuchungen, beispielsweise durch den Einsatz von anti-IFN- α , die Beteiligung von IFN- α bei den hier beschriebenen TLR-vermittelten Effekten untersucht werden.

Demgegenüber lagen bei den Poly (I:C) beziehungsweise R-848 behandelten Mäusen deutlich erhöhte IL-12 Spiegel vor, während die IL-12-Konzentrationen der PBS- sowie OVA-Gruppe auf vergleichbarem Niveau lagen.

Interleukin-12 wird hauptsächlich von dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen produziert (Guillaume et al., 1996; Macatonia et al., 1995; Yoshimoto et al., 1998). Es ist bekannt, dass IL-12 die Entwicklung naiver CD4⁺ T-Zellen in Richtung TH1-Phänotyp dirigiert sowie die IFN- γ -Produktion durch CD4⁺ T-Zellen verstärkt und damit als potenter Induktor einer TH1-Antwort wirkt (Hsieh et al., 1993; Macatonia et al., 1993; Trinchieri et al., 1992).

Demzufolge könnte die Induktion einer kompensierenden TH1-Antwort zumindest teilweise die Abschwächung der TH2-dominierten allergischen Immunantwort erklären.

Es wurde bereits gezeigt, dass die Stimulation von DCs mit verschiedenen TLR-Liganden, wie LPS oder CpG die Produktion von IL-12 induziert (Hochrein et al., 2001).

Eine derartige induzierte IL-12 Produktion wurde durch uns in der peritonealen Lavage nach Poly (I:C) oder R-848 Administration (Sel et al., 2007) sowie in restimulierten MNCs bei Koapplikation dieser Liganden bereits nachgewiesen. Dies zeigt, dass die Effekte der TLR-Liganden auf die allergische Immunreaktion zumindest teilweise durch IL-12 vermittelt werden. Unterstrichen wird diese Hypothese durch Untersuchungen mit IL-12p35 defizienten Mäusen. Diese Mäuse produzieren kein bioaktives IL-12. Die Applikation von Poly (I:C) oder R-848 hatte hier keinen Effekt auf die allergische Atemwegsentzündung oder Becherzellhyperplasie (Sel et al., 2007).

Entsprechend der Pathophysiologie des allergischen Asthma, zeigt die BAL-Flüssigkeit der OVA-Kontrollgruppe eine deutlich erhöhte Anzahl Eosinophiler Granulozyten in der BAL. Die Applikation der TLR-Liganden führte hier zu einer massiven Reduktion, wobei der Effekt von R-848 deutlicher ausgeprägt war als bei der Anwendung von Poly (I:C). In beiden Gruppen stellen Makrophagen die dominierende Leukozytenpopulation dar. Dies entspricht den Ergebnissen der PBS-Kontrolle.

Die Verminderung der inflammatorischen Infiltration der Lunge durch die Behandlung mit R-848 beziehungsweise Poly (I:C) wurde auch anhand von lungenhistologischen Untersuchungen belegt.

Während Mäuse der OVA-Kontrollgruppe alle Charakteristika einer schweren allergischen Atemwegsentzündung mit massiven Infiltrationen eosinophiler Granulozyten und Lymphozyten sowie einer ausgeprägten Becherzellhyperplasie zeigen, liegen nach Behandlung mit Poly (I:C) beziehungsweise R-848 nur noch stellenweise Becherzellen und vereinzelt leukozytäre Infiltrate in der Atemwegsmukosa und Atemwegsadventitia vor.

Die Produktion hoher IL-12-Spiegel bei gleichzeitigem Fehlen einer messbaren TH1-Aktivität oder TH1-assoziierten Lungenpathologie könnte durch eine Gruppe regulatorischer T-Zellen erklärt werden, die TH1-Zellen ähneln. Diese TH1-regulatorischen T-Zellen entwickeln sich *in vivo* in Anwesenheit von IL-10 und IL-12 aus naiven CD4⁺CD25⁻T-Zellen während einer TH1-polarisierten Immunantwort. Im Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass diese Zellen durch die Produktion von IL-10 und IFN- γ sowohl die allergische Atemwegsentzündung als auch die Atemwegshyperreagibilität supprimieren (Stock et al., 2004; Stock et al., 2006).

Da das Ausmaß der Entzündungsprozesse in der Lunge mit der Ausprägung der Atemwegshyperreagibilität (AHR) korreliert, wurde erwartet, dass die AHR innerhalb den behandelten Gruppen deutlich geringer ausgeprägt ist als in der Positiv-Kontrollgruppe. Dies konnte durch Lungenfunktionsmessungen bestätigt werden.

Von besonderer Bedeutung bei der Chronifizierung eines Asthma bronchiale sind strukturelle Veränderungen, verursacht durch die Interaktion inflammatorischer Mediatoren mit Strukturzellen sowie Entzündungsbedingte Gewebeschäden, die als *Airway remodelling* bezeichnet werden und die dazu dienen Gewebeschäden zu reparieren und die Luftwege intakt zu halten.

Hierzu zählen unter anderem die allgemeine Verdickung epithelialer und subepithelialer Schichten, fortschreitende Kollageneinlagerung, Hypertrophie und Hyperplasie der glatten Muskulatur und Verringerung der Mikrozirkulation im Bronchialsystem.

Die Aktivierung der TLR3- beziehungsweise TLR7-Rezeptoren inhibiert im gewählten Maus-Modell die Entwicklung des Atemwegsumbaus. So sind in den peripheren Atemwegen im Vergleich zur OVA-Kontrollgruppe weit weniger mukusproduzierende Becherzellen vorhanden. Hinsichtlich der Atemwegsepitheldicke ist im Gegensatz zur Positiv-Kontrolle weder bei Poly (I:C) noch bei R-848 behandelten Mäusen eine Verdickung verglichen mit der PBS Gruppe nachweisbar. Auch eine Verdickung der α -SMA-positiven Zellschicht ist in diesen Gruppen nicht nachweisbar.

Dies könnte, zumindest teilweise, durch die in dieser Arbeit beschriebene deutliche Erniedrigung der TGF- β -Konzentration in der BAL-Flüssigkeit bei Behandlung mit R-848 erklärt werden. TGF- β ist ein profibrotisch wirkendes Zytokin, das eine wichtige Rolle bei der Progression des Atemwegs-Umbaus spielt (Alcorn et al., 2008; Makinde et al., 2007; Zhou et al., 2007), indem es in Fibroblasten die Synthese von Kollagen stimuliert (Blobe et al., 2000).

Als möglicher Mechanismus durch den R-848 die TGF- β -Konzentration senkt, ist zum einen ein direkter Effekt auf TGF- β -produzierende Zellen, wie Makrophagen denkbar, da diese TLR7 exprimieren (Sabet et al., 2006). Ein derartiger direkter Effekt wurde bereits durch *in vitro* Studien für immunstimulatorische DNA-Sequenzen (ISS), einem Liganden von TLR9, nachgewiesen (Youn et al., 2004).

Als weitere Quelle für TGF- β im Rahmen eines allergischen Asthma kommen eosinophile Granulozyten und mononukleäre Zellen in Frage (Balzar et al., 2005; Ohno et al., 1996). Da die Infiltration dieser Zellen in die Lunge nach Behandlung mit R-848 beziehungsweise Poly (I:C) deutlich erniedrigt ist, erscheint es wahrscheinlich, dass dadurch die TGF- β -Konzentration in der BAL sinkt.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch die Aktivierung von TLR3 beziehungsweise TLR7 durch die Applikation von synthetischen Liganden eine TH1-gerichtete Immunantwort initiiert wird, während TH2-vermittelte Immunreaktionen abgeschwächt werden.

So führte sowohl die Applikation von R-848 als auch Poly (I:C) zur Abnahme von der Konzentration an OVA-spezifischem IgE sowie IL-5, während die Konzentration von IL-12 deutlich anstieg. Darüber hinaus induzierte R-848 eine verstärkte Synthese von OVA-spezifischem IgG2a.

Dies unterstreicht, dass TLRs neben ihrer Rolle innerhalb der angeborenen Infektabwehr auch einen entscheidenden Einfluss auf die Balance von TH1/TH2-Zellen haben (Dabbagh and Lewis, 2003) und somit regulierend innerhalb der Pathogenese bei TH2 polarisierten allergischen Erkrankungen wie Asthma wirken (Chaudhuri et al., 2005). Dieser Effekt wurde auch für den TLR1/TLR2 spezifischen Agonisten Pam₃CSK₄ (Lombardi et al., 2008) und hohe Dosen des TLR4 Liganden LPS (Rodriguez et al., 2003) nachgewiesen. Die Anwendung dieser TLR-Liganden führte im Asthma-Modell zu einer Re-Äquilibrierung der Zytokin-Expression und Induktion einer TH1-Antwort mit positiven Effekten auf den Krankheitsverlauf.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Anwendung synthetischer TLR3- und TLR7-Liganden im Rahmen eines Asthma bronchiale eine viel versprechende Therapieoption darstellt, die direkt in den zugrundeliegenden Mechanismus einer TH2-vermittelten allergischen Entzündung eingreift und durch Verschiebung der TH1-TH2-Balance in Richtung TH1 zahlreiche Charakteristika eines allergischen Asthmas positiv beeinflusst. Dazu zählen sowohl Parameter der allergischen Entzündung, als auch positive Effekte auf das *Airway remodelling* und die Lungenfunktion.

Bisherige Behandlungsstrategien eines Asthma bronchiale basieren im Wesentlichen auf der Anwendung von Bronchodilatoren (β_2 -Sympathomimetika) in Kombination mit Corticosteroiden.

Durch die Inhalation der β_2 -Sympathomimetika wird die Atemnot während eines akuten Asthma-Anfalls durch Dilatation der glatten Muskulatur der Bronchien aufgehoben beziehungsweise deutlich reduziert, während die Anwendung inhalativer Corticosteroide (ICS) direkt die Entzündungsreaktion unterdrückt (Barnes, 1998) und damit zahlreiche Symptome eines Asthma bronchiale reduziert.

Eine optimale Therapieoption stellen beide Substanzklassen dennoch nicht dar, da sie ausschließlich die akute Symptomatik der Bronchokonstriktion beziehungsweise allergischen Inflammation positiv beeinflussen, aber keinen Einfluss auf die zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen haben. Darüber hinaus weisen Corticosteroide eine Reihe von Nebenwirkungen auf, so dass neue innovative Ansätze dringend nötig sind.

In dieser Hinsicht nehmen Therapie-Ansätze, die auf der Aktivierung von *Toll-like* Rezeptoren basieren, eine herausragende Stellung ein.

Dass die Anwendung solcher Immunmodulatoren in der Humanmedizin prinzipiell möglich ist, wurde bereits im Rahmen der Behandlung anderer Erkrankungen gezeigt.

So wird das R-848-Analogon R837 unter dem Handelsnamen Aldara[®] (Imiquimod Creme 5%) zur topischen Therapie humaner Feigwarzen (*Condylomata acuminata*) im Genital/Perianal-Bereich, die durch humane Papillomaviren verursacht werden, angewandt (Owens et al., 1998; Syed et al., 2000; Wigbels et al., 2001). Dabei basiert die therapeutische Wirkung nicht auf einer direkten antiviralen oder antiproliferativen Wirkung sondern auf der Induktion verschiedener Zytokine, wie: IFN- α , IFN- γ , TNF- α oder IL-12 (Gibson et al., 1995; Testerman et al., 1995; Vasilakos et al., 2000a; Wagner et al., 1999).

Auch bei rezidivierenden Herpes simplex Infektionen (HSV-2) wurde für R-848 ein protektiver Effekt beschrieben (Bernstein et al., 2001; Gill et al., 2008). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Imiquimod das Wachstum von Blasentumorzellen effektiv hemmt (Smith et al., 2007).

Neben einem direkten therapeutischen Einsatz der TLR-Liganden zur Behandlung allergischer Erkrankungen, stellt die Verwendung dieser Immunmodulatoren im Rahmen einer sogenannten Allergen-spezifischen Immuntherapie (*allergen-specific immunotherapy*, SIT) eine weitere interessante Option dar. Während der Allergen-spezifischen Immuntherapie werden ansteigende Mengen eines Allergens über einen längeren Zeitraum appliziert, um letztendlich bei erneuter Allergenexposition die allergische Reaktion zu unterdrücken beziehungsweise abzumildern (Akdis and Akdis,

2007; Bohle, 2008; Mobs et al., 2008). Bei den Adjuvantien, die momentan bei einer SIT angewendet werden, handelt es sich um Aluminium- oder Calciumsalze.

Diese besitzen zwar eine gute Verträglichkeit, zeichnen sich aber durch eine schwache T-Zell-Antwort aus. Darüber hinaus wird hauptsächlich die Synthese von IgE induziert (Francis and Durham, 2004). Dies ist natürlich denkbar unvorteilhaft, soll doch eine Immunantwort induziert werden, die sich gegen IgE-vermittelte Allergien richtet.

Durch die Verwendung von TLR-Liganden als Adjuvantien, könnte diese Immunantwort in Richtung TH1 und somit in Richtung Produktion von IgG2a verschoben werden. Untersuchungen an Mäusen, haben bereits nachgewiesen, dass dies effektiv möglich ist. So konnte gezeigt werden, dass der Einsatz Poly (I:C), CpG und LPS zu einer deutlichen TH1-Antwort führt und darüber hinaus, die Dauer der SIT positiv beeinflusst wird (Bohle, 2002; Johansen et al., 2005). Neuere Untersuchungen haben bei der Verwendung sogenannter poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) Nanopartikel in Kombination im immunstimulatorischen Oligodeoxynukleotiden (CpGs) ähnliche Effekte beschrieben (Martinez Gomez et al., 2007).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass die Aktivierung von TLR3 und TLR7 durch die systemische Applikation von synthetischen Liganden eine innovative Therapieoption in der Behandlung allergischer Erkrankungen darstellt, wobei weitere Untersuchungen sicherlich notwendig sind, um beispielsweise im Rahmen von Langzeit-Expositionen, mögliche Nebenwirkungen aufzudecken.

5. Zusammenfassung

Das allergische Asthma bronchiale ist eine komplexe Erkrankung der Lunge, die mit einer chronischen Entzündungsreaktion der Atemwege, einer bronchialen Hyperreagibilität, Atemwegsobstruktion sowie strukturellen Veränderungen der Lunge im Sinne eines *Airway remodelling* assoziiert ist.

Eine zentrale Komponente innerhalb der Pathogenese des allergischen Asthmas bildet die gestörte Homöostase zwischen TH1 und TH2 Lymphozyten mit einer vorherrschenden TH2-Immunantwort. Dabei führt die Ausschüttung von TH2-typischen Zytokinen, wie IL-4, IL-5, IL-13 und GM-CSF nach Allergen-Exposition zur Aktivierung und Rekrutierung von Eosinophilen Granulozyten in die Lunge, zur Mastzelldegranulation und einem Switch der Antikörperproduktion zur Synthese von IgE durch B-Zellen.

Epidemiologische Untersuchungen führten zu der Überlegung, dass die niedrigere Infektionsrate sowie die geringere Exposition mit bakteriellen Bestandteilen in industrialisierten Ländern, die Ursache für die Polarisierung in Richtung TH2 darstellt. Die Schaffung eines Milieus, in dem durch die selektive Aktivierung der TH1-Immunantwort die Entwicklung von TH2-Zellen unterdrückt wird, stellt aus diesen Gründen die Basis für die Entwicklung neuartiger Behandlungsstrategien für allergisches Asthma bronchiale dar.

Die Entwicklung und Regulation der Effektorfunktionen von TH-Zellen steht unter enger Kontrolle der angeborenen Immunantwort, vornehmlich durch Bindung hochkonservierter Pathogen-assoziiertes Muster (PAMPs) an *Toll*-like Rezeptoren (TLR) auf verschiedenen Immunzellen, aber auch Strukturzellen, was letztendlich zur Aktivierung dieser Zellen und Ausschüttung verschiedener Mediatoren führt.

So wurde beispielweise gezeigt, dass variable TLR-Liganden wie bakterielle Bestandteile die Produktion von IL-12 in dendritischen Zellen stimulieren und dadurch die TH2-Antwort in Maus-Modellen für allergisches Asthma effektiv unterdrückt wird.

Es ist seit langem bekannt, dass eine inverse Beziehung zwischen viralen Infektionen, wie Hepatitis A oder Masern, und der Etablierung eines allergischen Asthma bronchiale besteht.

Dies führt zu der Hypothese, dass die Aktivierung von TLR3 beziehungsweise TLR7 durch synthetische Liganden den TH2-vermittelten allergischen Phänotypen unterdrückt.

In dieser Arbeit wurde der Effekt der synthetischen TLR-Liganden Poly (I:C) (TLR3) und R-848 (TLR7) auf den allergischen Phänotypen im Maus-Modell für chronisches Asthma bronchiale untersucht.

Im Gegensatz zu vorherigen Untersuchungen, die ausschließlich die Effekte von Poly (I:C) und R-848 auf die Etablierung beziehungsweise Pathogenese von akutem allergischem Asthma, wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals die Effekte auf chronische Entzündungsprozesse und Komponenten des Atemwegsumbaus untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Applikation von R-848 als auch Poly (I:C) zur Abschwächung der TH2-vermittelten Immunantwort führt, so sank die Konzentration an OVA-spezifischem IgE sowie IL-5, während die Konzentration von IL-12 deutlich anstieg. Darüber hinaus kam es zu einer deutlichen Reduzierung der eosinophilen Granulozyten in der BAL.

Überdies induzierte R-848, nicht jedoch Poly (I:C), eine verstärkte Synthese von OVA-spezifischem IgG2a, was der Aktivierung einer TH1-Antwort entspricht.

Diese positiven Effekte waren auch hinsichtlich des Atemwegsumbaus nachweisbar. So waren in den peripheren Atemwegen im Vergleich zur OVA-Kontrollgruppe weit weniger mukusproduzierende Becherzellen vorhanden und es konnte weder eine Verdickung Atemwegsepithelien noch eine Verdickung der α -SMA-positiven Zellschicht in diesen Gruppen nachgewiesen werden.

Entsprechend kam es zu einer deutlichen Verbesserung der Lungenfunktion nach Behandlung mit Poly (I:C) oder R-848.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Anwendung synthetischer TLR3- und TLR7-Liganden im Rahmen eines Asthma bronchiale eine viel versprechende Therapieoption darstellt, die direkt in den zugrundeliegenden Mechanismus einer TH2-vermittelten allergischen Entzündung eingreift und durch Verschiebung der TH1-TH2-Balance in Richtung TH1 zahlreiche Charakteristika eines chronischen allergischen Asthma positiv beeinflusst.

6. Referenzen

- Abbas AK, Murphy KM, Sher A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383(6603):787-793.
- Adra CN, Mao XQ, Kawada H, Gao PS, Korzycka B, Donate JL, Shaldon SR, Coull P, Dubowitz M, Enomoto T, Ozawa A, Syed SA, Horiuchi T, Khaeraja R, Khan R, Lin SR, Flinter F, Beales P, Hagihara A, Inoko H, Shirakawa T, Hopkin JM. 1999. Chromosome 11q13 and atopic asthma. *ClinGenet* 55(6):431-437.
- Agrawal DK, Edwan J, Kandimalla ER, Yu D, Bhagat L, Wang D, Agrawal S. 2004. Novel immunomodulatory oligonucleotides prevent development of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness in asthma. *Int Immunopharmacol* 4(1):127-138.
- Ahmad-Nejad P, Mrabet-Dahbi S, Breuer K, Klotz M, Werfel T, Herz U, Heeg K, Neumaier M, Renz H. 2004. The toll-like receptor 2 R753Q polymorphism defines a subgroup of patients with atopic dermatitis having severe phenotype. *J Allergy Clin Immunol* 113(3):565-567.
- Aikawa T, Shimura S, Sasaki H, Ebina M, Takishima T. 1992. Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. *Chest* 101(4):916-921.
- Akdis M, Akdis CA. 2007. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 119(4):780-791.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *NatImmunol* 2(8):675-680.
- Alcorn JF, Guala AS, van der Velden J, McElhinney B, Irvin CG, Davis RJ, Janssen-Heininger YM. 2008. Jun N-terminal kinase 1 regulates

epithelial-to-mesenchymal transition induced by TGF-beta1. *J Cell Sci* 121(Pt 7):1036-1045.

Alm JS, Swartz J, Lilja G, Scheynius A, Pershagen G. 1999. Atopy in children of families with an anthroposophic lifestyle. *Lancet* 353(9163):1485-1488.

Anderson HR, Bailey PA, Cooper JS, Palmer JC, West S. 1983. Medical care of asthma and wheezing illness in children: a community survey. *JEpidemiolCommunity Health* 37(3):180-186.

Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. 2003. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* 116(Pt 2):217-224.

Armstrong L, Medford AR, Uppington KM, Robertson J, Witherden IR, Tetley TD, Millar AB. 2004. Expression of functional toll-like receptor-2 and -4 on alveolar epithelial cells. *AmJRespirCell MolBiol* 31(2):241-245.

Ball TM, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martinez FD, Wright AL. 2000. Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *NEnglJMed* 343(8):538-543.

Bals R, Hiemstra PS. 2004. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *EurRespirJ* 23(2):327-333.

Balzar S, Chu HW, Silkoff P, Cundall M, Trudeau JB, Strand M, Wenzel S. 2005. Increased TGF-beta2 in severe asthma with eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol* 115(1):110-117.

Barnes PJ. 1998. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 94(6):557-572.

- Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R. 2006. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* 7(1):49-56.
- Bernstein DI, Harrison CJ, Tomai MA, Miller RL. 2001. Daily or weekly therapy with resiquimod (R-848) reduces genital recurrences in herpes simplex virus-infected guinea pigs during and after treatment. *J Infect Dis* 183(6):844-849.
- Bjorksten B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. 2001. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol* 108(4):516-520.
- Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. 2000. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 342(18):1350-1358.
- Bohle B. 2002. CpG motifs as possible adjuvants for the treatment of allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 129(3):198-203.
- Bohle B. 2008. T cell responses during allergen-specific immunotherapy of Type I allergy. *Front Biosci* 13:6079-6085.
- Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A, Lauener RP, Schierl R, Renz H, Nowak D, von Mutius E. 2002. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med* 347(12):869-877.
- Brugnolo F, Sampognaro S, Liotta F, Cosmi L, Annunziato F, Manuelli C, Campi P, Maggi E, Romagnani S, Parronchi P. 2003. The novel synthetic immune response modifier R-848 (Resiquimod) shifts human allergen-specific CD4+ TH2 lymphocytes into IFN-gamma-producing cells. *J Allergy Clin Immunol* 111(2):380-388.

Burney PG, Chinn S, Rona RJ. 1990. Has the prevalence of asthma increased in children? Evidence from the national study of health and growth 1973-86. *BMJ* 300(6735):1306-1310.

Chaplin DD. 2006. 1. Overview of the human immune response. *J Allergy Clin Immunol* 117(2 Suppl Mini-Primer):S430-S435.

Chaudhuri N, Dower SK, Whyte MK, Sabroe I. 2005. Toll-like receptors and chronic lung disease. *Clin Sci(Lond)* 109(2):125-133.

Chuang TH, Ulevitch RJ. 2000. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur Cytokine Netw* 11(3):372-378.

Cookson WO, Young RP, Sandford AJ, Moffatt MF, Shirakawa T, Sharp PA, Faux JA, Julier C, Nakumuura Y. 1992. Maternal inheritance of atopic IgE responsiveness on chromosome 11q. *Lancet* 340(8816):381-384.

Corry DB, Folkesson HG, Warnock ML, Erle DJ, Matthay MA, Wiener-Kronish JP, Locksley RM. 1996. Interleukin 4, but not interleukin 5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity. *J Exp Med* 183(1):109-117.

Coyle AJ, Tsuyuki S. 1995. Th2 cells and cytokine networks in allergic inflammation of the lung. *Mediators Inflamm* 4(4):239-247.

Coyle AJ, Wagner K, Bertrand C, Tsuyuki S, Bews J, Heusser C. 1996. Central role of immunoglobulin (Ig) E in the induction of lung eosinophil infiltration and T helper 2 cell cytokine production: inhibition by a non-anaphylactogenic anti-IgE antibody. *J Exp Med* 183(4):1303-1310.

Dabbagh K, Lewis DB. 2003. Toll-like receptors and T-helper-1/T-helper-2 responses. *Curr Opin Infect Dis* 16(3):199-204.

Dahlen SE. 2006. Treatment of asthma with antileukotrienes: first line or last resort therapy? *Eur J Pharmacol* 533(1-3):40-56.

Daniels SE, Bhattacharya S, James A, Leaves NI, Young A, Hill MR, Faux JA, Ryan GF, le Souef PN, Lathrop GM, Musk AW, Cookson WO. 1996. A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. *Nature* 383(6597):247-250.

de Waal Malefyt R. 1997. The role of type I interferons in the differentiation and function of Th1 and Th2 cells. *Semin Oncol* 24(3 Suppl 9):S9-94-S99-98.

Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e S. 2004a. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303(5663):1529-1531.

Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. 2004b. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303(5663):1529-1531.

Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B. 2000. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur Cytokine Netw* 11(3):362-371.

Edelmann KH, Richardson-Burns S, Alexopoulou L, Tyler KL, Flavell RA, Oldstone MB. 2004. Does Toll-like receptor 3 play a biological role in virus infections? *Virology* 322(2):231-238.

Eder W, Klimecki W, Yu L, von Mutius E, Riedler J, Braun-Fahrlander C, Nowak D, Martinez FD. 2004. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *J Allergy Clin Immunol* 113(3):482-488.

Edwards AD, Diebold SS, Slack EM, Tomizawa H, Hemmi H, Kaisho T, Akira S, Reis e Sousa C. 2003. Toll-like receptor expression in murine DC

- subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur J Immunol* 33(4):827-833.
- Edwards MR, Bartlett NW, Clarke D, Birrell M, Belvisi M, Johnston SL. 2009. Targeting the NF-kappaB pathway in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Ther* 121(1):1-13.
- Elser B, Lohoff M, Kock S, Giaisi M, Kirchhoff S, Krammer PH, Li-Weber M. 2002. IFN-gamma represses IL-4 expression via IRF-1 and IRF-2. *Immunity* 17(6):703-712.
- Ewaschuk JB, Backer JL, Churchill TA, Obermeier F, Krause DO, Madsen KL. 2007. Surface expression of Toll-like receptor 9 is upregulated on intestinal epithelial cells in response to pathogenic bacterial DNA. *Infect Immun* 75(5):2572-2579.
- Fallon PG, Emson CL, Smith P, McKenzie AN. 2001. IL-13 overexpression predisposes to anaphylaxis following antigen sensitization. *J Immunol* 166(4):2712-2716.
- Finkelman FD, Svetic A, Gresser I, Snapper C, Holmes J, Trotta PP, Katona IM, Gause WC. 1991. Regulation by interferon alpha of immunoglobulin isotype selection and lymphokine production in mice. *JExpMed* 174(5):1179-1188.
- Firestein GS, Roeder WD, Laxer JA, Townsend KS, Weaver CT, Hom JT, Linton J, Torbett BE, Glasebrook AL. 1989. A new murine CD4+ T cell subset with an unrestricted cytokine profile. *J Immunol* 143(2):518-525.
- Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA, O'Neill LA. 2001. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413(6851):78-83.

- Foliaki S, Annesi-Maesano I, Tuuau-Potoi N, Waqatakirewa L, Cheng S, Douwes J, Pearce N. 2008. Risk factors for symptoms of childhood asthma, allergic rhinoconjunctivitis and eczema in the Pacific: an ISAAC Phase III study. *IntJTubercLung Dis* 12(7):799-806.
- Forsbach A, Nemorin JG, Montino C, Muller C, Samulowitz U, Vicari AP, Jurk M, Mutwiri GK, Krieg AM, Lipford GB, Vollmer J. 2008. Identification of RNA sequence motifs stimulating sequence-specific TLR8-dependent immune responses. *J Immunol* 180(6):3729-3738.
- Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG. 1996. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med* 183(1):195-201.
- Francis JN, Durham SR. 2004. Adjuvants for allergen immunotherapy: experimental results and clinical perspectives. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 4(6):543-548.
- Gajewski TF, Fitch FW. 1988. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol* 140(12):4245-4252.
- Gajewski TF, Goldwasser E, Fitch FW. 1988. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. II. IFN-gamma inhibits the proliferation of murine bone marrow cells stimulated with IL-3, IL-4, or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 141(8):2635-2642.
- Gajewski TF, Joyce J, Fitch FW. 1989. Antiproliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. III. Differential selection of TH1 and TH2 murine helper T lymphocyte clones using recombinant IL-2 and recombinant IFN-gamma. *J Immunol* 143(1):15-22.

- Germann T, Guckes S, Bongartz M, Dlugonska H, Schmitt E, Kolbe L, Kolsch E, Podlaski FJ, Gately MK, Rude E. 1995. Administration of IL-12 during ongoing immune responses fails to permanently suppress and can even enhance the synthesis of antigen-specific IgE. *Int Immunol* 7(10):1649-1657.
- Gibson SJ, Imbertson LM, Wagner TL, Testerman TL, Reiter MJ, Miller RL, Tomai MA. 1995. Cellular requirements for cytokine production in response to the immunomodulators imiquimod and S-27609. *J Interferon Cytokine Res* 15(6):537-545.
- Gill N, Davies EJ, Ashkar AA. 2008. The role of toll-like receptor ligands/agonists in protection against genital HSV-2 infection. *Am J Reprod Immunol* 59(1):35-43.
- Greene CM, McElvaney NG. 2005. Toll-like receptor expression and function in airway epithelial cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 53(5):418-427.
- Grize L, Gassner M, Wuthrich B, Bringolf-Isler B, Takken-Sahli K, Sennhauser FH, Stricker T, Eigenmann PA, Braun-Fahrlander C. 2006. Trends in prevalence of asthma, allergic rhinitis and atopic dermatitis in 5-7-year old Swiss children from 1992 to 2001. *Allergy* 61(5):556-562.
- Grunig G, Warnock M, Wakil AE, Venkayya R, Brombacher F, Rennick DM, Sheppard D, Mohrs M, Donaldson DD, Locksley RM, Corry DB. 1998. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* 282(5397):2261-2263.
- Guillaume T, Kubin M, Sekhavat M, Rubinstein DB, Trinchieri G, Symann M. 1996. Peripheral blood mononuclear cells from autologous hematopoietic stem cell transplantation recipients produce and respond to IL-12. *Bone Marrow Transplant* 18(4):733-739.

- Hamelmann E, Cieslewicz G, Schwarze J, Ishizuka T, Joetham A, Heusser C, Gelfand EW. 1999. Anti-interleukin 5 but not anti-IgE prevents airway inflammation and airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 160(3):934-941.
- Hamilton LM, Davies DE, Wilson SJ, Kimber I, Dearman RJ, Holgate ST. 2001. The bronchial epithelium in asthma--much more than a passive barrier. *Monaldi ArchChest Dis* 56(1):48-54.
- Hattermann K, Picard S, Borgeat M, Leclerc P, Pouliot M, Borgeat P. 2007a. The Toll-like receptor 7/8-ligand resiquimod (R-848) primes human neutrophils for leukotriene B4, prostaglandin E2 and platelet-activating factor biosynthesis. *FASEB J* 21(7):1575-1585.
- Hattermann K, Picard S, Borgeat M, Leclerc P, Pouliot M, Borgeat P. 2007b. The Toll-like receptor 7/8-ligand resiquimod (R-848) primes human neutrophils for leukotriene B4, prostaglandin E2 and platelet-activating factor biosynthesis. *FASEB J* 21(7):1575-1585.
- Hawrylowicz CM, O'Garra A. 2005. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 5(4):271-283.
- Hayashi F, Means TK, Luster AD. 2003. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 102(7):2660-2669.
- Hayden C, Pereira E, Rye P, Palmer L, Gibson N, Palenque M, Hagel I, Lynch N, Goldblatt J, LeSouef P. 1997. Mutation screening of interferon-gamma (IFN γ) as a candidate gene for asthma. *ClinExpAllergy* 27(12):1412-1416.
- Heeg K, Dalpke A, Peter M, Zimmermann S. 2008. Structural requirements for uptake and recognition of CpG oligonucleotides. *Int J Med Microbiol* 298(1-2):33-38.

Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303(5663):1526-1529.

Heinrich J, Popescu MA, Wjst M, Goldstein IF, Wichmann HE. 1998. Atopy in children and parental social class. *AmJPublic Health* 88(9):1319-1324.

Heinzmann A, Mao XQ, Akaiwa M, Kreomer RT, Gao PS, Ohshima K, Umeshita R, Abe Y, Braun S, Yamashita T, Roberts MH, Sugimoto R, Arima K, Arinobu Y, Yu B, Kruse S, Enomoto T, Dake Y, Kawai M, Shimazu S, Sasaki S, Adra CN, Kitaichi M, Inoue H, Yamauchi K, Tomichi N, Kurimoto F, Hamasaki N, Hopkin JM, Izuhara K, Shirakawa T, Deichmann KA. 2000. Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. *HumMolGenet* 9(4):549-559.

Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S. 2002. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 3(2):196-200.

Herz U, Braun A, Ruckert R, Renz H. 1998. Various immunological phenotypes are associated with increased airway responsiveness. *ClinExpAllergy* 28(5):625-634.

Herz U, Joachim R, Ahrens B, Scheffold A, Radbruch A, Renz H. 2001. Allergic sensitization and allergen exposure during pregnancy favor the development of atopy in the neonate. *Int Arch Allergy Immunol* 124(1-3):193-196.

Herz U, Lumpp U, Da Palma JC, Enssle K, Takatsu K, Schnoy N, Daser A, Kottgen E, Wahn U, Renz H. 1996a. The relevance of murine animal

models to study the development of allergic bronchial asthma. *ImmunolCell Biol* 74(2):209-217.

Herz U, Lumpp U, Daser A, Gelfand EW, Renz H. 1996b. Murine animal models to study the central role of T cells in immediate-type hypersensitivity responses. *AdvExpMedBiol* 409:25-32.

Hewson CA, Jardine A, Edwards MR, Laza-Stanca V, Johnston SL. 2005. Toll-like receptor 3 is induced by and mediates antiviral activity against rhinovirus infection of human bronchial epithelial cells. *JVirol* 79(19):12273-12279.

Hochrein H, Shortman K, Vremec D, Scott B, Hertzog P, O'Keeffe M. 2001. Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. *JImmunol* 166(9):5448-5455.

Holgate ST, Davies DE, Rorke S, Cakebread J, Murphy G, Powell RM, Holloway JW. 2004. ADAM 33 and its association with airway remodelling and hyperresponsiveness in asthma. *ClinRevAllergy Immunol* 27(1):23-34.

Holgate ST, Lackie P, Wilson S, Roche W, Davies D. 2000. Bronchial epithelium as a key regulator of airway allergen sensitization and remodelling in asthma. *AmJRespirCrit Care Med* 162(3 Pt 2):S113-S117.

Homer RJ, Elias JA. 2000. Consequences of long-term inflammation. Airway remodelling. *Clin Chest Med* 21(2):331-343, ix.

Hornef MW, Bogdan C. 2005. The role of epithelial Toll-like receptor expression in host defense and microbial tolerance. *JEndotoxinRes* 11(2):124-128.

Horner AA. 2006. Update on toll-like receptor ligands and allergy: implications for immunotherapy. *Curr Allergy Asthma Rep* 6(5):395-401.

Horner AA, Van Uden JH, Zubeldia JM, Broide D, Raz E. 2001. DNA-based immunotherapeutics for the treatment of allergic disease. *Immunol Rev* 179:102-118.

Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. 1993. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260(5107):547-549.

HUBER HL, KOESSLER KK. 1922. THE PATHOLOGY OF BRONCHIAL ASTHMA. *Arch Intern Med* 30(6):689-760.

Illi S, von Mutius E, Lau S, Bergmann R, Niggemann B, Sommerfeld C, Wahn U. 2001. Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study. *BMJ* 322(7283):390-395.

Irwin RS, Richardson ND. 2006. Side effects with inhaled corticosteroids: the physician's perception. *Chest* 130(1 Suppl):41S-53S.

Jarman ER, Lamb JR. 2004. Reversal of established CD4+ type 2 T helper-mediated allergic airway inflammation and eosinophilia by therapeutic treatment with DNA vaccines limits progression towards chronic inflammation and remodelling. *Immunology* 112(4):631-642.

Jeffery PK. 2001. Remodelling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 164(10 Pt 2):S28-38.

Jiang W, Sun R, Wei H, Tian Z. 2005. Toll-like receptor 3 ligand attenuates LPS-induced liver injury by down-regulation of toll-like receptor 4 expression on macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(47):17077-17082.

Johansen P, Senti G, Martinez Gomez JM, Storni T, von Beust BR, Wuthrich B, Bot A, Kundig TM. 2005. Toll-like receptor ligands as adjuvants in allergen-specific immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 35(12):1591-1598.

Johansson J, Hellman L. 2007. Modifications increasing the efficacy of recombinant vaccines; marked increase in antibody titers with moderately repetitive variants of a therapeutic allergy vaccine. *Vaccine* 25(9):1676-1682.

Jurk M, Heil F, Vollmer J, Schetter C, Krieg AM, Wagner H, Lipford G, Bauer S. 2002a. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* 3(6):499.

Jurk M, Heil F, Vollmer J, Schetter C, Krieg AM, Wagner H, Lipford G, Bauer S. 2002b. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* 3(6):499.

Kabelitz D. 2007. Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 19(1):39-45.

Kabelitz D, Medzhitov R. 2007. Innate immunity--cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines. *Curr Opin Immunol* 19(1):1-3.

Kawai T, Akira S. 2007. TLR signaling. *Semin Immunol* 19(1):24-32.

Kobe B, Deisenhofer J. 1995. Proteins with leucine-rich repeats. *Curr Opin Struct Biol* 5(3):409-416.

Koppelman GH, Reijmerink NE, Colin Stine O, Howard TD, Whittaker PA, Meyers DA, Postma DS, Bleeker ER. 2001. Association of a promoter polymorphism of the CD14 gene and atopy. *Am J Respir Crit Care Med* 163(4):965-969.

- Krishnan J, Selvarajoo K, Tsuchiya M, Lee G, Choi S. 2007. Toll-like receptor signal transduction. *Exp Mol Med* 39(4):421-438.
- Lauener RP, Birchler T, Adamski J, Braun-Fahrlander C, Bufe A, Herz U, von Mutius E, Nowak D, Riedler J, Waser M, Sennhauser FH. 2002. Expression of CD14 and Toll-like receptor 2 in farmers' and non-farmers' children. *Lancet* 360(9331):465-466.
- Lazarus SC, Boushey HA, Fahy JV, Chinchilli VM, Lemanske RF, Jr., Sorkness CA, Kraft M, Fish JE, Peters SP, Craig T, Drazen JM, Ford JG, Israel E, Martin RJ, Mauger EA, Nachman SA, Spahn JD, Szeffler SJ. 2001. Long-acting beta2-agonist monotherapy vs continued therapy with inhaled corticosteroids in patients with persistent asthma: a randomized controlled trial. *JAMA* 285(20):2583-2593.
- Lewis DB. 2002. Allergy immunotherapy and inhibition of Th2 immune responses: a sufficient strategy? *Curr Opin Immunol* 14(5):644-651.
- Lin CF, Tsai CH, Cheng CH, Chen YS, Tournier F, Yeh TH. 2007. Expression of Toll-like receptors in cultured nasal epithelial cells. *Acta Otolaryngol* 127(4):395-402.
- Lloyd CM, Gonzalo JA, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. 2001a. Mouse models of allergic airway disease. *Adv Immunol* 77:263-295.
- Lloyd CM, Gonzalo JA, Nguyen T, Delaney T, Tian J, Oettgen H, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. 2001b. Resolution of bronchial hyperresponsiveness and pulmonary inflammation is associated with IL-3 and tissue leukocyte apoptosis. *J Immunol* 166(3):2033-2040.
- Lombardi V, Van Overtvelt L, Horiot S, Moussu H, Chabre H, Louise A, Balazuc AM, Mascarell L, Moingeon P. 2008. Toll-like receptor 2 agonist

Pam3CSK4 enhances the induction of antigen-specific tolerance via the sublingual route. *ClinExpAllergy*.

Lukacs NW, Addison CL, Gauldie J, Graham F, Simpson K, Strieter RM, Warmington K, Chensue SW, Kunkel SL. 1997. Transgene-induced production of IL-4 alters the development and collagen expression of T helper cell 1-type pulmonary granulomas. *J Immunol* 158(9):4478-4484.

Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Flavell RA. 2004. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(15):5598-5603.

Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A. 1995. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 154(10):5071-5079.

Macatonia SE, Hsieh CS, Murphy KM, O'Garra A. 1993. Dendritic cells and macrophages are required for Th1 development of CD4+ T cells from alpha beta TCR transgenic mice: IL-12 substitution for macrophages to stimulate IFN-gamma production is IFN-gamma-dependent. *Int Immunol* 5(9):1119-1128.

Makinde T, Murphy RF, Agrawal DK. 2007. The regulatory role of TGF-beta in airway remodelling in asthma. *Immunol Cell Biol* 85(5):348-356.

Mallia P, Johnston SL. 2002. Respiratory viruses: do they protect from or induce asthma? *Allergy* 57(12):1118-1129.

Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Schou C, Krishnaswamy G, Beaty TH. 1994. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* 264(5162):1152-1156.

- Martinez FD. 2005. Heterogeneity of the association between lower respiratory illness in infancy and subsequent asthma. *ProcAmThoracSoc* 2(2):157-161.
- Martinez Gomez JM, Fischer S, Csaba N, Kundig TM, Merkle HP, Gander B, Johansen P. 2007. A protective allergy vaccine based on CpG- and protamine-containing PLGA microparticles. *Pharm Res* 24(10):1927-1935.
- Matsumoto M, Funami K, Oshiumi H, Seya T. 2004. Toll-like receptor 3: a link between toll-like receptor, interferon and viruses. *Microbiol Immunol* 48(3):147-154.
- Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, Yamamoto A, Seya T. 2003. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *JImmunol* 171(6):3154-3162.
- Matsumoto M, Seya T. 2008. TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv Drug Deliv Rev* 60(7):805-812.
- Maziak W, Behrens T, Brasky TM, Duhme H, Rzehak P, Weiland SK, Keil U. 2003. Are asthma and allergies in children and adolescents increasing? Results from ISAAC phase I and phase III surveys in Munster, Germany. *Allergy* 58(7):572-579.
- Medzhitov R, Janeway CA, Jr. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *CurrOpinImmunol* 9(1):4-9.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388(6640):394-397.

- Mobs C, Slotosch C, Loffler H, Pfutzner W, Hertl M. 2008. Cellular and humoral mechanisms of immune tolerance in immediate-type allergy induced by specific immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 147(3):171-178.
- Mori A, Kaminuma O, Suko M, Inoue S, Ohmura T, Hoshino A, Asakura Y, Miyazawa K, Yokota T, Okumura Y, Ito K, Okudaira H. 1997. Two distinct pathways of interleukin-5 synthesis in allergen-specific human T-cell clones are suppressed by glucocorticoids. *Blood* 89(8):2891-2900.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136(7):2348-2357.
- Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'Amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A. 2000a. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 164(11):5998-6004.
- Muzio M, Polentarutti N, Bosisio D, Prahlanan MK, Mantovani A. 2000b. Toll-like receptors: a growing family of immune receptors that are differentially expressed and regulated by different leukocytes. *J Leukoc Biol* 67(4):450-456.
- Mytar B, Gawlicka M, Szatanek R, Woloszyn M, Ruggiero I, Piekarska B, Zembala M. 2004. Induction of intracellular cytokine production in human monocytes/macrophages stimulated with ligands of pattern recognition receptors. *Inflamm Res* 53(3):100-106.
- Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Tomizawa H, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, Hirai K. 2003. Expression and function of Toll-like

receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol* 171(8):3977-3982.

Nakajima H, Nakao A, Watanabe Y, Yoshida S, Iwamoto I. 1994. IFN-alpha inhibits antigen-induced eosinophil and CD4+ T cell recruitment into tissue. *J Immunol* 153(3):1264-1270.

Nakao F, Ihara K, Kusuhara K, Sasaki Y, Kinukawa N, Takabayashi A, Nishima S, Hara T. 2001. Association of IFN-gamma and IFN regulatory factor 1 polymorphisms with childhood atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 107(3):499-504.

Nelson HS. 1995. Beta-adrenergic bronchodilators. *N Engl J Med* 333(8):499-506.

Neuhaus-Steinmetz U, Glaab T, Daser A, Braun A, Lommatzsch M, Herz U, Kips J, Alarie Y, Renz H. 2000. Sequential development of airway hyperresponsiveness and acute airway obstruction in a mouse model of allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 121(1):57-67.

Nguyen MD, Cinman N, Yen J, Horner AA. 2001. DNA-based vaccination for the treatment of food allergy. *Allergy* 56 Suppl 67:127-130.

Nicolae D, Cox NJ, Lester LA, Schneider D, Tan Z, Billstrand C, Kuldaneck S, Donfack J, Kogut P, Patel NM, Goodenbour J, Howard T, Wolf R, Koppelman GH, White SR, Parry R, Postma DS, Meyers D, Bleecker ER, Hunt JS, Solway J, Ober C. 2005. Fine mapping and positional candidate studies identify HLA-G as an asthma susceptibility gene on chromosome 6p21. *Am J Hum Genet* 76(2):349-357.

Niimi K, Asano K, Shiraishi Y, Nakajima T, Wakaki M, Kagyo J, Takihara T, Suzuki Y, Fukunaga K, Shiomi T, Oguma T, Sayama K, Yamaguchi K, Natori Y, Matsumoto M, Seya T, Yamaya M, Ishizaka A. 2007. TLR3-

mediated synthesis and release of eotaxin-1/CCL11 from human bronchial smooth muscle cells stimulated with double-stranded RNA. *J Immunol* 178(1):489-495.

Ochiai K, Iwamoto I, Takahashi H, Yoshida S, Tomioka H. 1995. Effect of IL-4 and interferon-gamma (IFN-gamma) on IL-3- and IL-5-induced eosinophil differentiation from human cord blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol* 99(1):124-128.

Ohno I, Nitta Y, Yamauchi K, Hoshi H, Honma M, Woolley K, O'Byrne P, Tamura G, Jordana M, Shirato K. 1996. Transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) gene expression by eosinophils in asthmatic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15(3):404-409.

Owens ML, Bridson WE, Smith SL, Myers JA, Fox TL, Wells TM. 1998. Percutaneous penetration of Aldara cream, 5% during the topical treatment of genital and perianal warts. *PrimCare UpdateOb Gyns* 5(4):151.

Panettieri RA, Jr. 2002. Airway smooth muscle: an immunomodulatory cell. *J Allergy Clin Immunol* 110(6 Suppl):S269-274.

Parks T, Felix K, Rice T, Subbarao PV, Marimuthu KM, Rao DC. 1990. A genetic study of immunoglobulin E and atopic disease based on families ascertained through asthmatic children. *HumHered* 40(2):69-76.

Parronchi P, De Carli M, Manetti R, Simonelli C, Piccinni MP, Macchia D, Maggi E, Del Prete G, Ricci M, Romagnani S. 1992. Aberrant interleukin (IL)-4 and IL-5 production in vitro by CD4+ helper T cells from atopic subjects. *EurJImmunol* 22(6):1615-1620.

Parronchi P, Mohapatra S, Sampognaro S, Giannarini L, Wahn U, Chong P, Maggi E, Renz H, Romagnani S. 1996. Effects of interferon-alpha on

cytokine profile, T cell receptor repertoire and peptide reactivity of human allergen-specific T cells. *EurJImmunol* 26(3):697-703.

Paukkonen K, Fraki J, Horsmanheimo M. 1993. Interferon-alpha treatment decreases the number of blood eosinophils in patients with severe atopic dermatitis. *Acta DermVenereol* 73(2):141-142.

Pazdrak K, Stafford S, Alam R. 1995. The activation of the Jak-STAT 1 signaling pathway by IL-5 in eosinophils. *JImmunol* 155(1):397-402.

Postma DS, Bleecker ER, Amelung PJ, Holroyd KJ, Xu J, Panhuysen CI, Meyers DA, Levitt RC. 1995. Genetic susceptibility to asthma--bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy. *NEnglJMed* 333(14):894-900.

Potena A, Caramori G, Casolari P, Contoli M, Johnston SL, Papi A. 2007. Pathophysiology of viral-induced exacerbations of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2(4):477-483.

Quarcoo D, Weixler S, Joachim RA, Stock P, Kallinich T, Ahrens B, Hamelmann E. 2004. Resiquimod, a new immune response modifier from the family of imidazoquinolinamines, inhibits allergen-induced Th2 responses, airway inflammation and airway hyper-reactivity in mice. *ClinExpAllergy* 34(8):1314-1320.

Raby BA, Silverman EK, Lazarus R, Lange C, Kwiatkowski DJ, Weiss ST. 2003. Chromosome 12q harbors multiple genetic loci related to asthma and asthma-related phenotypes. *HumMolGenet* 12(16):1973-1979.

Randolph AG, Lange C, Silverman EK, Lazarus R, Weiss ST. 2005. Extended haplotype in the tumor necrosis factor gene cluster is associated with asthma and asthma-related phenotypes. *AmJRespirCrit Care Med* 172(6):687-692.

- Reiter MJ, Testerman TL, Miller RL, Weeks CE, Tomai MA. 1994. Cytokine induction in mice by the immunomodulator imiquimod. *JLeukocBiol* 55(2):234-240.
- Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, Carr D, Schierl R, Nowak D, von Mutius E. 2001. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 358(9288):1129-1133.
- Riedler J, Eder W, Oberfeld G, Schreuer M. 2000. Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization. *ClinExpAllergy* 30(2):194-200.
- Ring J. 1985. [1st description of an "atopic family anamnesis" in the Julio-Claudian imperial house: Augustus, Claudius, Britannicus]. *Hautarzt* 36(8):470-471.
- Ring J. 1997. Allergy and modern society: does 'Western life style' promote the development of allergies? *IntArchAllergy Immunol* 113(1-3):7-10.
- Ritter M, Mennerich D, Weith A, Seither P. 2005a. Characterization of Toll-like receptors in primary lung epithelial cells: strong impact of the TLR3 ligand poly(I:C) on the regulation of Toll-like receptors, adaptor proteins and inflammatory response. *J Inflamm (Lond)* 2:16.
- Ritter M, Mennerich D, Weith A, Seither P. 2005b. Characterization of Toll-like receptors in primary lung epithelial cells: strong impact of the TLR3 ligand poly(I:C) on the regulation of Toll-like receptors, adaptor proteins and inflammatory response. *JInflamm(Lond)* 2:16.
- Rodriguez D, Keller AC, Faquim-Mauro EL, de Macedo MS, Cunha FQ, Lefort J, Vargaftig BB, Russo M. 2003. Bacterial lipopolysaccharide signaling

through Toll-like receptor 4 suppresses asthma-like responses via nitric oxide synthase 2 activity. *J Immunol* 171(2):1001-1008.

Romagnani S. 1995. Biology of human TH1 and TH2 cells. *J Clin Immunol* 15(3):121-129.

Romagnani S. 2000. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 85(1):9-18.

Rutten van-Molken MP, Feenstra TL. 2001. The burden of asthma and chronic obstructive pulmonary disease: data from The Netherlands. *Pharmacoeconomics* 19 Suppl 2:1-6.

Sabet M, Cottam HB, Guiney DG. 2006. Modulation of cytokine production and enhancement of cell viability by TLR7 and TLR9 ligands during anthrax infection of macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* 47(3):369-379.

Salisbury BA, Pungliya M, Choi JY, Jiang R, Sun XJ, Stephens JC. 2003. SNP and haplotype variation in the human genome. *MutatRes* 526(1-2):53-61.

Sampson AP. 2001. IL-5 priming of eosinophil function in asthma. *ClinExpAllergy* 31(4):513-517.

Schernhammer ES, Vutuc C, Waldhor T, Haidinger G. 2008. Time trends of the prevalence of asthma and allergic disease in Austrian children. *PediatrAllergy Immunol* 19(2):125-131.

Schmitt E, Van Brandwijk R, Fischer HG, Rude E. 1990. Establishment of different T cell sublines using either interleukin 2 or interleukin 4 as growth factors. *Eur J Immunol* 20(8):1709-1715.

Seder RA, Paul WE. 1994. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 12:635-673.

- Sel S, Wegmann M, Bauer S, Garn H, Alber G, Renz H. 2007. Immunomodulatory effects of viral TLR ligands on experimental asthma depend on the additive effects of IL-12 and IL-10. *J Immunol* 178(12):7805-7813.
- Shaheen SO, Aaby P, Hall AJ, Barker DJ, Heyes CB, Shiell AW, Goudiaby A. 1996. Measles and atopy in Guinea-Bissau. *Lancet* 347(9018):1792-1796.
- Shen E, Lu L, Wu C. 2008. TLR7/8 ligand, R-848, inhibits IgE synthesis by acting directly on B lymphocytes. *Scand J Immunol* 67(6):560-568.
- Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. 1997. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 275(5296):77-79.
- Smith EB, Schwartz M, Kawamoto H, You X, Hwang D, Liu H, Scherr DS. 2007. Antitumor effects of imidazoquinolines in urothelial cell carcinoma of the bladder. *JUrol* 177(6):2347-2351.
- Smith SM. 1997. Conference review: 'towards self-management of asthma-- whose asthma is it anyway?'. *Collegian* 4(2):46.
- Sovijarvi AR, Haahtela T, Ekroos HJ, Lindqvist A, Saarinen A, Poussa T, Laitinen LA. 2003. Sustained reduction in bronchial hyperresponsiveness with inhaled fluticasone propionate within three days in mild asthma: time course after onset and cessation of treatment. *Thorax* 58(6):500-504.
- Staros EB. 2005. Innate immunity: New approaches to understanding its clinical significance. *AmJClinPathol* 123(2):305-312.
- Stavnezer J. 1996. Immunoglobulin class switching. *CurrOpinImmunol* 8(2):199-205.

- Stock P, Akbari O, Berry G, Freeman GJ, DeKruyff RH, Umetsu DT. 2004. Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity. *Nat Immunol* 5(11):1149-1156.
- Stock P, DeKruyff RH, Umetsu DT. 2006. Inhibition of the allergic response by regulatory T cells. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 6(1):12-16.
- Stowell NC, Seideman J, Raymond HA, Smalley KA, Lamb RJ, Egenolf DD, Bugelski PJ, Murray LA, Marsters PA, Bunting RA, Flavell RA, Alexopoulou L, San Mateo LR, Griswold DE, Sarisky RT, Mbow ML, Das AM. 2009. Long-term activation of TLR3 by poly(I:C) induces inflammation and impairs lung function in mice. *Respir Res* 10:43.
- Strachan DP. 2000. Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax* 55 Suppl 1:S2-10.
- Sukkar MB, Xie S, Khorasani NM, Kon OM, Stanbridge R, Issa R, Chung KF. 2006. Toll-like receptor 2, 3, and 4 expression and function in human airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol* 118(3):641-648.
- Suzaki Y, Hamada K, Nomi T, Ito T, Sho M, Kai Y, Nakajima Y, Kimura H. 2008. A small-molecule compound targeting CCR5 and CXCR3 prevents airway hyperresponsiveness and inflammation. *Eur Respir J* 31(4):783-789.
- Syed TA, Hadi SM, Qureshi ZA, Ali SM, Kwah MS. 2000. Treatment of external genital warts in men with imiquimod 2% in cream. A placebo-controlled, double-blind study. *J Infect* 41(2):148-151.
- Takeda K, Akira S. 2004. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 16(1):3-9.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21:335-376.

- Takeuchi O, Hemmi H, Akira S. 2004. Interferon response induced by Toll-like receptor signaling. *J Endotoxin Res* 10(4):252-256.
- Talay F, Kurt B, Tug T, Yilmaz F, Goksugur N. 2008. Prevalence and risk factors of asthma and allergic diseases among schoolchildren in Bolu, Turkey. *Acta Paediatr* 97(4):459-462.
- Taylor B, Wadsworth J, Wadsworth M, Peckham C. 1984. Changes in the reported prevalence of childhood eczema since the 1939-45 war. *Lancet* 2(8414):1255-1257.
- Temann UA, Ray P, Flavell RA. 2002. Pulmonary overexpression of IL-9 induces Th2 cytokine expression, leading to immune pathology. *J Clin Invest* 109(1):29-39.
- Testerman TL, Gerster JF, Imbertson LM, Reiter MJ, Miller RL, Gibson SJ, Wagner TL, Tomai MA. 1995. Cytokine induction by the immunomodulators imiquimod and S-27609. *J Leukoc Biol* 58(3):365-372.
- Trinchieri G, Wysocka M, D'Andrea A, Rengaraju M, Aste-Amezaga M, Kubin M, Valiante NM, Chehimi J. 1992. Natural killer cell stimulatory factor (NKSF) or interleukin-12 is a key regulator of immune response and inflammation. *Prog Growth Factor Res* 4(4):355-368.
- Uthoff H, Spenner A, Reckelkamm W, Ahrens B, Wolk G, Hackler R, Hardung F, Schaefer J, Scheffold A, Renz H, Herz U. 2003. Critical role of preconceptional immunization for protective and nonpathological specific immunity in murine neonates. *J Immunol* 171(7):3485-3492.
- Van Eerdewegh P, Little RD, Dupuis J, Del Mastro RG, Falls K, Simon J, Torrey D, Pandit S, McKenny J, Braunschweiger K, Walsh A, Liu Z, Hayward B, Folz C, Manning SP, Bawa A, Saracino L, Thackston M, Benchekroun Y, Capparell N, Wang M, Adair R, Feng Y, Dubois J, FitzGerald MG, Huang

- H, Gibson R, Allen KM, Pedan A, Danzig MR, Umland SP, Egan RW, Cuss FM, Rorke S, Clough JB, Holloway JW, Holgate ST, Keith TP. 2002. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 418(6896):426-430.
- Varjonen E, Kalimo K, Lammintausta K, Terho P. 1992. Prevalence of atopic disorders among adolescents in Turku, Finland. *Allergy* 47(3):243-248.
- Vasilakos JP, Smith RM, Gibson SJ, Lindh JM, Pederson LK, Reiter MJ, Smith MH, Tomai MA. 2000a. Adjuvant activities of immune response modifier R-848: comparison with CpG ODN. *Cell Immunol* 204(1):64-74.
- Vasilakos JP, Smith RM, Gibson SJ, Lindh JM, Pederson LK, Reiter MJ, Smith MH, Tomai MA. 2000b. Adjuvant activities of immune response modifier R-848: comparison with CpG ODN. *Cell Immunol* 204(1):64-74.
- Vignola AM, Kips J, Bousquet J. 2000. Tissue remodelling as a feature of persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol* 105(6 Pt 1):1041-1053.
- von Mutius E, Braun-Fahrlander C, Schierl R, Riedler J, Ehlermann S, Maisch S, Waser M, Nowak D. 2000. Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *ClinExpAllergy* 30(9):1230-1234.
- von Mutius E, Illi S, Hirsch T, Leupold W, Keil U, Weiland SK. 1999. Frequency of infections and risk of asthma, atopy and airway hyperresponsiveness in children. *EurRespirJ* 14(1):4-11.
- Wagner H. 2001. Toll meets bacterial CpG-DNA. *Immunity* 14(5):499-502.
- Wagner TL, Ahonen CL, Couture AM, Gibson SJ, Miller RL, Smith RM, Reiter MJ, Vasilakos JP, Tomai MA. 1999. Modulation of TH1 and TH2 cytokine

production with the immune response modifiers, R-848 and imiquimod. *Cell Immunol* 191(1):10-19.

Wallen N, Kita H, Weiler D, Gleich GJ. 1991. Glucocorticoids inhibit cytokine-mediated eosinophil survival. *J Immunol* 147(10):3490-3495.

Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA. 2004. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med* 10(12):1366-1373.

Wegmann M. 2008. Animal models of chronic experimental asthma - strategies for the identification of new therapeutic targets. *J Occup Med Toxicol* 3 Suppl 1:S4.

Wegmann M. 2009. Th2 cells as targets for therapeutic intervention in allergic bronchial asthma. *Expert Rev Mol Diagn* 9(1):85-100.

Wegmann M, Fehrenbach H, Fehrenbach A, Held T, Schramm C, Garn H, Renz H. 2005. Involvement of distal airways in a chronic model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy* 35(10):1263-1271.

Wegmann M, Renz H. 2005. Animal models of experimental asthma. *Ernst Schering Res Found Workshop*(50):69-87.

Weiner HL. 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *ImmunolRev* 182:207-214.

Werling D, Hope JC, Howard CJ, Jungi TW. 2004. Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists. *Immunology* 111(1):41-52.

- Wigbels B, Luger T, Metze D. 2001. [Imiquimod: a new treatment possibility in bowenoid papulosis?]. *Hautarzt* 52(2):128-131.
- Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, Donaldson DD. 1998. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 282(5397):2258-2261.
- Wilson JW, Bamford TL. 2001. Assessing the evidence for remodelling of the airway in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 14(3):229-247.
- Wong WS. 2005. Inhibitors of the tyrosine kinase signaling cascade for asthma. *Curr Opin Pharmacol* 5(3):264-271.
- Yamaguchi Y, Hayashi Y, Sugama Y, Miura Y, Kasahara T, Kitamura S, Torisu M, Mita S, Tominaga A, Takatsu K. 1988a. Highly purified murine interleukin 5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil chemotactic factor. *J Exp Med* 167(5):1737-1742.
- Yamaguchi Y, Suda T, Suda J, Eguchi M, Miura Y, Harada N, Tominaga A, Takatsu K. 1988b. Purified interleukin 5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. *J Exp Med* 167(1):43-56.
- Yamamoto M, Takeda K, Akira S. 2004. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol Immunol* 40(12):861-868.
- Yoshimoto T, Nagai N, Ohkusu K, Ueda H, Okamura H, Nakanishi K. 1998. LPS-stimulated SJL macrophages produce IL-12 and IL-18 that inhibit IgE production in vitro by induction of IFN-gamma production from CD3intIL-2R beta+ T cells. *J Immunol* 161(3):1483-1492.

- Youn CJ, Miller M, Baek KJ, Han JW, Nayar J, Lee SY, McElwain K, McElwain S, Raz E, Broide DH. 2004. Immunostimulatory DNA reverses established allergen-induced airway remodelling. *J Immunol* 173(12):7556-7564.
- Zar HJ, Ehrlich RI, Workman L, Weinberg EG. 2007. The changing prevalence of asthma, allergic rhinitis and atopic eczema in African adolescents from 1995 to 2002. *PediatrAllergy Immunol* 18(7):560-565.
- Zarembek KA, Godowski PJ. 2002. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 168(2):554-561.
- Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Ghosh S. 2004. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303(5663):1522-1526.
- Zhou X, Hu H, Huynh ML, Kotaru C, Balzar S, Trudeau JB, Wenzel SE. 2007. Mechanisms of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 augmentation by IL-13 on TGF-beta 1-stimulated primary human fibroblasts. *J Allergy Clin Immunol* 119(6):1388-1397.
- Zhu FG, Kandimalla ER, Yu D, Tang JX, Agrawal S. 2004. Modulation of ovalbumin-induced Th2 responses by second-generation immunomodulatory oligonucleotides in mice. *Int Immunopharmacol* 4(7):851-862.

7. Verzeichnis der Veröffentlichungen

a) Publikationen aus dieser Arbeit:

1. Sel S, Wegmann M, **Sel S**, Bauer S, Garn H, Alber G, Renz H.
Immunomodulatory Effects of Viral TLR Ligands on Experimental Asthma Depend on the Additive Effects of IL-12 and IL-10.
J Immunol. 2007 Jun 15;178(12):7805-13.

b) Publierte Abstracts aus dieser Arbeit:

1. Sel S, Wegmann M, **Sel S**, Renz H.
Polyinosin-Polycytodylsäure verhindert experimentelles Asthma in BALB/c-Mäusen.
Allergo Journal. 13: 42, 2004
2. Sel S, Wegmann M, **Sel S**, Renz H.
Polyinosin-Polycytodylsäure verhindert experimentelles Asthma in BALB/c-Mäusen.
Allergo Journal. 13: 42, 2004
3. Wegmann M, Sel S, **Sel S**, Garn H, Renz H.
Der therapeutische Effekt des TLR-7-Liganden Resiquimod auf das experimentelle Asthma ist IL-12-abhängig.
Pneumologie. 1(59): 59, 2005
4. Sel S, **Sel S**, Wegmann M, Renz H.
Die Suppression von etabliertem Asthma mittels TLR-7-Liganden R-848 ist teilweise IL-12 abhängig.
Allergo Journal. 14(1): 38, 2005.
5. Sel S, **Sel S**, Wegmann M, Garn H, Alber G, Renz H.
Suppression of Established Experimental Asthma by Toll-like Receptor 7 Activation.
J Allergy Clin Immunol. 115(2): S64, 2005

6. Wegmann M, Sel S, **Sel S**, Alber G, Garn H, Renz H.
Attenuation of Experimental Asthma Pathology by TLR-3 Activation partially depends on IL-12.
Proc ATS. 2:A 15, 2005
7. Wegmann M, Sel S, **Sel S**, Garn H, Renz H.
Suppression of Experimental Asthma by Toll-like Receptor 3 Activation Requires IL-12.
3rd EAACI Davos Meeting, Davos, Switzerland, 2005

c) Weitere Publikationen:

1. Wegmann M, Goggel R, **Sel S**, Sel S, Erb KJ, Kalkbrenner F, Renz H, Garn H.
Effects of a low-molecular-weight CCR-3 antagonist on chronic experimental asthma.
Am J Respir Cell Mol Biol. 2007 Jan;36(1):61-7.
2. Scholl I, Ackermann U, Ozdemir C, Blumer N, Dicke T, Sel S, **Sel S**, Wegmann M, Szalai K, Knittelfelder R, Untersmayr E, Scheiner O, Garn H, Jensen-Jarolim E, Renz H.
Anti-ulcer treatment during pregnancy induces food allergy in mouse mothers and a Th2-bias in their offspring.
FASEB J. 2007 Apr;21(4):1264-70.
3. Ozdemir C, **Sel S**, Scholl I, Yildirim AO, Blumer N, Garn H, Ackermann U, Wegmann M, Barlan IB, Renz H, Sel S.
CD4(+) T cells from mice with intestinal immediate-type hypersensitivity induce airway hyperreactivity.
Clin Exp Allergy. 2007 Oct;37(10):1419-26.

4. Sel S, Wegmann M, Dicke T, **Sel S**, Henke W, Yildirim AO, Renz H, Garn H.
Effective prevention and therapy of experimental allergic asthma using a GATA-3-specific DNzyme.
J Allergy Clin Immunol. 2008 Apr;121(4):910-916.

d) Weiter Publizierte Abstracts:

1. Schöll I, Ackermann U, Özdemir C, Blümer N, Dicke T, Sel S, **Sel S**, Wegmann M, Untersmayr E, Renz H, Garn H, Jensen-Jarolim E. Anti-acid medication supports sensitization to food antigens in pregnant mothers and the perinatal Th2 environment in newborns: a BALB/c mouse model
Annual Meeting of the Austrian Society for Nutrition, Vienna, 18-19th November 2005
2. Schöll I, Ackermann U, Özdemir C, Blümer N, Dicke T, Sel Se, **Sel Sa**, Wegmann M, Untersmayr E, Garn H , Renz H , Jensen-Jarolim E.
Anti-acid treatment of pregnant females induces sensitization and a perinatal TH2-biased immune response also in the offspring; a BALB/c mouse model.
Annual Meeting of the Austrian Society for Allergology and Immunology from 1st-3rd December 2005 in Graz, Austria
3. Schöll, I.; Ackermann, U.; Özdemir, C.; Blümer, N.; Dicke, T.; Sel, S.; **Sel, S.**; Wegmann M.; Untersmayr E.; Garn H.; Jensen-Jarolim E.; Renz H.
Treatment of Pregnant Females with Anti-Acids Induces Sensitization in Mothers and a Perinatal Th2-Dominated Immune Response in Offsprings: a BALB/c Mouse Model.
J Allergy Clin Immunol. 117(2): S52, 2006

4. Ozdemir, C.; **Sel, S.**; Schöll, I.; Yildirim, A.O.; Blümer, N.; Fehrenbach, H.; Barlan, I.B.; Renz, H.; Sel, S.
Transfer of Experimental Asthma by CD4 T-Cells from Mice with Food-Induced Intestinal Immediate Type Hypersensitivity.
J Allergy Clin Immunol. 117(2): S133, 2006
5. Wegmann, M.; Goeggel, R.; **Sel, S.**; Erb, K.J.; Kalkbrenner, F.; Renz, H.; Garn, H.
Therapy of Established Chronic Experimental Asthma with a Low Molecular Weight Ccr-3 Antagonist.
J Allergy Clin Immunol. 117(2): S276, 2006
6. Sel S, **Sel S**, Wegmann M, Garn H, Renz H.
Attenuation of experimental asthma by activation of TLR-7 partially depends on IL-12.
Allergy Clin Immunol Int. 2005. Suppl. 1: 96
7. Wegmann, M.; Goeggel, R.; **Sel, S.**; Erb, K.J.; Kalkbrenner, F.; Garn, H.; Renz, H.
Antagonisation of CCR-3 Results in Reduction of Airway Hyperresponsiveness and Airway Remodelling in a Mouse Model of Chronic Experimental Asthma.
Proc ATS. 3: A582, 2006

e) Buchbeiträge

Immunomodulatory Effects of Viral Toll-Like Receptor Ligands
M. Wegmann, S. Sel, S. Sel, S. Bauer, H. Renz, and H. Garn
Cellular and Molecular Targets in Allergy and Clinical Immunology
by Stephen T. Holgate, Gianni Marone, Johannes Ring (Editors)
Hogrefe & Huber Publishers, Cambridge, USA (2008)

8. Lebenslauf

Name:	Sarper Sel
Anschrift dienstlich:	Klinikum der Universität München Marchioninstr. 15 D-81377 München
Geboren:	2. Juni 1975 in Afsin, Türkei
Nationalität:	deutsch
1996	Abitur; Geschwister-Scholl-Gymnasium, Velbert
1996-2003	Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
1999-2000	Studentische Hilfskraft am Max-Panck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin
2000-2001	Tutor in der Abteilung für Klinische Chemie und Pathobiochemie am Universitätsklinikum Benjamin Franklin, FU-Berlin
10/2003-9/2004	Arzt im Praktikum am Klinikum der Philipps- Universität Marburg, Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik, Prof Dr. H. Renz
10/2004-5/2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Klinikum der Philipps-Universität Marburg, Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik, Prof Dr. H. Renz
6/2005-9/2006	Assistenzarzt am Universitätsklinikum des Saarlandes; Klinik für Innere Medizin I - Onkologie,

Hämatologie, Klinische Immunologie und
Rheumatologie; Prof. Dr. Pfreundschuh

seit 10/2006

Assistenzarzt am Klinikum der Universität München;
Institut für Klinische Chemie; Prof. Dr. Seidel

9. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren bzw. Privat-Dozenten in Berlin:

Albrecht, Anagnostopoulos, Arntz, Bartsch, Bauer, Baumgarten, Beuthan, Bleker, Boegner, Breckwoldt, Brennecke, Brock, Brockstedt, Brockstedt, Buhr, Bühner, Coumbos, Duchmann, Durbin, Dürkop, Ebert, Ehardt, Entezami, Ertel, Felsenberg, Fiedler, Fitzner, Fobbe, Frege, Fromm, Funke-Kaiser, Ganten, Giet, Gossrau, Gross, Grozdanovic, Grünbaum, Hahn, Harnisch, Harteneck, Hartung, Heine, Hensel-Wiegel, Hermosilla, Hetzer, Hinkelbein, Hoffmann, Hoffmeister, Hopp, Hoyer, Huber, Jovanovic, Kapp, Keilholz, Kellner, Kewitz, Klaen, Knauf, Korfel, Kreutz, Kühn, Langer, Lau, Lennert, Liesenkötter, Lübbert, Martus, Marx, Maxeiner, Mellerowicz, Miller, Mitznegg, Morguet, Müller, Neumann, Niedner, Oberdisse, Obladen, Offermann, Orfanos, Orzechowski, Paul, Pauschinger, Perschel, Pham, Plant, Pries, Pritze, Radke, Reutter, Richter, Rosemeier, Rüden, Sauter, Schäcke, Schaefer, Schelp, Scherer, Scherübl, Schlattmann, Schmidt-Gollwitzer, Schneider, Schrader, Schultheiss, Schultz-Ehrenburg, Schulzke, Seeger, Seyfert, Shakibaei, Sieper, Sperling, Stadler, Stahlmann, Stein, Stoltenburg-Didinger, Tauber, Thiel, Tolxdorff, Vermold, Vesper, Wahn, Wiegel, Winau, Wolf, Wyrwich, Zouboulis

10. Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Dr. Harald Renz für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen sowie durch seine Unterstützung durch zahlreiche wissenschaftliche Diskurse.

Bei Herrn Dr. Holger Garn, dem Forschungsleiter dieser Arbeitsgruppe, bedanke ich mich für seine Hilfe bei der Planung der Experimente.

Bei Dr. Michael Wegmann möchte ich mich herzlich für die Einarbeitung am „Body“ sowie die immer freundschaftliche Zusammenarbeit Bedanken und insbesondere für sein akribisches Korrekturlesen.

Ein besonderer Dank gilt den Technischen Assistenten Frau Spiess-Naumann, Frau Verena Krähling, Frau Annika Rühl und Nadine Müller für ihre Hilfe bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten, insbesondere bei den Tierpräparationen.

Bei Herrn Dr. Serdar Sel und Frau Dr. Berit Sel bedanke ich mich für eifriges Korrekturlesen und für die stetig guten Ratschläge.

Speziell bei meiner Tochter Laeticia Jade Sel bedanke ich mich für ihre Unterstützung, Geduld und Rücksicht während der Fertigstellung dieser Arbeit.

Insbesondere bedanke ich mich bei meinen Eltern Hasan und Feride, die mich mit ihrer ausdauernden Unterstützung auf meinem Lebensweg begleitet haben und mir dadurch den Abschluss des Studiums und dieser Arbeit ermöglicht haben. Auch meinem Bruder Dr. Saadettin Sel und meiner Schwester Asli Erbil gilt mein besonderer Dank.

Auch bei meinen Freunden Frau Dr. Britta Friedrichs und Herrn Dr. Oguzhan Turan bedanke ich mich für ihre ideenreichen und aufmunternden Beiträge.

11. Ehrenwörtliche Erklärung

„Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel **“Immunmodulatorische Effekte von TLR3- und TLR7-Liganden auf die Pathogenese des chronischen Asthma bronchiale im Maus-Modell“** in der Abteilung Klinische Chemie und molekulare Diagnostik am Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH am Standort Marburg im Biomedizinischen Forschungszentrum (BMFZ) unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Renz ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 10.10.2010

.....

Sarper Sel

Vorliegende Arbeit wurde im folgenden Publikationsorgan veröffentlicht:

Sel S, Wegmann M, **Sel S**, Bauer S, Garn H, Alber G, Renz H. Immunomodulatory Effects of Viral TLR Ligands on Experimental Asthma Depend on the Additive Effects of IL-12 and IL-10. *J Immunol.* 2007 Jun 15;178(12):7805-13.