

Aus der Klinik für Pneumologie
Direktor: Prof. Dr. C. F. Vogelmeier
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Auswirkung der Nitrierung von Allergenen auf die
Ausprägung des allergischen Asthmas unter Einbeziehung des
Antioxidantien-Metabolismus**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Cordula Wege

aus Marburg

Marburg, 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 23.08.2012

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. B. Müller

Korreferent: Prof. Dr. U. Kroh

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	<u>4</u>
1.1. Asthma bronchiale	<u>4</u>
1.1.1. Zahlen und Fakten	<u>4</u>
1.1.2. Ätiologie	<u>5</u>
1.1.3. Pathogenese	<u>7</u>
1.2. Pulmonaler Surfactant	<u>10</u>
1.2.1. Surfactantmetabolismus	<u>11</u>
1.2.2. Funktionen und klinische Relevanz des pulmonalen Surfactant	<u>11</u>
1.2.3. Zusammensetzung des pulmonalen Surfactant	<u>12</u>
1.2.4. Biosynthese von Phosphatidylcholin: Der Kennedy-Pathway	<u>12</u>
1.3. Oxidativer Stress und die Rolle der Superoxiddismutasen	<u>14</u>
1.4. Die Allergene Ovalbumin und Keyhole Limpet Hemocyanin	<u>17</u>
1.5. Hygienehypothese	<u>18</u>
1.6. Umwelthypothese	<u>20</u>
1.6.1. Ost-West-Vergleich	<u>20</u>
1.6.2. Wirkungsprofile von Schadstoffgruppen	<u>21</u>
1.6.3. Nitrierung von Proteinen	<u>23</u>
1.7. Fragestellungen	<u>25</u>
2. Material und Methoden	<u>27</u>
2.1. Tiere	<u>27</u>
2.2. Versuchsprotokoll	<u>28</u>
2.2.1. Allergische Sensibilisierung	<u>28</u>
2.2.2. Allergenprovokation	<u>29</u>
2.2.3. Versuchsaufbau	<u>30</u>
2.3. Lungenfunktionstest	<u>32</u>
2.4. Lungenhistologie	<u>34</u>
2.4.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	<u>34</u>
2.4.2. Immunhistochemische Färbung	<u>35</u>
2.5. Isolierung von Typ-II-Pneumozyten	<u>37</u>
2.6. Bronchoalveoläre Lavage (BAL)	<u>41</u>
2.6.1. Untersuchung der BAL-Zytologie	<u>41</u>
2.6.2. Pappenheim-Färbung	<u>41</u>
2.6.3. Bestimmung des BAL-Gesamtproteins	<u>42</u>
2.6.4. Bestimmung des BAL-Gesamtphospholipids	<u>43</u>
2.7. Bestimmung der Gesamt-SOD-Aktivität im Plasma	<u>45</u>
2.8. Extrahierung von RNA und Proteinen aus Typ-II-Pneumozyten	<u>47</u>
2.9. Real-time Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (Real-time RT-PCR)	<u>49</u>
2.9.1. cDNA-Synthese	<u>49</u>
2.9.2. cDNA-Amplifikation mittels Real-time RT-PCR	<u>50</u>
2.10. Western Blot	<u>53</u>
2.10.1. Herstellung von SDS-Polyacrylamid Gelen	<u>53</u>

2.10.2. Vorbereitung der Proben und Elektrophorese	<u>54</u>
2.10.3. Western-Blot	<u>56</u>
2.10.4. Antikörper-Detektion	<u>58</u>
2.11. Verbrauchsmaterialien	<u>59</u>
2.12. Geräte	<u>60</u>
2.13. Software	<u>61</u>
2.14. Statistische Auswertung	<u>61</u>
3. Ergebnisse	<u>62</u>
3.1. Lungenfunktionsanalyse	<u>63</u>
3.2. Lungenhistologie in der HE-Färbung	<u>65</u>
3.3. Zytologie der BAL	<u>68</u>
3.3.1. Differentialzellzahlen der BAL	<u>71</u>
3.3.2. Prozentuale Verteilung der BAL-Zellen	<u>76</u>
3.4. Gesamtproteingehalt der BAL	<u>77</u>
3.5. Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zu Phospholipiden als Komponenten des Lungensurfactant	<u>78</u>
3.5.1. Gesamtphospholipidmenge in der BAL	<u>78</u>
3.5.2. mRNA-Expression der CTP: Phosphocholin Cytidylyltransferase alpha in Typ-II-Pneumozyten	<u>79</u>
3.5.3. mRNA-Expression der Cholinkinase alpha in Typ-II-Pneumozyten	<u>81</u>
3.5.4. mRNA-Expression der Cholinkinase beta in Typ-II-Pneumozyten	<u>82</u>
3.6. Immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen zu Superoxiddismutasen als Enzyme der antioxidativen Abwehr	<u>83</u>
3.6.1. Enzymaktivität der Gesamt-SOD im Plasma	<u>83</u>
3.6.2. Immunhistochemischer Nachweis der Kupfer-Zink-SOD	<u>84</u>
3.6.3. mRNA-Expression der Kupfer-Zink-SOD in Typ-II-Pneumozyten	<u>87</u>
3.6.4. Immunhistochemischer Nachweis der Mangan-SOD	<u>88</u>
3.6.5. mRNA-Expression der Mangan-SOD in Typ-II-Pneumozyten	<u>91</u>
3.6.6. Proteinexpression der Mangan-SOD in Typ-II-Pneumozyten	<u>92</u>
3.6.7. mRNA-Expression der extrazellulären SOD in Typ-II-Pneumozyten	<u>97</u>
3.7. Ergebniszusammenfassung der zusätzlichen Gruppen PBS/OVA, PBS/KLH, OVA/nOVA, OVA/KLH, nKLH/OVA	<u>98</u>
4. Diskussion	<u>99</u>
4.1. Lungenfunktionsanalyse	<u>100</u>
4.2. Lungenhistologie und BAL-Zytologie	<u>103</u>
4.3. Gesamtproteingehalt der BAL	<u>105</u>
4.4. Phospholipide als Komponenten des Lungensurfactant	<u>107</u>
4.4.1. Gesamtphospholipidmenge in der BAL	<u>107</u>
4.4.2. Genexpression der an der Phospholipidsynthese beteiligten Enzyme	<u>109</u>
4.5. Superoxiddismutasen als Enzyme der antioxidativen Abwehr	<u>113</u>
4.5.1. Enzymaktivität der Gesamt-SOD im Plasma	<u>114</u>
4.5.2. Immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen der SOD-Unterformen	<u>117</u>
4.5.3. Therapeutische Konsequenzen	<u>121</u>

4.6. Schlussfolgerungen und Ausblick	<u>123</u>
5. Zusammenfassung	<u>128</u>
6. Summary	<u>130</u>
7. Anhang	<u>132</u>
7.1. Weiterführende Tabellen	<u>132</u>
7.2. Abkürzungsverzeichnis	<u>135</u>
7.3. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	<u>139</u>
7.4. Literaturverzeichnis	<u>143</u>
7.6. Verzeichnis der akademischen Lehrer	<u>158</u>
7.7. Danksagungen	<u>159</u>
7.8. Ehrenwörtliche Erklärung	<u>160</u>

1. Einleitung

1.1. Asthma bronchiale

1.1.1. Zahlen und Fakten

Die Prävalenz allergischer Erkrankungen hat in den letzten Jahrzehnten stetig zugenommen und stellt heute eine globale Belastung dar, die Menschen jeglichen Alters und ethnischen Hintergrundes betrifft (Anandan et al. 2010). Unter einer Allergie wird eine überschießende Reaktion des Immunsystems auf spezifische, normalerweise harmlose Umweltstoffe (Allergene) verstanden. Zu den allergischen Erkrankungen gehört das Asthma bronchiale, eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege, welche durch anfallsweise auftretende Atemnot infolge reversibler Bronchialobstruktion und durch bronchiale Hyperreaktivität auf eine Vielzahl von Reizen charakterisiert ist. Die aktuelle Asthmaprävalenz liegt bei schätzungsweise 235 Millionen Menschen weltweit (World Health Organization, Fact Sheet N° 307, Stand: Mai 2011).

In Deutschland sind etwa 10-15 % der Kinder und 5-7 % der erwachsenen Bevölkerung betroffen (Robert Koch Institut, Stand: Februar 2011).

Die internationalen Studien „International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)“ und „European Community Respiratory Health Survey (ECRHS)“ stellen die weltweit größten epidemiologischen Forschungsprogramme dar, welche sich mit der Prävalenz von Asthma und anderen allergischen Erkrankungen befassen (Committee 2002, Asher et al. 2006). Die Ergebnisse beider Studien demonstrieren, dass sich die Erkrankungshäufigkeiten in verschiedenen Ländern und Regionen deutlich unterscheiden. Beispielsweise zeigte die 1991 gegründete ISAAC-Studie für den Zeitraum zwischen 1993 und 2003 neben einer sehr hohen Asthmaprävalenz in englischsprachigen Ländern eine hohe Symptomprävalenz in Lateinamerika, einen Nordwest-Südostgradienten in Europa sowie relativ niedrige Erkrankungsraten in Afrika und Asien auf. Obwohl die Erkrankungshäufigkeit in einigen englischsprachigen und westeuropäischen Ländern als rückläufig gilt, steigt sie weltweit zunehmend an. So wird vor allem in Entwicklungsländern mit einer bisher niedrigeren Erkrankungsrate mit Übernahme eines moderneren Lebensstils und zunehmender Urbanisierung eine steigende Inzidenz beobachtet (Anandan et al. 2010, Pearce et al. 2007).

Die Morbiditätsrate kann je nach Krankheitsausprägung variieren. Im Durchschnitt haben Asthmatiker eine reduzierte Lebensqualität, welche sich in *Disability Adjusted*

Life Years (DALYs) angeben lässt. Nach dieser Einteilung belegt Asthma den 22. Rang aller Erkrankungen weltweit (World Health Organization 2004). Neben der zunehmenden Morbidität ist die Mortalitätsrate seit 1980 in vielen Ländern als Resultat eines verbesserten Asthmamanagements rückläufig. Trotzdem liegt die asthmabedingte Sterberate noch bei schätzungsweise 250000 Menschen pro Jahr. Obwohl die Erkrankung unter optimaler Behandlung als gut kontrollierbar gilt, ist vor allem in ökonomisch schwächeren Gebieten die Rate an unterdiagnostizierten und unbehandelten Menschen sehr hoch (Ruby Palwankar 2008).

Die zunehmenden Prävalenzen, Morbiditäten und Mortalitäten gehen mit einer hohen sozioökonomischen Belastung einher, welche disproportional vor allem die Menschen mit schweren Krankheitsverläufen in ärmeren Gebieten betrifft. Dabei setzen sich die Kosten aus direkten Ausgaben für Medikamente und Krankenhausaufenthalte sowie indirekten Ausgaben in Form von Arbeitszeitverlust zusammen. Darüber hinaus nehmen die immateriellen Kosten den wahrscheinlich größten Stellenwert ein, da Angst, Schmerz und Einschränkung der Lebensqualität nicht nur den Patienten, sondern auch dessen Familien und Freunde betreffen (Accordini et al. 2008).

1.1.2. Ätiologie

Allergien und Asthma sind häufige Erkrankungen mit heterogener Ätiologie, die ausgeprägte geographische Variationen aufweisen. Neben dem allergischen Asthma lassen sich verschiedene nicht-allergische (intrinsische) Asthmaformen und eine Vielzahl an Mischvarianten unterscheiden. Ein wichtiger prädisponierender Risikofaktor für allergische Erkrankungen ist die Atopie, welche eine persönliche oder familiäre Bereitschaft zur Produktion spezifischer IgE-Antikörper gegen verbreitete Umweltallergene beschreibt (Cookson and Hopkin 1988).

Die Prävalenz einer allergischen Sensibilisierung in der Bevölkerung ist groß und variiert zwischen 16 und 57 % in den USA, Europa, Australien, Neuseeland und Taiwan. Daneben ist sie bei 80 % der asthmatischen Kinder und nahezu 60 % der asthmatischen Erwachsenen zu finden (Ober and Yao 2011).

Allerdings entwickelt nicht jeder Atopiker die klinische Manifestation einer Allergie und nicht jeder mit klinischen Symptomen einer allergischen Erkrankung ist atopisch veranlagt. So liegt die Vermutung nahe, dass weitere Faktoren für die Entwicklung von

Allergien und Asthma prädisponieren.

Mit der Einführung neuer Technologien zur Genotypisierung wurden bereits über 100 Gene identifiziert, die mit Asthma oder Atopie assoziiert sind (von Mutius 2009).

Darüber hinaus belegen verschiedene Studien eine familiäre Assoziation mit einer Erblichkeit von schätzungsweise 35 bis 95 % für das Auftreten von Asthma und 30 bis 66 % für die Entwicklung einer Atemwegshyperreagibilität (AHR) (Ober and Yao 2011).

Einen Überblick über die genetischen Komponenten, die allergischen Erkrankungen und Asthma zugrunde liegen, liefern die Reviews von Ober und von Mutius et al. (Ober and Yao 2011, von Mutius 2009).

Obwohl sich genetische Faktoren als wichtig für die Manifestation von Allergien und Asthma herausstellten, kann ihnen der schnelle Anstieg der entsprechenden Prävalenzen nicht alleine zugeschrieben werden. Vielmehr weisen epidemiologische Studien darauf hin, dass auch Umweltfaktoren und der eigene Lebensstil einen Einfluss auf die Erkrankungen ausüben.

Beispielsweise zeigten sich virale und bakterielle Infektionen des Atemtrakts mit der Manifestation von Asthma und dem Auftreten akuter Exazerbationen assoziiert (Busse, Lemanske and Gern 2010, Guilbert and Denlinger 2010).

Auf der anderen Seite demonstrierten Studien, dass vor allem in Industrieländern die abnehmende Rate an Infektionserkrankungen mit einer erhöhten Prävalenz von Allergien und Asthma einhergeht, Überlegungen, die in der *Hygienehypothese* begründet sind (Braun-Fahrlander et al. 2002, Yazdanbakhsh, Kremsner and van Ree 2002). Neben Infektionen wurde vielfach nachgewiesen, dass Luftschadstoffe - in Form von Ozon, Stickstoffdioxid, Dieselabgaspartikeln sowie Kohlenwasserstoffen - Asthmasymptome triggern können (Di Giampaolo et al. 2011). In diesem Zusammenhang soll insbesondere der Gebrauch fossiler Brennstoffe wie auch ein erhöhtes Verkehrsaufkommen zum Auftreten allergischer Erkrankungen beitragen. Die Rolle dieser Luftverunreinigungen bei der Pathogenese des Asthmas wird in der *Umwelthypothese* kontrovers diskutiert.

Des Weiteren sind inhalierte Allergene häufig Auslöser von Asthmasymptomen und zeigen sich für deren Persistenz verantwortlich (Platts-Mills and Woodfolk 2011).

Häufige Asthma-triggernde Allergene umfassen Bestandteile von Hausstaubmilben und Mäusen, Haare von Katzen und anderen Haustieren, Zutaten von Nahrungsmitteln, Pilzsporen und Pollen (Gaffin and Phipatanakul 2009).

Unter den Lebensstilfaktoren zeigten sich vor allem Tabakrauch, bestimmte Ernährungsgewohnheiten, Adipositas und die Einnahme von Antibiotika und Antipyretika mit dem Auftreten von Allergien und Asthma assoziiert (Ober and Yao 2011).

1.1.3. Pathogenese

Allergische Sensibilisierung

Die Entstehung allergischer Erkrankungen beginnt mit der allergischen Sensibilisierung, der Bildung Allergen-spezifischer Immunglobulin E (IgE)-Antikörper in einem genetisch prädisponierten (atopischen) Individuum. Gefolgt wird dieser Prozess von der Schädigung verschiedener Organsysteme wie Nase, Haut und Lunge. Die Lunge kommt aufgrund ihrer großen Oberfläche täglich mit annähernd 10000 l inhalierter Luft in Kontakt, welche mit einer Vielzahl an potentiell schädlichen physikalischen, chemischen und biologischen Substanzen angereichert ist. Unter normalen Umständen stellt das Lungenepithel aufgrund seiner Tight junctions und anderer Adhäsionsmoleküle eine nahezu undurchlässige Barriere gegen verschiedenste inhalierte Pathogene dar (Furuse 2010).

Des Weiteren sind die Epithelzellen mit einer Reihe von Antioxidantien ausgestattet, welche helfen, die epitheliale Integrität zu bewahren und Atemwegsschäden zu vermeiden (Comhair and Erzurum 2010).

Bei Asthmatikern häufen sich die Hinweise, dass sowohl die epitheliale Barrierefunktion als auch die antioxidative Kapazität und Reparaturfunktion des Atemwegsepithels beeinträchtigt sind. Dieser Zustand ermöglicht es den Pathogenen, die Atemwegswand zu penetrieren und innerhalb des Organismus toxische, immunogene und entzündliche Antworten zu generieren (Holgate 2011).

Doch auch gegen solche erfolgreich penetrierenden Eindringlinge kann ein Organismus mit Abwehrmechanismen reagieren.

Bei diesen Abwehrmechanismen stellen dendritische Zellen eine Brücke zwischen der angeborenen und erworbenen Immunität dar, indem sie eine zentrale Rolle in der

Aktivierung von Typ2-T-Helferzellen (T_H2-Zellen) und der Entwicklung einer allergischen Entzündung spielen. Sie stellen als antigenpräsentierende Zellen sicher, dass möglichst jedes inhalierte Protein erkannt und den T-Lymphozyten präsentiert wird (Lambrecht and Hammad 2010).

Die häufigste Folge einer Inhalation von harmlosen Proteinantigenen ist die Induktion von Toleranz, da viele Antigene die dendritischen Zellen nicht komplett aktivieren können und so keine effektive T-Zell-Antwort induzieren (Reis e Sousa 2006).

Um die Toleranzentwicklung zu umgehen, müssen dendritische Zellen über ihre Pattern-Recognition Receptors (PRR), wie beispielsweise den Toll-Like Rezeptoren (TLR), aktiviert werden. Diese Aktivierung kann durch die eingedrungenen Antigene übernommen werden, die häufig mit Lipopolysacchariden und Peptidoglycanen kontaminiert sind. Die Aktivierung führt zur Produktion bestimmter Zytokine und Chemokine, welche neutrophile Granulozyten, Monozyten und weitere Entzündungszellen in die Atemwege locken und eine dendritische Zellreifung induzieren (Reis e Sousa 2006).

Die dendritischen Zellen nehmen die inhalierten Antigene auf, prozessieren sie und präsentieren die entstandenen Peptidfragmente über Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Klasse-I- und Klasse-II-Moleküle auf ihren Oberflächen. Mit Eintritt in die mediastinalen Lymphknoten präsentieren sie die Antigenfragmente den dort ansässigen naiven T-Lymphozyten. Dadurch induzieren sie über Interaktionen mit dem T-Zellrezeptor und weiteren co-stimulatorischen Faktoren deren Aktivierung und Polarisierung in den optimalen Typ einer T-Helferzell-Antwort, welche im Falle einer allergischen Sensibilisierung die Polarisierung in einen T_H2-Zelltyp darstellt (Lambrecht and Hammad 2010, Hammad and Lambrecht 2008).

Es kommt zu einer ganzen Reihe von Zell-Zell und Zell-Mediator Interaktionen in deren Zusammenhang die T-B-Zell Kooperation zur Bildung von IgE-Antikörpern führt, welche an hochaffine (FcεRI) und niedrigaffine (FcεRII oder CD23) Rezeptoren binden. FcεRI-Rezeptoren werden unter anderem von Mastzellen und basophilen Granulozyten exprimiert. FcεRII (CD23) findet sich auf B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Langerhanszellen, Monozyten, Makrophagen, basophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten und Thrombozyten (Gould and Sutton 2008).

Allergenprovokation

Nach erneutem Antigenkontakt führt die Kreuzvernetzung von IgE-FcεRI Komplexen auf den Oberflächen von Mastzellen mit den neu eingedrungenen Antigenen innerhalb von Minuten zur *frühen Phase* der allergischen Reaktion. Diese Phase ist durch die Degranulation von Mastzellen gekennzeichnet, die zu einer Ausschüttung von Histamin, Tryptase, Heparin, einigen Zytokinen und Eicosanoiden führt. Diese Mediatoren dienen als chemische Lockstoffe für weitere Entzündungszellen und tragen zur Entwicklung von Hypersensitivität und Bronchokonstriktion bei (Kawakami and Galli 2002). Die Zytokine und Chemokine der *frühen Phase* initiieren die Entwicklung einer allergischen Entzündung und führen mit einigen Stunden Verzögerung zum Einsetzen der *späten Phase*. Diese zweite Phase ist charakterisiert durch Rekrutierung und Aktivierung von inflammatorischen Zellen, dem Auftreten einer eosinophilen Infiltration des entzündeten Gewebes sowie einer durch stimulierte B-Lymphozyten erhöhten IgE-Produktion (Minai-Fleminger and Levi-Schaffer 2009, Gould and Sutton 2008).

T_H2-Paradigma

In 1986 berichteten Mosmann et al., dass sich die meisten klonierten Linien von murinen CD4-positive T-Helferzellen, basierend auf ihren unterschiedlichen Zytokinprofilen und ihrer funktionalen Aktivität, in zwei Gruppen einteilen ließen (Mosmann et al. 1986). Nach dieser Entdeckung können sich naive T-Helferzellen in Abhängigkeit von dem während ihrer Stimulation vorherrschenden Zytokinmilieus in zwei Subpopulationen (T_H1- und T_H2-Zellen) differenzieren. Dabei lassen sich Allergen-spezifische T_H2-Zellen in den Lungen fast aller Asthmatiker nachweisen (Robinson et al. 1992). Sie produzieren Zytokine, welche unter anderem die Allergen-spezifische Synthese von IgE (IL-4), die Rekrutierung von Eosinophilen (IL-5) und Mastzellen (IL-9) sowie die Atemwegshyperreagibilität (IL-13) regulieren. Anhand von Mausmodellen konnte die Rolle von T_H2-Zellen in der Pathogenese von Asthma untersucht werden. So resultierte eine Sensibilisierung mit OVA/Aluminiumhydroxid bzw. OVA/Endotoxin in einer T_H2-polarisierten Antwort und erhöhten Allergen-spezifischen IgE-Produktion. Durch wiederholte Allergenexpositionen zuvor sensibilisierter Tiere, ließen sich die allgemeinen Eigenschaften von humanem

allergischem Asthma induzieren. Akute Expositionen gingen beispielsweise mit Atemwegseosinophilie, Schleimsekretion, Becherzellmetaplasie und Atemwegshyperreagibilität einher, wohingegen chronische Expositionen zu strukturellen Umbauten in Form eines Atemwegsremodellings führten (Kim, DeKruyff and Umetsu 2010). Neben dem allergischen Typ zeigten verschiedene klinische und experimentelle Studien, dass auch nichtallergische Asthmaformen existieren, die die Erkrankung unabhängig von einer T_H2 -Antwort triggern können (Di Giampaolo et al. 2011). Die Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass Asthma eine sehr komplexe und heterogene Erkrankung darstellt, die mit verschiedenen Formen und Phänotypen einhergeht. Auch wenn die verschiedenen Phänotypen häufig nebeneinander auftreten, lassen sie sich doch in ihrem spezifischen pathogenetischen Mechanismus voneinander unterscheiden (Kim et al. 2010).

1.2. Pulmonaler Surfactant

Das Surface active agent (kurz Surfactant genannt) ist eine grenzflächenaktive Substanz aus Proteinen und Phospholipiden, welche die alveoläre Oberfläche bedeckt und essentiell für eine normale Lungenfunktion ist. Das alveoläre System bildet die größte Oberfläche des menschlichen Körpers und breitet sich über ein Gebiet von schätzungsweise 100 m² aus (Holgate 2011). Während des Atemprozesses ist dieses System der Lunge in ständigem direktem Kontakt mit der Atmosphäre, so dass Luftschadstoffe je nach Größe und Wasserlöslichkeit bis in die tiefsten Lungenregionen vordringen können. Da Surfactant die gesamte alveoläre Oberfläche umgibt, stellt es einen der ersten Orte dar, an dem eine Interaktion zwischen Luftschadstoffen und Lungengewebe erfolgt. Auf diese Weise können sich Zusammensetzung und Metabolismus der oberflächenaktiven Substanz verändern (Müller, Seifart and Barth 1998). Im Rahmen einer bronchoalveolären Lavage kann der extrazelluläre Surfactantfilm ausgewaschen und auf seine Zusammensetzung und Funktion hin untersucht werden.

1.2.1. Surfactantmetabolismus

Surfactant wird durch Typ-II-Pneumozyten synthetisiert, in intrazellulären Vesikeln, den Lamellarkörperchen, gespeichert und auf verschiedene sekretorische Reize hin in den alveolären Raum sezerniert. Dort wird in Anwesenheit von Kalzium und Surfactantprotein (SP)-A und SP-B das gitterförmige, oberflächenaktive tubuläre Myelin geformt, welches als direkter Vorläufer des aktiven Surfactant gilt. Von dort aus können Lipide zur Luft-Wasser-Grenzfläche adsorbieren und den Surfactantfilm formen (Andreeva, Kutuzov and Voyno-Yasenetskaya 2007). Diese extrazelluläre Form des Surfactant überzieht die gesamte innere alveoläre Oberfläche. Da die Surfactant-Sekretion ein permanenter Prozess ist, gibt es Clearance-Mechanismen, welche verhindern, dass sich das Material in den Alveolen anstaut. In unbeschädigten Lungen besteht daher ein Abtransport der oberflächenaktiven Substanz via Atemwege, Blut und Lymphe, ein Abbau in den Alveolen oder eine Wiederaufnahme in Makrophagen und Zellen des respiratorischen Epithels (Whitsett, Wert and Weaver 2010). Insgesamt entstammt nur ein kleiner Teil des extrazellulären Surfactant aus einer de novo-Synthese. Ein weitaus größerer Teil wird in den Typ-II-Zellen wieder aufbereitet und steht für eine erneute Sezernierung in den alveolären Raum zur Verfügung (Andreeva et al. 2007).

1.2.2. Funktionen und klinische Relevanz des pulmonalen Surfactant

Das pulmonale Surfactantsystem hat eine Vielzahl an Funktionen. Eine Hauptfunktion ist die Herabsetzung der Oberflächenspannung an der Luft-Flüssigkeitsgrenze der Lunge und damit die Verhinderung eines alveolären Kollapses während der Expiration. Zusätzlich stabilisiert das Material die kleinen Atemwege und gewährleistet ihre Durchgängigkeit. Durch diese Eigenschaften ist Surfactant in der Lage, vor der Ausbildung intrapulmonaler Shunts und einer ungenügenden Oxygenierung des Blutes zu schützen und zusätzlich, die Atemarbeit zu reduzieren (Hohlfeld 2002). Durch den Ausgleich hydrostatischer Filtrationskräfte verhindert es die Entstehung eines Lungenödems, verbessert den mukoziliären Transport und bildet eine Barriere gegen die Diffusion von inhalierten Bakterien, Allergenen und Medikamenten (Griese 1999). Neben den biophysikalischen Eigenschaften hat Surfactant eine wichtige immunmodulierende Funktion. Bei Asthma spielen vor allem dendritische Zellen, T-

Helferzellen, IgE-produzierende B-Lymphozyten, Mastzellen und eosinophile Granulozyten in der allergisch entzündlichen Antwort eine Rolle. Während Phospholipide einen eher hemmenden Einfluss auf verschiedene Immunkfunktionen ausüben, zeigen SP-A und SP-D, dass sie in der Lage sind, verschiedene zelluläre Immunmechanismen zu aktivieren (Ledford, Pastva and Wright 2010). Eine ganze Reihe von Lungenerkrankungen gehen mit Veränderungen des pulmonalen Surfactant einher. Die pathophysiologische Rolle des Surfactant zeigt sich bei Frühgeborenen, die aufgrund ihrer Lungenunreife zu wenig dieser oberflächenaktiver Substanz produzieren. Diese Kinder neigen zu der Entwicklung eines Atemnotsyndroms (IRDS), welches lebensbedrohliche Ausmaße annehmen kann (Halliday 2008). Auch bei Erwachsenen kann eine abnorme Surfactant-Zusammensetzung, beispielsweise im Rahmen eines schweren Traumas oder einer Sepsis, zu einem akuten Atemnotsyndrom (ARDS) führen (Matthay and Zemans 2011).

1.2.3. Zusammensetzung des pulmonalen Surfactant

Surfactant stellt ein Phospholipid-Protein-Gemisch mit einer sehr definierten qualitativen und quantitativen Zusammensetzung dar. Biochemisch besteht Surfactant aus Lipiden (90 %) und spezifischen Proteinen (10 %), welche einen molekularen Lipidfilm an der alveolären Luft-Flüssigkeitsgrenze bilden.

Den größten Anteil an den Lipiden haben die Phospholipide (80 %), deren häufigster Vertreter das Dipalmitoylphosphatidylcholin ist. Darüber hinaus gibt es Phosphatidylglycerol (12 %) und Cholesterin (10 %) sowie eine Reihe anderer neutraler Lipidkomponenten.

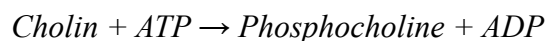
Neben den Phospholipiden stellen Proteine den zweitwichtigsten Surfactantbestandteil dar. Es gibt vier Hauptproteine SP-A, SP-B, SP-C, SP-D, welche in hydrophil (SP-A und SP-D) und hydrophob (SP-B und SP-C) unterteilt werden können (Chroneos, Sever-Chroneos and Shepherd 2010).

1.2.4. Biosynthese von Phosphatidylcholin: Der Kennedy-Pathway

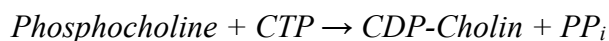
Phosphatidylcholin ist als multifunktionales Molekül zum einen für die Bildung von eukaryontischen Doppelmembranen essentiell, zum anderen ein obligater Bestandteil von Serum, Galle, Lipoproteinkomplexen und des pulmonalen Surfactant. Bereits 1956

beschrieben die Autoren Kennedy und Weiss einen Weg der de novo-Biosynthese dieses Moleküls (KENNEDY and WEISS 1956). Dieser *Kennedy-* oder *CDP-Cholin-Pathway* besteht aus drei enzymatischen Schritten, welche in der Bildung von Phosphatidylcholin münden. Im ersten Schritt wird Cholin nach Aufnahme in die Zelle durch die Cholin kinase in einer Adenosintriphosphat (ATP)-abhängigen Reaktion phosphoryliert. Es entstehen Phosphocholin und Adenosindiphosphat (ADP). Im zweiten Schritt katalysiert die CTP: Phosphocholin Cytidylyltransferase aus Phosphocholin und Cytidintriphosphat (CTP) die Bildung von Cytidine-Diphosphocholin (CDP-Cholin) und Pyrophosphat (PP_i). Schließlich wird in einem letzten Schritt mit Hilfe der Cholinphosphotransferase aus CDP-Cholin und Diacylglycerol (DAG) oder Alkyl-Acylglycerol (AAG) Phosphatidylcholin und Cytidin-5'-monophosphat (CMP) gebildet (Gibellini and Smith 2010).

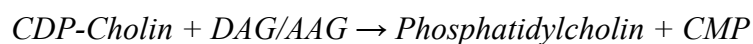
1. *Cholin kinase (CK):*



2. *CTP: Phosphocholin Cytidylyltransferase (CCT):*



3. *Cholinphosphotransferase (CPT):*



1.2.5. Cholin kinase und CTP: Phosphocholin Cytidylyltransferase

Die in Eukaryonten ubiquitär vorkommende Cholin kinase (CK) katalysiert den ersten Schritt des *Kennedy-Pathways*. Bei Säugetieren sind mindestens drei Isoformen bekannt (CK α 1, CK α 2 und CK β), welche in zwei separaten Genen verschlüsselt werden (Li and Vance 2008). Keine der Isoformen ist in ihrer monomeren Form aktiv. Vielmehr setzt sich das aktive Enzym aus Homo- oder Heterodimeren (oder Oligomeren) der drei Isoformen zusammen. Verschiedene Studien zeigen, dass Veränderungen der Cholin kinase-Aktivität die Rate der Phosphatidylcholinsynthese beeinflussen können (Aoyama, Liao and Ishidate 2004). Darüber hinaus könnte eine differentielle Expression verschiedener Cholin kinase-Isoformen in unterschiedlichen Geweben oder eine

Kombinationsveränderung der homo- und heterodimeren-Formen alternative Wege darstellen, den Durchfluss durch den *CDP-Cholin-Pathway* zu regulieren (Gibellini and Smith 2010).

Der zweite Schritt des *Kennedy-Pathways* wird durch die CTP: Phosphocholin Cytidylyltransferase (CCT) katalysiert, welche den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Phosphatidylcholin-Biosynthese reguliert (Post et al. 1984). Ähnlich der Cholin kinase wird die CTP: Phosphocholin Cytidylyltransferase ebenfalls durch zwei Gene codiert. Während die CTP: Phosphocholin Cytidylyltransferase alpha in den Zellkernen vieler Zelltypen exprimiert wird, finden sich relativ hohe Konzentrationen der CTP: Phosphocholin Cytidylyltransferase beta im Zellzytoplasma von Hoden und Ovarien (Li and Vance 2008). Es gibt Hinweise, dass die CTP: Phosphocholin Cytidylyltransferase eine bimodale Verteilung aufweist, die sowohl eine gelöste als auch eine partikuläre Form des Enzyms umfasst. Die lösliche, inaktive Form kann durch Translokation und Bindung an Membranen als Antwort auf passende physiologische Signale aktiviert werden. So soll das Enzym in der Lage sein, fluktuierende Phosphatidylcholin-Level *in vivo* wahrzunehmen und entsprechend den Phosphatidylcholingehalt der Zelle zu regulieren (Gibellini and Smith 2010).

1.3. Oxidativer Stress und die Rolle der Superoxiddismutasen

Das Lungengewebe wird in besonderem Maße mit hohen Sauerstoffkonzentrationen exponiert und stellt einen Hauptangriffsort für oxidative Schäden dar. Durch direkte umweltbedingte Exposition mit verschiedenen Luftschadstoffen in Form von Dieselabgasen, Stickstoffdioxid, Ozon oder Zigarettenrauch entsteht ein oxidatives Lungenmilieu, welches durch die endogene Produktion verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und reaktiver Stickstoffspezies (RNS) potenziert wird (Comhair and Erzurum 2010). Daraus wird deutlich, dass nicht nur die aerobe Lebensweise den Grad des oxidativen Stresses erhöht, sondern auch die mit vielen Lungenerkrankungen einhergehende Entzündung. Im Rahmen dieser stellen insbesondere die aktivierten Entzündungszellen sowie die residenten alveolären und interstitiellen Effektorzellen eine zusätzliche ROS- und RNS-Quelle im Organismus dar (Comhair and Erzurum 2002).

ROS umfassen Superoxide (O_2^-), Hydrogenperoxide (H_2O_2) und Hydroxylradikale

(OH) und werden in verschiedenen Lungenzellen und Stoffwechselwegen generiert. Superoxide ($O_2^{\cdot-}$) werden beispielsweise während des mitochondrialen Elektronentransports im Rahmen der Sauerstoffreduktion gebildet. Sie gelten als sehr instabil und können mit verschiedenen Proteinen reagieren und deren Struktur und Funktion beeinträchtigen. Die Reaktion zweier Superoxidionen resultiert in der Bildung von Hydrogenperoxid (H_2O_2). Diese Reaktion kann spontan erfolgen oder enzymatisch mit Hilfe der Superoxiddismutasen (SOD) katalysiert werden. Sowohl Superoxide als auch Hydrogenperoxide können in verschiedenen Reaktionen Hydroxylradikale(OH) formen, welche aufgrund ihrer ausgeprägten Reaktivität mit verschiedenen Biomolekülen interagieren (Ciencewicki, Trivedi and Kleeberger 2008). Das Haupt-RNS der Lunge ist Stickstoffmonoxid ($\cdot NO$), welches mit Hilfe der NO-Synthasen aus L-Arginin synthetisiert wird. Bei $\cdot NO$ handelt es sich um ein sehr reaktives Molekül, welches mit freien Radikalen in einer Radikal-Radikal-Reaktion zur Bildung weiterer toxischer Nitrogenmetabolite führt (Andreadis et al. 2003). Beispielsweise entsteht aus der Reaktion von $\cdot NO$ mit Superoxiden Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot-}$), welches in weiteren Schritten Tyrosinreste nitrieren und dadurch die Anzahl oder Funktion von Enzymen, Struktur- und Signalproteinen verändern kann (Abello et al. 2009).

Neben der Reaktion mit Makromolekülen wie Proteinen, Lipiden und Desoxyribonukleinsäure (DNA) können ROS und RNS auch die Signaltransduktion von Zellen verändern. In diesem Zusammenhang nehmen sie beispielsweise Einfluss auf die Regulierung von Transkriptionsfaktoren wie dem Nuklearfaktor κB ($NF\kappa B$), welcher mit der Induktion antioxidativer Enzyme in der Lunge assoziiert ist (Thannickal and Fanburg 2000).

Um die Lungen vor ROS zu schützen haben Lungengewebe und epitheliales Lining Fluid der Alveolen ein System chemischer und enzymatischer Antioxidantien entwickelt. Unter Antioxidantien versteht man Moleküle, welche Redox-Veränderungen in der Zelle verlangsamen oder verhindern und damit den Organismus vor oxidativem Stress schützen (Comhair and Erzurum 2010). Enzymatische Antioxidantien umfassen unter anderem Superoxiddismutasen, Katalasen und Glutathionperoxidasen. Die am meist untersuchtesten, nichtenzymatischen Antioxidantien sind unter anderem die Vitamine C und E, Albumin, Glutathion (GSH), Surfactantprotein D sowie die sekundären Pflanzenstoffe Carotinoide und Flavonoide (Suntres 2011).

Im aeroben Organismus gehören die ubiquitär vorkommenden Superoxiddismutasen (SOD) zu den wichtigsten antioxidativen Enzymen. Ihre Aufgabe ist es, die Zellen vor oxidativem Stress zu schützen, indem sie die Dismutation von Superoxiden zu H_2O_2 und molekularem Sauerstoff katalysieren (Kinnula and Crapo 2003).



Durch Abfangen freier Radikale sind SODs in der Lage, die normale Zellhomöostase aufrecht zu erhalten und im Krankheitsfall den Organismus vor der Progression einer Oxidantien-induzierten Lungenerkrankung zu schützen. Auf diese Weise tragen sie zum Erhalt der Zellintegrität bei (Comhair and Erzurum 2010).

SODs kommen in drei verschiedenen Formen vor, welche sich in Aufbau und Lokalisation unterscheiden.

Die Kupfer-Zink-SOD (CuZnSOD oder SOD1) zeigt die stärkste Expression im bronchialen Epithel, in alveolären Makrophagen, alveolären Typ-II-Zellen, mesenchymalen Zellen sowie im Endothel von Arteriolen und Kapillaren. Intrazellulär ist sie am häufigsten im Zytoplasma lokalisiert, findet sich aber in geringeren Konzentrationen auch in Lysosomen, Peroxisomen, im Nukleus und im Zwischenmembranraum von Mitochondrien (Chang et al. 1995).

Die Mangan-SOD (MnSOD oder SOD2) kommt hingegen hauptsächlich in der mitochondrialen Matrix vor. Da sie in gesunden Lungen proportional zum mitochondrialen Zellgehalt exprimiert wird, finden sich hohe Konzentrationen in alveolären Typ-II-Zellen, alveolären Makrophagen und bronchialen Epithelzellen (Kinnula and Crapo 2003).

1982 entdeckten Marklund et al. SOD-Aktivität in Plasma-, Lymph- und Synovialflüssigkeit und identifizierten eine eigene extrazelluläre Form der SOD (ECSOD oder SOD3) (Marklund 1982).

Die Kupfer und Zink enthaltende ECSOD weist an ihrem C-terminalen Ende eine extrazelluläre Matrix-bindende Region auf. Diese *Heparinbindungsdomäne* vermittelt die Bindung an Heparin/Heparansulfat sowie Typ-I-Kollagen und moduliert die Verteilung innerhalb der extrazellulären Matrix (Petersen et al. 2004).

Die Expression der ECSOD ist zell- und gewebespezifisch mit hohen Konzentrationen

in Lunge, Herz, Blutgefäßen, Plazenta und Nieren. Hohe mRNA- und Protein-Level finden sich in Typ-II-Zellen, Lungenmakrophagen, glatten Muskelzellen sowie einigen Fibroblasten und Endothelzellen.

Die ECSOD hat die Aufgabe, das extrazelluläre Kompartiment gegen Superoxide zu verteidigen und die NO-Bioaktivität zu erhalten. Auf diese Weise ist sie in der Lage, einige kardiovaskuläre und neuronale Erkrankungen zu modulieren sowie die Lunge vor oxidativer Entzündung und Fibrose zu schützen (Nozik-Grayck, Suliman and Piantadosi 2005).

1.4. Die Allergene Ovalbumin und Keyhole Limpet Hemocyanin

Ovalbumin (OVA) ist das mengenmäßig häufigste Protein des Eiklars von Vogeleiern, in denen es 60-65 % des Gesamtproteins ausmacht. Das 45 kDa große Glycoprotein gehört zu den Serpinen, einer Familie, die über 300 homologe Proteine mit diversen Funktionen umfasst (Gettins 2002).

Aufgrund seiner großen Verfügbarkeit findet OVA weit verbreiteten Einsatz in der Erforschung von Struktur und Eigenschaften von Proteinen. Daneben stellt die Immunologie ein weiteres Einsatzgebiet dar, bei welchem OVA zur experimentellen Induktion allergischer Reaktionen benutzt wird (Huntington and Stein 2001). Beispielsweise wird es in verschiedenen akuten und chronischen Tiermodellen häufig als Allergen eingesetzt, da es in den Atemwegen eine robuste, allergische Entzündung induzieren kann, welche der des humanen Asthmas sehr ähnlich ist (Nials and Uddin 2008).

Bei Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) handelt es sich um einen hochmolekularen Glykoproteinkomplex, der aus der Hämolymphe der *Großen kalifornischen Schlüssellochschncke* (*Megathura crenulata*, engl. Great Keyhole Limpet) gewonnen wird. Diese geht aus dem Stamm der Mollusken hervor und ist an der Pazifikküste von Kalifornien und Mexiko zu finden. KLH besteht aus zwei unabhängigen Isoformen, KLH1 und KLH2. Jede Isoform setzt sich ihrerseits aus acht funktionellen Einheiten mit jeweils zwei Kupferatomen zusammen, welche dem Hämocyanin die Fähigkeit zum Sauerstofftransport verleihen (Swerdlow et al. 1996).

KLH gilt als ein potentes Immunstimulans, welches sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort aktiviert. In diesem Zusammenhang gibt es mehrere Studien

die belegen, dass KLH die Immunantwort in Richtung einer T_H2-Antwort lenkt, wie sie auch bei Asthmatikern zu finden ist (Caucig et al. 2010, Yeung et al. 1998).

Aus dem nativen KLH wird durch Aufspaltung in kleinere Untereinheiten das Immunocyanin gewonnen, welches unter dem Namen *Immucothel*® biosyn Arzneimittel GmbH zur Rezidivprophylaxe von oberflächlichen Harnblasenkarzinomen eingesetzt wird (vgl. Produktinformation des Herstellers biosyn, unter <http://www.biosyn.de>, letzter Zugriff: 25.01.2012).

Neben Ovalbumin und humanen Serumalbuminen dient KLH als Trägerprotein in der Immunisierung von Menschen und Tieren. Durch die Kopplung an KLH werden immunologisch wenig reaktive Moleküle, sogenannte Haptene, dem Immunsystem als vollwertige Antigene präsentiert. Auf diese Weise ist der Organismus in der Lage, Antikörper gegen diese Moleküle zu produzieren. Als Arzneimittel ist das Immunocyanin-Produkt *VACMUN*® biosyn Arzneimittel GmbH für eine Konjugation mit Antigenen/Haptenen erhältlich (vgl. Produktinformation des Herstellers biosyn, unter <http://www.biosyn.de>, letzter Zugriff: 25.01.2012). Diese gereinigte Mischung aus KLH1 und KLH2 dient als spezifischer Träger für eine ganze Reihe von Antigenen und findet beispielsweise in der Immuntherapie als Bestandteil von Impfstoffen Anwendung. In der Medizin und medizinischen Forschung wird KLH als unspezifischer Immunstimulator benutzt, mit dessen Hilfe die Immunkompetenz eines Organismus getestet werden kann (Harris and Markl 1999).

Diese immunogenen Eigenschaften qualifizieren KLH in unserem Mausmodell neben Ovalbumin zur Induktion eines allergischen Asthmas, als Proteinantigen zur Anwendung zu kommen.

1.5. Hygienehypothese

Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurden viele Versuche unternommen, die steigenden Prävalenzen von Allergien und allergischem Asthma zu erklären. Einer dieser Erklärungsversuche umfasst die *Hygienehypothese*, welche den verbesserten Hygienestandard des westlichen Lebensstils für die beobachtete Zunahme an Allergien und Asthma verantwortlich macht. Das Konzept geht darauf zurück, dass sich das Immunsystem in wiederholtem Kontakt mit bakteriellen und parasitären Infektionen entwickelt habe und dass in verwestlichten Gesellschaften durch das Fehlen

immunstimulierender Substanzen das kindliche Immunsystem nicht mehr angemessen programmiert würde. Dieser fehlende infektiöse Stimulus führe zu dem Auftreten von immer mehr Allergien gegenüber natürlichen Bestandteilen der Umwelt (Garn and Renz 2007).

Erste Hinweise für diese Hypothese lieferte David P. Strachan 1989 in einer Studie, in welcher er eine inverse Korrelation zwischen dem Auftreten von Heuschnupfen und Ekzemen sowie der Anzahl der im Haushalt lebenden Kinder beobachtete (Strachan 1989).

Seitdem wurde die *Hygienehypothese* durch verschiedene Forscher im Bereich der Epidemiologie, der klinischen Naturwissenschaften und der Immunologie immer weiter modifiziert. Es wurden einige Faktoren identifiziert, die vor dem Auftreten allergischer Erkrankungen schützen sollen. Diese Faktoren umfassen unter anderem Infektionen mit Parasiten, die Exposition gegenüber Endotoxinen und Haustieren, das Aufwachsen auf einem Bauernhof und unter vielen Geschwistern sowie den Besuch einer Kinderrippe in jungen Lebensjahren (Braun-Fahrländer et al. 2002, Riedler et al. 2001, Krämer et al. 1999).

Es stellte sich heraus, dass der Zeitfaktor der Exposition eine zentrale Rolle spielt. Kinder, die schon im ersten Lebensjahr Kontakt mit Ställen hatten, litten signifikant weniger an allergischen Erkrankungen als Kinder mit entsprechender Exposition nach dem ersten Lebensjahr. Dabei war die Exposition, die bereits im Mutterleib stattfand, mit dem deutlichsten Schutz vor allergischen Erkrankungen verbunden (Radon et al. 2004).

Ein immunologischer Mechanismus, der mit der *Hygienehypothese* assoziiert wird, ist die Veränderung der T_H1/T_H2 -Balance. In diesem Zusammenhang sollen bakterielle oder virale Infektionen in der Kindheit das sich entwickelnde Immunsystem in Richtung einer T_H1 -Antwort lenken, welche die pro-allergischen Effekte einer T_H2 -Antwort kompensiert. Auf diese Weise könnte eine Reduzierung der mikrobiellen Last in einer starken T_H2 -Prägung resultieren und das Auftreten von Allergien begünstigen (Schaub, Lauener and von Mutius 2006).

Diese Idee wird durch die Beobachtungen in Frage gestellt, dass sich neben allergischen Erkrankungen auch die Prävalenz an T_H1 -dominierten Autoimmunerkrankungen erhöht

habe und dass eine T_H2-favorisierte Helminthen-Infektion nicht mit dem Auftreten allergischer Erkrankung assoziiert war (Yazdanbakhsh et al. 2002).

Bisher gibt es noch kein vereinigendes Konzept, welches die genauen Mechanismen der *Hygienehypothese* erklärt. Vielmehr scheint ein komplexes Zusammenspiel aus Genetik und Immunantwort des Wirtes, den Eigenschaften der eindringenden Mikroorganismen und den Charakteristiken der Umweltexposition das Auftreten allergischer Erkrankungen zu beeinflussen (Schaub et al. 2006).

1.6. Umwelthypothese

Ein weiterer Erklärungsversuch für die Zunahme allergischer Erkrankungen umfasst die *Umwelthypothese*, nach der Umweltschadstoffe in der Atemluft für die steigenden Prävalenzen verantwortlich gemacht werden. Nach dieser Hypothese würden Stickstoffdioxid (NO₂), Ozon, Tabakrauch, Schwefeldioxid und Dieselpartikel das allergieauslösende Potential der Allergene verstärken oder mit ihnen in die empfindlicher gewordenen Atemwege hineingetragen.

1.6.1. Ost-West-Vergleich

Um die Hypothese zu verifizieren wurden kurz nach der Wiedervereinigung Bevölkerungsgruppen aus belasteten Gebieten Ostdeutschlands mit genetisch ähnlichen Gruppen aus dem Westen verglichen. Dabei wurde untersucht, ob die Art der Umweltverschmutzung und der unterschiedliche Lebensstil zwischen Ost und West die Inzidenz von allergischen Atemwegserkrankungen beeinflussen. Es wurde angenommen, dass die Menschen in Ostdeutschland durch Industrieausstöße, *Trabi*-Abgase und Kohleheizungen einer viel giftigeren Umgebung ausgesetzt waren und deshalb unter mehr Allergien leiden müssten, als die Menschen aus dem Westen. Doch viele der Studien konnten diese Hypothese nicht bestätigen. Während sich bei den Westdeutschen eine erhöhte Prävalenz an allergischen Erkrankungen zeigte, wiesen Menschen aus dem Osten eine erhöhte Rate an infektiösen Atemwegserkrankungen auf (Duhme et al. 1998, von Mutius et al. 1994).

Langzeitstudien der Umwelthypothese belegten, dass der Unterschied der Umweltverschmutzung in Gebieten Ost- und Westdeutschlands mittlerweile fast völlig verschwunden ist (von Mutius et al. 1998).

In diesem Zusammenhang zeigte sich in Ostdeutschland neben einer rückläufigen Anzahl infektiöser Atemwegserkrankungen eine zunehmende Prävalenz an Allergien und Asthma, was die Autoren auf die zunehmende Verwestlichung des Ostens zurückführten (Matricardi 2001, von Mutius 1998).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Art der Luftverschmutzung einen großen Einfluss auf den Erkrankungstyp ausübt. So fand sich in Ostdeutschland nach der Wiedervereinigung eine Zunahme von Verkehrsabgasen (NO₂, Ozon, lungengängige Feinstäube) und ein Rückgang von Umweltverschmutzung und Industrieausstößen (Schwefeldioxid) (D'Amato 2000).

Es gibt zahlreiche epidemiologische Studien, die sich mit den kurz- und langfristigen Effekten von verkehrsbedingter Luftverschmutzung auf die Entstehung allergischer Erkrankungen beschäftigen. In der epidemiologischen Zusammenschau zeigt sich für Asthma und allergische Sensibilisierung ein widersprüchliches Bild. Neben vielen Studien, die eine positive Assoziation belegen (Morgenstern et al. 2008, Nordling et al. 2008), konnten andere Studien die negativen Auswirkungen von Umweltschadstoffen auf Asthma und allergische Sensibilisierung nicht bestätigen (Rosenlund et al. 2009, Oftedal et al. 2009). Die Gründe für die beobachtete Heterogenität sind vielfältig. So können methodologische Unterschiede, interferierende Confounder und die generelle Variabilität in der durch Gen-Polymorphismen bestimmten Luftschadstoff-Empfindlichkeit die Ergebnisse beeinflussen (Bråbäck and Forsberg 2009, Yang et al. 2008).

1.6.2. Wirkungsprofile von Schadstoffgruppen

Der Respirationstrakt stellt eine primäre Grenzfläche zur äußeren Umgebung dar und steht in einer ständigen Konfrontation mit inhalierten Antigenen diversen Ursprungs. Pollen, Tier- und Pflanzenproteine, anorganische Stäube und Verbrennungsmaterialien aus Industrie, Verkehr und Zigarettenrauch erzeugen Mengen zwischen Tausenden bis zu mehreren Millionen Partikel pro cm³.

Luftschadstoffe lassen sich nach ihrer Quelle (innerhäuslich vs. außerhäuslich), der Art ihrer Freisetzung (primär vs. sekundär) sowie ihrer Größe und chemischen Zusammensetzung einteilen. Beispielsweise lassen sich gasförmige (NO₂, Ozon, Schwefeldioxid, flüchtige organische Verbindungen) von partikulären Substanzen

(grobe 2.5-10 μm , feine 0.1-2.5 μm , ultrafeine $< 0.1 \mu\text{m}$) unterscheiden (Bernstein et al. 2004). Unter den atmosphärischen Schadstoffen gilt NO_2 als eines der Hauptoxidantien, welches aufgrund seiner hohen Reaktivität mit Epithelien und Proteinen interagieren kann. NO_2 wird zum einen endogen im Rahmen von Entzündung und oxidativem Stress gebildet. Größere Mengen sind allerdings exogenen Ursprungs und entstehen innerhäuslich durch Gaskocher, Kohleheizung und Tabakrauch sowie außerhäuslich durch Emissionen von Motorfahrzeugen und die Verwendung fossiler Brennstoffe in der Industrie (Brunekreef 2001).

Menschen sind nicht *allergisch* gegenüber den Schadstoffen. Das heißt, Menschen generieren keine adaptive Immunantwort gegen Schadstoffe *per se*. Daher stellt sich die Frage, wie Schadstoffe mit Oberflächen und Abwehr interagieren und die Gesundheit beeinflussen. Eine Antwort gibt das Review von Bernstein et al., in dem verschiedene Effekte der Luftverschmutzung auf die Gesundheit erläutert werden (Bernstein et al. 2004).

Nach diesem Review sind einige Schadstoffe in der Lage, freie Radikale zu bilden und den Level an oxidativem Stress zu erhöhen. Neben einer Modifizierung von intrazellulären Schlüsselproteinen können Radikale normale Abwehrmechanismen supprimieren und beispielsweise die Makrophagenfunktion und antioxidative Kapazität beeinträchtigen. Adjuvante biologische Bestandteile wie das bakterielle Endotoxin können eine Entzündung induzieren, die von verschiedenen Immunreaktionen begleitet wird. All diese Reaktionen sind von den direkt reizenden Effekten akuter, großer Schadstoffmengen abzugrenzen.

Kontrollierte Challenge-Studien haben sich mit der Interaktion von Schadstoffen und Allergenen beschäftigt. Dabei zeigte sich, dass Bestandteile des photochemischen Smogs wie Ozon und NO_2 individuell oder in Kombination die Atemwegsantwort auf inhalierte Allergene verstärken, die Abwehrkraft gegen Infektionen reduzieren und dadurch eine Asthmaexazerbation begünstigen können (Saxon and Diaz-Sanchez 2005). Beispielsweise demonstrierten Poynter et al., dass 25 ppm NO_2 die allergische Atemwegsantwort auf OVA verstärkt, was sich in ihrer Tierstudie in einer gesteigerten eosinophilen und neutrophilen Entzündung und einer verlängerten Atemwegshyperreaktivität äußerte (Poynter et al. 2006).

Ebenso zeigten Bevalender et al., dass bereits 10 ppm NO_2 in C57BL/6-Mäusen eine

allergische T_H2-Sensibilisierung gegenüber inhalierten Antigenen induzieren und zur Entwicklung von Asthma-ähnlichen Pathologien beitragen kann. Dabei beschrieben die Autoren NO₂ als ein effektives inhaliertes Adjuvant, welches die adaptive Immunantwort auf normalerweise harmloses Antigen lenkt (Bevelander et al. 2007).

Die Interaktionen zwischen Schadstoffen, Allergenen und Lungengewebe sind komplex und können aus verschiedenen Richtungen beleuchtet werden. Zum einen kann eine Schadstoffexposition die Atemwege direkt schädigen und eine inflammatorische Reaktion induzieren. Die Entzündung kann zu einer erhöhten Epithelpermeabilität mit erhöhter Allergenpenetration beitragen und dadurch Zugang und Interaktion mit Zellen des Immunsystems erleichtern (Devalia, Rusznak and Davies 1998). Darüber hinaus können Schadstoffe die Atemwege sensibilisieren. Beispielsweise gibt es Hinweise, dass die Atemwege prädisponierter Personen nach Schadstoffexposition reaktiver werden und als Konsequenz empfindlicher auf inhalierte Allergene reagieren (Bevelander et al. 2007).

Neben den Effekten auf die Atemwege können sich Luftschadstoffe aber auch gegen die Allergene selbst richten und luftübertragene Proteine modifizieren (Franze et al. 2005).

1.6.3. Nitrierung von Proteinen

Unser Projekt greift die Umwelthypothese wieder auf und geht dem Einfluss von Verkehrsabgasen auf die Zunahme allergischer Erkrankungen tierexperimentell nach.

Die Forschergruppe um Franze et al. beschreibt die Fähigkeit von NO₂, die allergische Antwort auf OVA zu verstärken und Proteine effektiv zu nitrieren (Franze et al. 2005).

So wurde unter städtischen Smogbedingungen eine Nitrierung von Tyrosinresten verschiedener Proteine wie des Birkenpollenallergens Bet v 1-A beobachtet. Darüber hinaus fand die gleiche Studie in Stäuben von Ballungsgebieten nitrierte Proteine, wobei der Grad der Nitrierung mit der Konzentration von Stickoxiden und Ozon in der Umgebungsluft korrelierte. So scheinen Konzentrationen, wie sie beim Sommersmog anzutreffen sind, innerhalb weniger Stunden einen hohen Nitrierungsgrad von Proteinen verursachen zu können.

Es zeigte sich, dass posttranslationale Modifizierungen in Form von Phosphorylierung, Glycosylierung und Cysteinylierung die Immunogenität von Proteinen beeinflussen und eine Rolle in der Entwicklung von Autoimmunantworten spielen (Doyle and Mamula

2005). Zusätzlich können Veränderungen einzelner Aminosäuren die Allergenität von Proteinen verändern. Beispielsweise konnte eine Punktmutation in Bet v 1-A die IgE-Bindung des Birkenpollenallergens stark beeinflussen (Spangfort et al. 2003). In ähnlicher Weise könnte sich eine Nitrierung von Tyrosinresten auf Immunogenität und Allergenität von Proteinen auswirken. In diesem Zusammenhang verglichen Gruijthuijsen et al. die *in vivo* Immunogenität von *in vitro* nitrierten und unmodifizierten Proben des Nahrungsmittelallergens OVA und des Birkenpollenallergens Bet v 1-A (Gruijthuijsen et al. 2006). Sie untersuchten die Proben hinsichtlich ihrer Wirksamkeit, Mäusesplenozyten zur Proliferation und Zytokinsekretion anzuregen und der Fähigkeit, in sensibilisierten Mäusen die spezifischen Immunglobuline IgG1, IgG2a und IgE zu induzieren. Als Ergebnis zeigte sich, dass nitrierte Allergene die Proliferation und Zytokinausschüttung von IL-5 und IFN- γ stärker erhöhen konnten als die unmodifizierten Formen. Ebenfalls fanden sich im Serum von Mäusen, die mit nitrierten Allergenen sensibilisiert wurden, höhere Level an spezifischem IgE, IgG1 und IgG2a. Dabei wurden in einigen Mäusen kreuzreaktive Antikörper gegen das jeweilig andere nitrierte Allergen gefunden. In parallelen Untersuchungen mit nativem und nitriertem Birkenpollenallergen Bet V 1-A zeigten die nitrierten Allergene in den BALB/c-Tieren stärkere Effekte als die nicht nitrierten Formen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Nitrierung das allergene Potential von Proteinen verstärkt und unterstützen die Vermutung, dass Verkehrsabgase die Zunahme von Allergien fördern.

Neben der exogenen Nitrierung von Tyrosinresten verschiedener Allergene findet im Rahmen von Entzündungen, oxidativem Stress und biologischem Altern auch eine endogene Nitrierung von körpereigenen Proteinen statt. Diese Nitrierungen sind mit einer Vielzahl an Erkrankungen assoziiert und werden häufig als Richtungswechsel in einen oxidativen und potentiell pathologischen Stoffwechselweg interpretiert (Radi 2004).

Die Protein-Tyrosinnitrierung birgt verschiedene biologische Konsequenzen. Neben Veränderungen von Proteinstruktur und Funktion kann eine Nitrierung die Signaltransduktion von Zellen beeinflussen. Darüber hinaus können posttranslationale Modifizierungen von Selbstproteinen in einer Triggerung der Immunantwort resultieren und die Entstehung von Autoimmunerkrankungen begünstigen (Abello et al. 2009).

In diesem Zusammenhang könnten sich autologe Antigene mit 3-Nitrotyrosinresten der immunologischen Selbsttoleranz entziehen und eine Zell-vermittelte Immunantwort auslösen (Birnboim et al. 2003).

1.7. Fragestellungen

Experimente zeigen, dass Proteine durch Luftschadstoffe wie dem atmosphärischen Stickstoffdioxid (NO₂) nitriert werden können (Franze et al. 2005) und dass eine solche posttranslationale Proteinmodifikation die Immunogenität der Allergene verstärkt (Gruijthuijsen et al. 2006). Im Gegensatz zur endogenen Nitrierung, wie sie beispielsweise im Rahmen von Entzündungen auftritt, wird erwartet, dass exogen nitrierte Proteine Fremdstoffe sind, auf die ein Organismus mit Abwehrreaktionen reagiert. Da die Lunge in besonderem Maße gegenüber diesen Fremdstoffen exponiert wird, sind Veränderungen ihrer Struktur und Funktion zu vermuten.

Im Rahmen dieser Arbeit soll an einem Mausmodell durch Verwendung zweier Allergene in nativer und nitrierter Form der Einfluss der Proteinnitrierung auf verschiedene strukturelle, biochemische und molekularbiologische Parameter des allergischen Asthmas untersucht werden. Dazu werden C57BL/6-Wildtypiere entsprechend des Protokolls zur Induktion eines akuten allergischen Asthmas behandelt und mit PBS / (n)OVA / (n)KLH sensibilisiert und provoziert. Bei einem Teil der Tiere wird mittels invasiver Lungenfunktionsanalyse mit Hilfe des FlexiVent®Systems die Atemwegshyperreaktivität gegenüber Methacholin gemessen und die Lungen anschließend histologisch aufgearbeitet. Neben der HE-Übersichtsfärbung erfolgt eine Immunhistochemische Färbung der CuZnSOD und MnSOD. Bei dem anderen Teil der Tiere werden Plasma und bronchoalveoläre Lavage (BAL) gewonnen sowie Typ-II-Pneumozyten isoliert. Im Plasma wird die Gesamt-SOD-Aktivität gemessen, mittels Zytospin die BAL-Zytologie ermittelt und aus dem zellfreien Lavage-Überstand Gesamtprotein und Gesamtphospholipid bestimmt. Die isolierten Typ-II-Pneumozyten werden mittels Real-time RT-PCR hinsichtlich ihres mRNA-Gehalts an Phospholipid-synthetisierenden und antioxidativen Enzymen der SOD-Untergruppen untersucht. Darüber hinaus wird in den Typ-II-Zellen der Proteingehalt der MnSOD mittels Western Blot bestimmt.

Mit Hilfe dieser Methoden sollen die folgenden Fragestellungen beantwortet werden:

- 1) **Bewirken nitrierte Allergene in einem kompletten Individuum eine stärkere Entzündungsreaktion als die entsprechenden nicht nitrierten Allergene?**
- 2) **Kann eine Nitrierung des Allergens allein in der Phase der systemischen Sensibilisierung eine entzündliche Reaktion verstärken?**
- 3) **Kann eine Nitrierung des Allergens allein in der Phase der lokalen Allergenprovokation eine entzündliche Reaktion verstärken?**
- 4) **Reagiert ein Individuum bei bestehender Sensibilisierung gegen ein definiertes nitriertes Allergen auch gegen andere nitrierte Allergene?**

Die Ergebnisse werden zum Verständnis der biochemischen und molekularen Mechanismen bei der Immunantwort auf nitrierte Allergene beitragen und die abschließende Frage beantworten, ob die Nitrierung von Allergenen eine Erklärung für die beobachtete Zunahme von Allergien und allergischem Asthma darstellt.

2. Material und Methoden

2.1. Tiere

Um die Morphologie und Pathophysiologie menschlicher Erkrankungen in vivo untersuchen zu können, wurden diverse Tiermodelle etabliert, unter denen das Mausmodell eine bedeutende Rolle einnimmt. Zum einen ist das Immunsystem der Maus dem des Menschen in einigen immunologischen Mechanismen der allergischen Reaktion sehr ähnlich. Zum anderen gibt es die Möglichkeit immunologische Defizite gezielt mit Hilfe von gut charakterisierten Mutanten und Inzuchtstämmen zu untersuchen. Da zur Erforschung der immunologischen Reaktionen eine Vielzahl an Antikörpern und Nachweisverfahren zur Verfügung stehen, können Mausmodelle wertvolle Informationen hinsichtlich der Pathogenese und Behandlung von Asthma liefern (Bates, Rincon and Irvin 2009, Kips et al. 2003).

Die Versuche dieser Arbeit wurden an weiblichen 6-8 Wochen alten C57BL/6-Wildtyp Mäusen der Firma Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld, Deutschland durchgeführt. Die Haltung der Tiere erfolgte im Tierstall des Biomedizinischen Forschungszentrums (BMFZ) der Philipps-Universität Marburg in *Einzelbelüfteten Käfigsystemen*, sogenannten *IVC-Racks*, unter definierten hygienischen Bedingungen (21°C, 55 % Luftfeuchtigkeit, Tag-Nacht-Zyklus von 12 h). Die Versorgung der Tiere erfolgte durch das Tierpflegepersonal und umfasste die regelmäßige Beobachtung und Kontrolle der Tiere, die Fütterung, den regelmäßigen Wechsel von Trinkwasser und Einstreu sowie die Reinigung der Tierkäfige und Tierräume. Alle Mäuse bekamen Futter und Wasser *ad libitum*.

2.2. Versuchsprotokoll

Mäuse entwickeln Asthma nicht spontan. Daher ist es zur Erforschung des Erkrankungsmechanismus notwendig, eine artifizielle asthmaartige Reaktion in den Atemwegen zu induzieren. Ein verbreitetes Modell umfasst die systemische Applikation einer allergenen Substanz in der Gegenwart eines Adjuvans mit anschließender pulmonaler Gabe des Allergens in aerosolierter Form.

2.2.1. Allergische Sensibilisierung

Die Sensibilisierung gegen ein Allergen stellt die Grundvoraussetzung zur Initiierung einer lokalen Entzündungsreaktion in der Lunge dar, indem sie zur Bildung allergenspezifischer Antikörper führt. Adjuvanzien wie Aluminiumhydroxid ($\text{Al}(\text{OH})_3$) unterstützen diesen Prozess und fördern die Entwicklung des Immunsystems hin zu einem $\text{T}_\text{H}2$ -Phänotyp (Renz et al. 1992). Zur Auslösung der Sensibilisierungsreaktion wurden sechs bis acht Wochen alten Mäusen an den Tagen 0, 14 und 21 jeweils 200 μl PBS mit je nach Gruppenzugehörigkeit

10 μg OVA adsorbiert an 1,5 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ bzw.

10 μg nOVA adsorbiert an 1,5 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ bzw.

10 μg nKLH adsorbiert an 1,5 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$

intraperitoneal injiziert (Tabellen 1, 2). Kontrollen wurden zum Ausschluss von unspezifischen irritativen Effekten des Sensibilisierungsvorgangs mit 200 μl PBS und 1,5 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ scheinensensibilisiert.

Die nitrierten Formen von OVA und KLH (nOVA und nKLH) wurden uns freundlicherweise von PD Dr. Pöschl vom MPI für Chemie und Biochemie in Mainz zur Verfügung gestellt. Für Details über die Nitrierungsverfahren von Allergenen wird auf andere Stellen verwiesen. (Grujthuijsen et al. 2006, Franze et al. 2005, Walcher et al. 2003, Franze et al. 2003).

Material:

PBS-Dulbecco (10 %)

PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT

Verwendung als 1 %iges PBS

Aluminiumhydroxid $\text{Al}(\text{OH})_3$

Pierce Biotechnology, Bonn

Ovalbumin (OVA), Grad V

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Keyhole Limpet Hämocyanin (KLH)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.2.2. Allergenprovokation

Durch erneuten Antigenkontakt erfolgte durch Vernetzung von antigenspezifischen Immunglobulinen die Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung vom Soforttyp. Die Allergen-Provokation mit OVA (nOVA, KLH, nKLH) wurde an den Tagen 26, 27 und 28 durchgeführt. Hierzu wurden 5 ml 1 %iges OVA (nOVA, KLH, nKLH) gelöst in PBS, 20 min lang in einem Düsenvernebler aerosoliert und kontinuierlich in eine ca. 20 x 20 x 15 cm große Plastikkammer geleitet. Die Tröpfchengröße des Aerosols betrug 1-2 µm und war damit atemwegsgängig (Clay et al. 1983).

Material:

Ovalbumin (OVA), Grad V

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Keyhole Limpet Hämocyanin (KLH)

*Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Steinheim*

PBS-Dulbecco (10 %)

PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT

Plastikkammer (20 x 20 x 15 cm³)

Eigenanfertigung

Düsenvernebler

Pari GmbH, Starnberg

Rompun® 2 %ige Lösung (Xylazinhydrochlorid)

Bayer AG, Leverkusen

Ketamin Inresa 50 mg/ml (Ketaminhydrochlorid)

Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg

2.2.3. Versuchsaufbau

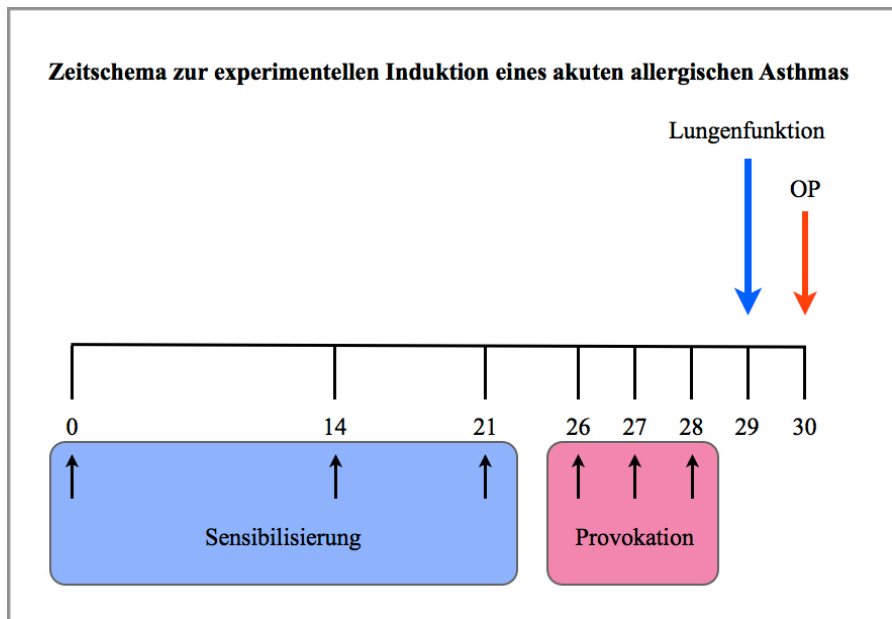


Abbildung 1: Zeitschema zur experimentellen Induktion eines akuten allergischen Asthmas

Tag 0, 14, 21: Sensibilisierung

Tag 26, 27, 28: Provokation

Tag 29: Lungenfunktionstest mit Entnahme der Lungen in toto zur weiteren histologischen Untersuchung

Tag 30: OP mit Entnahme von Plasma, bronchoalveolärer Lavage (BAL) und Isolierung von Typ-II-Pneumozyten

OVA-Gruppen

Tabelle 1: OVA-Versuchsgruppen und Behandlungssubstanzen für Sensibilisierung und Provokation

Gruppen	Sensibilisierung	Provokation
PBS/OVA	200 µl PBS mit 1,5 mg Al(OH) ₃	5 ml 1 % OVA in PBS
PBS/nOVA	200 µl PBS mit 1,5 mg Al(OH) ₃	5 ml 1 % nOVA in PBS
OVA/OVA	200 µl PBS mit 10 µg OVA adsorbiert an 1,5 mg Al(OH) ₃	5 ml 1 % OVA in PBS
OVA/nOVA	200 µl PBS mit 10 µg OVA adsorbiert an 1,5 mg Al(OH) ₃	5 ml 1 % nOVA in PBS
nOVA/nOVA	200 µl PBS mit 10 µg nOVA adsorbiert an 1,5 mg Al(OH) ₃	5 ml 1 % nOVA in PBS

PBS = Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline), OVA = Ovalbumin, nOVA = nitriertes Ovalbumin, Al(OH)₃ = Aluminiumhydroxid

KLH-Gruppen

Tabelle 2: KLH-Versuchsgruppen und Behandlungssubstanzen für Sensibilisierung und Provokation

Gruppen	Sensibilisierung	Provokation
PBS/KLH	200 µl PBS mit 1,5 mg Al(OH) ₃	5 ml 1 % KLH in PBS
PBS/nKLH	200 µl PBS mit 1,5 mg Al(OH) ₃	5 ml 1 % nKLH in PBS
nKLH/OVA	200 µl PBS mit 10 µg nKLH adsorbiert an 1,5 mg Al(OH) ₃	5 ml 1% OVA in PBS
nOVA/KLH	200 µl PBS mit 10 µg nOVA adsorbiert an 1,5 mg Al(OH) ₃	5 ml 1% KLH in PBS
nOVA/nKLH	200 µl PBS mit 10 µg nOVA adsorbiert an 1,5 mg Al(OH) ₃	5 ml 1 % nKLH in PBS
nKLH/nKLH	200 µl PBS mit 10 µg nKLH adsorbiert an 1,5 mg Al(OH) ₃	5 ml 1 % nKLH in PBS

PBS = Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline), OVA = Ovalbumin, nOVA = nitriertes Ovalbumin, Al(OH)₃ = Aluminiumhydroxid, KLH = Keyhole Limpet Hämocyanin der Schlüssellochschncke Megathura crenulata, nKLH = nitriertes Keyhole Limpet Hämocyanin

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Daten wurden aus 10 Wiederholungen des oben erläuterten Zeitschemas mit jeweils 4-5 unterschiedlichen Gruppen à 4-6 Tieren erhoben.

Die verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel waren von höchster erhaltlicher Reinheitsstufe.

2.3. Lungenfunktionstest

Die Atemwegshyperreagibilität (AHR) ist bedingt durch eine Entzündung der Atemwege mit zellulärer Infiltration und Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren und gilt als ein Leitsymptom des allergischen Asthmas (Southam et al. 2007). Im Mausmodell wurde die AHR durch Messung der Lungenfunktion nach Provokation der Atemwege mit aerosolisiertem Methacholin bestimmt. Dies geschah mittels invasiver Lungenfunktionsanalyse mithilfe eines computerkontrollierten Kleintier-Kolbenhub-Respirators (Scireq-flexiVent™ Ventilator emka TECHNOLOGIES). Mit diesem Respirator wurden die Tiere mechanisch ventiliert und die Parameter der Atemmechanik gemessen. Dabei diente der Respirator als Signalgeber und Messgerät zugleich. Das Atemzugvolumen wurde durch die Dislokation des Kolbens bestimmt und der Atemwegsdruck über einen Side Port am Kolben mittels eines Druckwandlers gemessen. Durch die Position des Kolbens konnte das zugeführte Volumen, der hierbei aufgewendete Druck sowie die Strömungsgeschwindigkeit der Atemluft (Peak Flow) ermittelt werden.

Ein Teil der Mäuse wurde 24 Stunden nach der letzten Allergenprovokation durch intraperitoneale Injektion von 50 µl Narkoselösung anästhesiert, mittels einer 20-Gauge Stahlkanüle tracheostomiert und an das FlexiVent®Systems angeschlossen. Die Muskelrelaxation der Tiere erfolgte durch die Gabe von 50 µg Esmeron® intramuskulär und verhinderte ein Gegenatmen während der Messung. Die mechanische Ventilation erfolgte mit einer Beatmungsfrequenz von 120/min volumenkontrolliert und drucklimitiert bei einem Tidalvolumen (V_t) von 10 ml/kg, einem maximalen Druck (P_{max}) von 30 cmH₂O und einem positiven endexpiratorischen Druck (PEEP) von 3 cmH₂O.

Nach Abflachen der spontanen Atmung erfolgte die Messung der Ausgangs-Lungenfunktion. Anschließend wurden nacheinander ca. 35 µl PBS und das Acetylcholin-Analogon Methacholin in ansteigender Konzentration (1 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml) 10 s vernebelt und nach jeweils 1 min sowohl die Resistance als auch Compliance, PEEP und P_{max} bestimmt. Die Resistance-Mittelwerte zum Zeitpunkt 0 (PBS-Vernebelung) wurden gleich 100 % gesetzt und die Mittelwerte der verschiedenen Methacholinkonzentrationen entsprechend prozentual umgerechnet.

Nach erfolgter Messung wurden die Lungen der Mäuse herausoperiert und in 4 % Formaldehyd zur weiteren histologischen Aufarbeitung fixiert.

Narkose: 3,125 ml Rompun 2 %

+ 10 ml Ketamin 50 mg / ml

Diese 5 %ige Lösung wurde vor der Applikation im Verhältnis 1 : 5 mit PBS verdünnt.

Material:

Rompun® 2 %ige Lösung (Xylazinhydrochlorid)

Bayer AG, Leverkusen

Ketamin Inresa 50 mg/ml (Ketaminhydrochlorid)

Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg

Rocuronium (Esmeron®)

Essex Pharma GmbH, München

PBS-Dulbecco (10 %)

PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT

Methacholin (Acetyl- β -ethylcholinchlorid)

*Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Steinheim*

Ventilator Scireq-flexiVent™

emka TECHNOLOGIES, Paris, F

2.4. Lungenhistologie

Die in 4 % Formaldehyd 2 x 24 Stunden fixierten und in Paraffin eingebetteten Lungen wurden mit dem Stahlmesser des Mikrotoms in ungefähr 2 µm dicke Scheiben geschnitten, im Wasserbad geglättet und durch Überschmelzung im Heizschrank für 2 Stunden bei 37°C auf einen beschichteten Objektträger montiert. Danach wurden die Präparate zur besseren Kontrastierung der einzelnen Zell- und Gewebsbestandteile auf unterschiedliche Weise gefärbt. Die mikroskopische Auswertung der HE-gefärbten Präparate erfolgte in 50-, 200- und 500facher Vergrößerung nach optischem Eindruck.

2.4.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Mit dieser Übersichtsfärbung wurde ein Teil der histologischen Dünnschnitte der Lungenproben gefärbt. Da das Hämatoxylin positiv geladen ist, färbt es saure Strukturen wie Zellkerne und die darin enthaltene DNA blau-violett. Eosin ist hingegen negativ geladen und färbt alle basischen Strukturen rot. Dies sind vor allem die Zellplasmaproteine sowie faserige extrazelluläre Komponenten.

Die Gewebeschnitte wurden durch Eintauchen in 2 x 5 min Xylol entparaffiniert und durch Einbringen in eine absteigende Alkoholreihe rehydratisiert.

- 2 x Ethanol 100 % jeweils 1 min
- 2 x Ethanol 96 %
- 1 x Ethanol 80 %
- 1 x Ethanol 70 %

Nach dem Spülen in Aqua dest wurden die Schnitte für 30 s mit Hämatoxylin nach Mayer gefärbt und für 1 min durch fließend warmes Leitungswasser gebläut. Nach erneutem Spülen in Aqua dest wurden die Dünnschnitte einer ansteigenden Alkoholreihe zugeführt und für 15 s mit Eosin gefärbt.

- 1 x Ethanol 70 % jeweils 1 min
- 1 x Ethanol 80 %
- 2 x Ethanol 96 %
- Färben mit Eosin 15 s
- 2 x Ethanol 96 % jeweils 1 min
- 2 x Ethanol 100 %

Die abschließende Dehydratisierung erfolgte durch erneutes Eintauchen in 2 x 5 min Xylol.

Danach wurden die Schnitte mit Corbit-Balsam eingedeckt.

Material:

<i>Xylol</i>	<i>J.T.Baker, Deventer, NL</i>
<i>Ethanol</i>	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
<i>Aqua dest (Aqua ad iniectabilia)</i>	<i>DeltaSelect GmbH, Dreieich</i>
<i>Hämalaunlösung sauer nach Mayer</i>	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
<i>Shandon Eosin-y</i>	<i>Thermo Scientific, Pittsburg, USA</i>
<i>Corbit-Balsam</i>	<i>Hecht, Kiel-Hassee</i>

2.4.2. Immunhistochemische Färbung

Bei dieser Spezialfärbung wurden mittels verschiedener Antikörper die Unterformen der Superoxiddismutase (SOD) markiert. Die SOD ist ein Enzym, welches für die Elimination von zytotoxisch aktivem Sauerstoff verantwortlich ist, indem es die Dismutation der Superoxidradikale (O_2^-) zu Sauerstoff (O_2) und Hydrogenperoxid (H_2O_2) katalysiert (Kinnula and Crapo 2003):



Zur Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte wurden diese zuerst 2 x 10 min in Xylol und anschließend je 3 min in 100 %, 96 %, 80 %, 70 % und 50 % Ethanol getaucht. Nach 30 s Spülen mit Aqua dest wurden die Schnitte 2 x 5 min bei 150 Watt und 2 x 5 min bei 400 Watt in 0,01 M Citratpuffer pH 6,0 zur Antigendemaskierung in der Mikrowelle gekocht. Nach 30 min Abkühlen bei Raumtemperatur wurden die Schnitte mit Aqua dest gespült und kamen für 5 min in 3 %iges Wasserstoffperoxid in absoluter Methanol-Lösung, um die gewebeeigene Peroxidaseaktivität zu neutralisieren, bevor sie wieder mit Aqua dest gespült wurden.

Die immunhistochemische Detektion erfolgte mit Hilfe des Histostain®-SP Kits nach Vorschrift des Herstellers. Das Gewebe wurde 3 x 2 min mit 1 x PBS gewaschen und 10 min mit Lösung 1A (Serum-Blocking-Solution) bedeckt. Anschließend wurden die Schnitte mit dem entsprechenden, mit LowCross-Puffer vorverdünnten Primärantikörper in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert. Als Positivkontrolle wurde β -Aktin (Anti-ACTB) und als Negativkontrolle LowCross-Puffer ohne

Antikörper verwendet. Am nächsten Tag wurden die Gewebeschnitte 3 x 2 min mit 1 x PBS gewaschen und 10 min mit Lösung 1B (biotinylierter Sekundärantikörper) inkubiert. Danach wurden sie erneut 3 x 2 min mit 1 x PBS gewaschen, 10 min mit Lösung 2 (Streptavidin-Peroxidase-Konjugat) inkubiert, erneut 3 x 2 min mit 1 x PBS gewaschen und je nach Farbtintensität 5-10 min mit AEC Chromogen (Substrat/Chromogen) inkubiert. Nach dem Spülen mit Aqua dest wurden die Präparate mit Lösung 4 (Hämatoxylin) gegengefärbt und unter fließendem Leitungswasser gebläut. Zum Schluss wurden die Präparate mit Aquatex eingedeckt.

Material:

<i>Xylol</i>	<i>J.T.Baker, Deventer, NL</i>
<i>Ethanol</i>	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
<i>Aqua dest (Aqua ad iniectabilia)</i>	<i>DeltaSelect GmbH, Dreieich</i>
<i>Tri-Natriumcitrat-2-hydrat-Puffer</i>	<i>Riedel-de Haën, Seelze</i>
<i>Salzsäure 1 M</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Wasserstoffperoxid (H₂O₂)</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Methanol</i>	<i>Fisher Scientific, Loughborough, Leicestershire, UK</i>
<i>Histostain®-SP Kit</i>	<i>Invitrogen Corporation, Camarillo, USA</i>
<i>PBS (10 x) without Ca & Mg</i>	<i>PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT</i>
<i>Anti-CuZnSOD (Ab2), Rabbit Polyclonal (1 µg/µl)</i>	<i>Biomol GmbH, Hamburg</i>
<i>Anti-MnSOD (Ab2), Rabbit Polyclonal (1 µg/µl)</i>	<i>Biomol GmbH, Hamburg</i>
<i>Anti-ACTB, Rabbit Polyclonal (1 µg/µl)</i>	<i>Abnova GmbH, Heidelberg</i>
<i>LowCross-Buffer</i>	<i>Candor Bioscience GmbH, Wangen</i>
<i>Aquatex</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>

Tabelle 3: Zur Immunhistochemie verwendete Primärantikörper sowie deren eingesetzten Konzentrationen

Antikörper (AK)	Konzentration
Anti-SOD 1 (CuZnSOD)	1:1500
Anti-SOD 2 (MnSOD)	2,5 µg/ml
Anti-ACTB (β-Aktin)	1:2500

2.5. Isolierung von Typ-II-Pneumozyten

Allgemeine Vorbereitungen für die Typ-II-Zellisolierung

- Medium I:** (DMEM/25mM HEPES)
500 ml DMEM
+ 1,75 g Glucose
+ 0,146 g L-Glutamin
12,5 ml des Mediums I wurden gegen die gleiche Menge HEPES 1 M ausgetauscht
- Medium II:** (DMEM/25mM HEPES + 10 % FCS
+ Gentamicin/Penicillin G)
Medium I
+ 50 ml FCS (sterilfiltriert)
+ 0,55 ml Gentamicin 10 mg/ml
+ 0,55 ml Penicillin G 100000 IE/ml
- Low melt Agarose 1 %:** 0,5 g Agarose wurden in 50 ml PBS 1 % gekocht und im Wasserbad bei 40°C bis zum Instillieren aufbewahrt.
- Dispase I-Lösung:** 5 mg (6 U/mg) Dispase wurden in 1 ml Aqua dest gelöst und 12 ml PBS 1 % ohne Ca²⁺/Mg²⁺ dazugegeben.
- DNase I-Lösung:** Pro Tier wurden 375 µg DNase in 1,5 ml des Mediums I gelöst.
- Je Antikörper-Platte:** 6 ml PBS 1 %
+ 84 µl anti-mouse CD45
+ 32 µl anti-mouse CD16/CD32
+ 1 Tropfen Tween 20
Alle Substanzen wurden auf den Antikörper-Platten verteilt und diese mindestens 18 h bei 4°C inkubiert.

Laut Herstellerangaben bindet der CD45-Antikörper CD45-Rezeptoren auf Zellen hämatopoetischen Ursprungs (außer Erythrozyten). Anti-Mouse CD16/CD32-Antikörper binden CD16/CD32-Rezeptoren, die auf murinen natürlichen Killerzellen, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und B-Zellen zu finden sind. Auf diese Weise sind die Antikörper in der Lage, unspezifische Bindungen zu blockieren und eine möglichst reine Typ-II-Zellisolierung zu ermöglichen (vgl. Produktinformation des Herstellers BD Biosciences, unter <http://www.bdbiosciences.com>, letzter Zugriff: 30.01.2012).

Operativer Teil

Die Typ-II-Zellisolierung erfolgte nach dem von Corti et al. beschriebenen Verfahren (Corti, Brody and Harrison 1996). Die Isolierung von Typ-II-Pneumozyten begann mit der Vollnarkotisierung der Versuchstiere. Dazu wurde den Versuchstieren 0,2 ml des Anästhetikums (pro Spritze: 0,2 ml Narcoren und 0,2 ml Liquemin mit NaCl auf 1 ml aufgefüllt) intraperitoneal appliziert. Die Dosis war dabei so gewählt, dass die Tiere bis zur endgültigen Organentnahme überlebten. Nach Einsetzen der Narkosewirkung wurden die Tiere auf der Operationsplatte fixiert. Es folgte eine mediane Laparotomie und eine Vasotomie einer Iliakalarterie, bei der den Tieren ca. 500 µl Blut entnommen wurde. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 3000 rpm wurde das zellfreie Blutplasma abgenommen und bei -20°C zur weiteren Analyse gelagert.

Während des Ausblutens wurde die Trachea freipräpariert und mittels einer Kanüle punktiert. Es folgte die Durchführung einer bronchoalveoläre Lavage (BAL) mit 1 ml gekühlter NaCl-Lösung. Die BAL-Flüssigkeit wurde auf Eis zwischengelagert. Anschließend wurde von abdominal ein Zwerchfellschnitt gesetzt, sodass beide Lungenflügel kollabierten und ohne Verletzung des Lungengewebes eine mediane Thorakotomie erfolgen konnte. Als nächstes wurde der rechte Ventrikel eröffnet und die Lunge mit 0,9 %iger NaCl-Lösung über den Truncus pulmonalis weiß gespült. Während des Spülens wurde die Lunge unter Zuhilfenahme einer 10 ml Spritze mehrmals bis zur vollen Entfaltung belüftet. Im Anschluss wurden 2 ml Dispase und 0,45 ml 0,1 %ige Low melt Agarose instilliert. Die Tiere wurde sofort zum Aushärten der Agarose für 2 min mit Eis bedeckt. Zum Schluss wurden die Lunge freipräpariert und in 2 ml Dispase für 45 min bei Raumtemperatur angedaut.

Typ-II-Zellisolierung

Die Lunge wurde von Herz und umgebendem Gewebe befreit, in ein Röhrchen mit 250 µg/ml DNase + 1,5 ml Medium I gegeben, 10 min mit einer Schere zerschnitten und 5 min geschüttelt. Im Anschluss wurde das Homogenat durch Mull und Nylon-Gaze (doppellagiger Mull, 150 µm, 20 µm) filtriert. Nach dem Spülen mit 7 ml Medium I kamen die Zellen auf Eis. Als nächstes wurden die Antikörper-Platten 2 x mit Medium I gewaschen und die Lungensuspension in der Zwischenzeit 10 min bei 900 rpm und 4°C zentrifugiert. Danach wurde das Zell-Pellet pro Maus in 10 ml Medium II aufgenommen, auf jeweils eine Antikörper-Platte gegeben und 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der 2 Stunden wurden 50 µl des Platteninhalts in 250 µl Farbstoff Trypanblau aufgenommen und die gefärbte Suspension mikroskopisch bei 1000facher Vergrößerung in einer Neubauer-Kammer ausgezählt.

Die Zellzahl wurde wie folgt berechnet:

$$X \times 10 \times 5 \times 10^4$$

X	=	Gemittelte Zellzahl der 4 Eckquadrate der Zählkammer
10	=	Gesamtvolumen nach Aufnahme der Zellen in 10 ml Medium II
5	=	Verdünnung mit Trypanblau
10 ⁴	=	Erhalt der µl-Angabe

Die restliche Lungensuspension wurde 10 min bei 900 rpm und 4°C zentrifugiert. Davon wurden jeweils 1 x 10⁷ Zellen in 1 ml Trizol aufgenommen und bei -80°C zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Material:

<i>DMEM (Low Glucose without L-Glutamine)</i>	<i>PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT</i>
<i>Glucose</i>	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
<i>L-Glutamine</i>	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
<i>HEPES Buffer Solution (1 M)</i>	<i>PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT</i>
<i>FCS (sterilfiltriert/hitzeinaktiviert)</i>	<i>PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT</i>
<i>Gentamicin 10 mg/ml</i>	<i>PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT</i>
<i>Penicillin/Streptomycin (100 x)</i>	<i>PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT</i>
<i>Low melt Agarose</i>	<i>FMC Bioproducts, Rockland, Maine USA</i>
<i>PBS-Dulbecco (10 %)</i>	<i>PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT</i>

<i>Dispase® I (neutral protease, grade I)</i>	<i>Roche Diagnostics GmbH, Mannheim</i>
<i>Aqua dest (Aqua ad iniectabilia)</i>	<i>DeltaSelect GmbH, Dreieich</i>
<i>DNase I</i>	<i>Roche Diagnostics GmbH, Mannheim</i>
<i>Rat Anti-Mouse CD45 (0,5 mg/ml)</i>	<i>BD Biosciences, San Jose, USA</i>
<i>Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (0,5 mg/ml)</i>	<i>BD Biosciences, San Jose, USA</i>
<i>Tween 20</i>	<i>Merck-Schuchardt, Hohenbrunn</i>
<i>Narcofen® (Pentobarbital-Natrium)</i>	<i>Merial GmbH, Hallbergmoos</i>
<i>Liquemin® (Heparin-Natrium)</i>	<i>Roche Pharma AG, Grenzach</i>
<i>Isotone Kochsalzlösung 0,9 % (NaCl)</i>	<i>Braun Melsungen AG, Melsungen Mull</i>
<i>Nylon-Gaze</i>	<i>Sefra AG, Heiden, CH</i>
<i>Trypanblau</i>	<i>Gibco™, Invitrogen Corporation, New York, USA</i>
<i>Neubauer-Zählkammer</i>	<i>Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen</i>
<i>Trizol®</i>	<i>Invitrogen, Carlsbad, USA</i>

2.6. Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Die BAL wurde im Rahmen der Typ-II-Zellisolierung durchgeführt. Nach Punction der Trachea mit einer Kanüle wurde 1 ml gekühlte NaCl-Lösung injiziert und im gleichen Zuge wieder aspiriert. Dabei konnten ca. 0,8 ml BAL-Flüssigkeit (BALF) pro Maus zurückgewonnen werden. Die BALF-Proben wurden auf Eis zwischengelagert. Anschließend wurden die Proben 10 min zentrifugiert (900 rpm, 4°C), der Überstand abpipettiert und bei -20°C zur weiteren Analyse gelagert.

2.6.1. Untersuchung der BAL-Zytologie

Mit dem Zell-Pellet wurde ein Zytospin durchgeführt. Dazu wurde dieses in 500 µl NaCl gelöst, 15 min bei 500 rpm über eine Filterkarte auf einen Objektträger zentrifugiert und an der Luft getrocknet. Für die Zählung von Makrophagen, Lymphozyten, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten wurden die Zellen zur besseren Unterscheidung nach Pappenheim gefärbt. Die Zählung erfolgte mikroskopisch nach morphologischen Kriterien an je fünf Bildausschnitten bei 200facher Vergrößerung.

2.6.2. Pappenheim-Färbung

Mit dieser Differentialfärbung wurden die luftgetrockneten BAL-Zytologie-Präparate mit einer Kombination der Färbungen nach May-Grünwald und Giemsa behandelt. Diese Lösungen enthalten unter anderem Stabilisatoren (Glycerin), Fixiermittel (Methanol) sowie saure und basische Farbstoffe. Basophile Granula erscheinen im lichtmikroskopischen Bild durch Anfärben mit Methylenblau tiefblau bis violett, während saure Granula durch Eosin eine leuchtend rote Farbe annehmen. Neutrale Granula weisen einen hellroten bis purpurroten Farbton auf.

Die Zytospin-Präparate wurden nacheinander in folgende Lösungen getaucht:

- 5 min in unverdünnte May-Grünwald-Lösung
- Kurz in Aqua dest
- 15 min in 200 ml Giemsa-Lösung
(8 ml Giemsa wurden mit Aqua dest auf 200 ml aufgefüllt)
- Kurz in Aqua dest

Anschließend erfolgte die Eindeckung mit Corbit-Balsam.

Material:

<i>May-Grünwald-Lösung</i> <i>(May-Grünwald Eosin-Methylenblaulösung modifiziert)</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Aqua dest (Aqua ad iniectabilia)</i>	<i>DeltaSelect GmbH, Dreieich</i>
<i>Giemsa-Lösung</i> <i>(Azur-Eosin-Methylenblaulösung)</i>	<i>Acros Organics, New Jersey, USA</i>
<i>Corbit-Balsam</i>	<i>Hecht, Kiel-Hassee</i>

2.6.3. Bestimmung des BAL-Gesamtproteins

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der BCA-Methode unter Verwendung des BCA™ Protein Assay Kits. Als Probe diente der zellfreie Lavage-Überstand des BALF.

Zu Beginn des Versuchs wurde der Standard nach folgendem Schema angesetzt:

BSA (Ampulle)	(Verdünnungslösung Aqua dest)	BSA Konzentration
1000 µl (Stock)	0 µl	2000 µg/ml
A 375 µl (Stock)	125 µl	1500 µg/ml
B 325 µl (Stock)	325 µl	1000 µg/ml
C 175 µl A	175 µl	750 µg/ml
D 325 µl B	325 µl	500 µg/ml
E 325 µl D	325 µl	250 µg/ml
F 325 µl E	325 µl	125 µg/ml
G 100 µl F	400 µl	25 µg/ml

Daraufhin wurden zum Ansetzen des BCA Working Reagenz 50 Teile BCA Reagenz A und 1 Teil BCA Reagenz B gemischt. Zur Proteinbestimmung wurden pro Mikrotiterwell 10 µl Standard bzw. 10 µl Probe bzw. 10 µl Working Reagenz als Leerwert pipettiert. Anschließend wurden pro Well jeweils 200 µl Working Reagenz dazugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde 30 s geschüttelt, abgedeckt und kam für 30 min bei 37°C zur Inkubation in den Brutschrank. Nach dem Abkühlen der Titerplatte wurde die Absorption im Photometer bei 562 nm gemessen. Alle Versuche erfolgten in Doppelbestimmung.

Material:

BCA™ Protein Assay Kit

Thermoscientific, Rockford, USA

Aqua dest (Aqua ad iniectabilia)

DeltaSelect GmbH, Dreieich

2.6.4. Bestimmung des BAL-Gesamtphospholipids

Die Bestimmung des Phospholipidgehaltes der BAL erfolgte nach der Methode von Bartlett (Bartlett 1959) und basierte auf der Herstellung von anorganischem Phosphat, welches durch eine Farbreaktion photometrisch quantifiziert werden konnte. Zu Beginn des Versuchs wurden die Phospholipide der BAL-Proben mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Dazu wurden 100 µl der jeweiligen Proben mit 2 ml TCA in einem Reagenzglas gemischt und 10 min an der Luft inkubiert. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 3200 rpm und 4°C zentrifugiert und die Überstände vorsichtig abgeschüttet. Zur Herstellung des Standards wurden 5 mg Phosphat in 100 ml Aqua dest gelöst und in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Der Leerwert bestand aus 100 µl Aqua dest.

Versuchsanordnung in Reagenzgläsern:

Leerwert 1

Leerwert 2

Std 1 µg → 20 µl von 5,0 mg/dl

Std 1 µg → 20 µl

Std 2,5 µg → 50 µl von 5,0 mg/dl

Std 2,5 µg → 50 µl

Std 5 µg → 100 µl von 5,0 mg/dl

Std 5 µg → 100 µl

Std 10 µg → 200 µl von 5,0 mg/dl

Std 10 µg → 200 µl

Proben

Alle Reagenzgläser erhielten jeweils 0,5 ml Perchlorsäure und 0,2 ml H₂O₂ (30 %), welche die gefällten Phospholipide zum Phosphat oxidierten. Danach kamen alle Reagenzgläser für 45 min in den Heizblock. Nach dem Abkühlen wurde in alle Reagenzgläser nacheinander jeweils 4 ml Aqua dest, 0,5 ml Molybdad (30,8965 g Molybdad/l Schwefelsäure 2,5 M) und 0,2 ml Reducer (4,76 g Reducer + 30 ml Aqua

dest) hinzugegeben. Das Phosphat bildete in saurer Lösung mit Molybdat und schwefelhaltigem Reducer einen blauen Farbkomplex. Die Proben inkubierten anschließend noch einmal 15 min bei 100°C im Heizblock, bevor die Extinktion in Acrylküvetten photometrisch bei 820 nm gemessen wurde.

Bestimmt wurde Phosphat, welches 1/25stel des Phospholipidmoleküls ausmacht. So wurde das Messergebnis am Schluss mit 25 multipliziert. Als Referenzsubstanz wurde Seronorm™ Lipid verwendet, ein gefriergetrocknetes Kontrollserum mit Sollwerten für die Präzisions- und Richtigkeitskontrolle, welches wie die BAL-Proben behandelt wurde.

Material:

<i>Trichloressigsäure</i>	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
<i>Seronorm™Lipid</i>	<i>Sero, Billingstad, Norwegen</i>
<i>Phosphat (di-Natriumhydrogenphosphat)</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Aqua dest (Aqua ad iniectabilia)</i>	<i>DeltaSelect GmbH Dreieich</i>
<i>Perchlorsäure (70 %)</i>	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
<i>Wasserstoffperoxid (H₂O₂) (30 %)</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Molybdat (Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat, 2,5 %)</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Schwefelsäure 2,5 M</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Reducer</i>	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>

2.7. Bestimmung der Gesamt-SOD-Aktivität im Plasma

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxide (O_2^-) und Hydrogenperoxide (H_2O_2) werden während metabolischer Prozesse von allen Lebewesen generiert. Unter physiologischen Umständen steht die zelluläre ROS-Produktion mit der Aktivität antioxidativer Enzyme im Gleichgewicht. Hingegen verursacht eine ROS-Akkumulation zelluläre Schäden an DNA, Proteinen und Lipidmembranen (Comhair and Erzurum 2002). Wegen dieser schädlichen Effekte werden ROS schnell durch eine Vielzahl an antioxidativen Abwehrmechanismen eliminiert. In diesem Zusammenhang gehört die Superoxiddismutase, die die Dismutation von Superoxidanion (O_2^-) in Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff katalysiert, zu den wichtigsten antioxidativen Enzymen.

Die Bestimmung der SOD-Aktivität erfolgte mit Hilfe des OxiSelect™ Superoxide Dismutase Activity Assay Kits nach Vorschrift des Herstellers. Der Kit verwendet ein Xanthine/Xanthineoxidase System, um Superoxidanionen zu produzieren. Ein beigefügtes Chromagen bildet auf die Reduktion der Superoxidanionen eine wasserlösliche Formazanfärbung. Demnach kann die Inhibierungsaktivität der SOD kalorimetrisch gemessen werden. Je höher die SOD-Aktivität, desto weniger Formazan wird gebildet und desto niedriger ist die gemessene Absorption.

Vorbereitung der Reagenzien:

- 1 x SOD Assay Buffer: 1.5 ml des 10 x SOD Assay Buffer wurden mit 13.5 ml Aqua dest verdünnt
- 1 x Xanthine Oxidase Solution: Kurz vor Gebrauch wurden 50 μ l Xanthinoxidaselösung mit 7500 ml 1 x SOD Assay Buffer verdünnt.
- Master-Mix: Mischung aus 550 μ l Xanthine Solution, 550 μ l Chromagen Solution, 1100 μ l 10 x SOD Assay und 6600 μ l Aqua dest

Herstellung der Standard-Reihe:

- | | |
|--------------------------------------|----------------|
| 1. 40 µl SOD-Konzentrat | → 5 U/µl |
| 2. 8 µl von 1. + 32 µl Assay Buffer | → 1.25 U/µl |
| 3. 8 µl von 2. + 32 µl Assay Buffer | → 0.31 U/µl |
| 4. 8 µl von 3. + 32 µl Assay Buffer | → 0.0781 U/µl |
| 5. 8 µl von 4. + 32 µl Assay Buffer | → 0.0195 U/µl |
| 6. 8 µl von 5. + 32 µl Assay Buffer | → 0.00498 U/µl |
| 7. 8 µl von 6. + 32 µl Assay Buffer | → 0.00122 U/µl |
| 8. 15 µl von 7. + 15 µl Assay Buffer | → 0.00061 U/µl |

Pipettierschema:

Je Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden 10 µl des Standards, 10 µl 1 x Assay Buffer Blank und 10 µl der aufgetauten und gut gemischten eigenen Proben (Plasma) pipettiert. Beigefügt wurden je Well 80 µl des Master Mix und 10 µl der 1 x Xanthinoxidaselösung. Nach einstündiger Inkubation bei 37° konnte die Absorption bei 490 nm photometrisch bestimmt werden. Alle Messungen erfolgten in Doppelbestimmung. Die SOD Aktivität (Inhibierungsrate in %) ließ sich anhand folgender Formel berechnen:

$$\text{SOD Aktivität} = (\text{OD}_{\text{blank}} - \text{OD}_{\text{sample}}) / (\text{OD}_{\text{blank}}) \times 100$$

Material:

OxiSelect™ Superoxide Dismutase Activity Assay Kit Cell Biolabs, INC., San Diego, USA
Aqua dest (Aqua ad iniectabilia) DeltaSelect GmbH, Dreieich

2.8. Extrahierung von RNA und Proteinen aus Typ-II-Pneumozyten

Das Verfahren der Gesamt-RNA-Isolierung basierte auf der *single-step* RNA-Isolationsmethode nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi 2006) unter zusätzlicher Verwendung von Trizol® Reagenz (Firma Invitrogen). Bei diesem Reagenz handelt es sich um ein monophasisches Phenol-Guanidinisothiocyanat-Gemisch, welches die Zellen spaltet und Zellbestandteile löst, ohne die Integrität der RNA zu stören. Nach dem Auftauen der bei -80°C tiefgefrorenen Trizolproben und 5minütiger Inkubation bei 15°C-30°C wurden zur Phasenseparation 0,2 ml Chloroform/ml Trizolprobe hinzupipettiert. Nach gutem Durchmischen und 3minütigem Inkubieren bei 15°C-30°C erfolgte die Zentrifugation mit 11000 rpm für 15 min bei 2°C-8°C. Die dabei entstandene Wasserphase wurde in frische Tubes überführt und zur RNA-Isolierung direkt weiter verarbeitet. Die organische Phase wurde bis zur DNA- oder Proteinisolierung im Kühlschrank zwischengelagert. Zum Präzipitieren der RNA wurden der Wasserphase 0,5 ml Isopropanol/ml Trizol hinzugefügt. Nach Durchmischung und Inkubation für 10 min bei 15°C-30°C erfolgte die erneute Zentrifugation bei 11000 rpm für 15 min bei 2°C-8°C. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Pellets mit 1 ml 75 %igem Ethanol/ml Trizol gewaschen, durchmischt und mit 9000 rpm für 5 min bei 2°C-8°C zentrifugiert. Danach wurde die RNA luftgetrocknet, in 30 µl Aqua dest aufgenommen, 10 min bei 55°C inkubiert und bei -80°C tiefgefroren. Die Bestimmung der RNA-Konzentration und des Reinheitsgrades des Probenmaterials erfolgte im NanoDrop Spectrophotometer.

Zur Protein-Isolierung wurde die bei der RNA-Isolierung entstandene organische Phase verwendet. Zur DNA-Präzipitation wurden 0,3 ml 100%iges Ethanol/ml Trizol hinzugefügt, durchmischt, für 3 min bei 15°C-30°C inkubiert und mit 4600 rpm für 5 min bei 2°C-8°C zentrifugiert. Danach konnte der proteinhaltige Phenol-Ethanol-Überstand vom DNA-Pellet getrennt und weiter verarbeitet werden. Zur Protein-Präzipitation wurden 1,5 ml Isopropanol/ml Trizol gemischt, 10 min bei 15°C-30°C inkubiert und mit 11000 rpm für 10 min bei 2°C-8°C zentrifugiert. Danach wurde das Proteinpellet 3 x mit einer Lösung aus 0,3 M Guanidinhydrochlorid in 95 % Ethanol gewaschen. Dazu wurden 2 ml Waschlösung/ml Trizol verwendet, das Ganze durchmischt, 20 min bei 15°C-30°C inkubiert und mit 9000 rpm für 5 min bei 2°C-8°C

zentrifugiert. Nach dem letzten Waschgang wurde das Proteinpellet in 2 ml 100 % Ethanol/ml Trizol aufgenommen und wie zuvor durchmischt, 20 min bei 15°C-30°C inkubiert und mit 9000 rpm für 5 min bei 2°C-8°C zentrifugiert. Zum Auflösen des Proteinpellets wurde dieses nach 5-10minütigem Lufttrocknen in 100 µl 1 % SDS/ml Trizol, dem ein Proteaseinhibitor hinzugesetzt wurde, gelöst und für 10 min bei 50°C inkubiert. Da das Protein schwer löslich war wurden vor der Inkubation ca. 4 µl 1 M NaOH den 100 µl Probe hinzugefügt. Die Proben wurden bei -20°C gelagert, bevor sie für Western Blots weiter verwendet wurden. Die Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration erfolgte nach der BCA-Methode unter Verwendung des BCA™ Protein Assay Kits.

Material:

<i>Chloroform</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>2-Propanol</i>	<i>Riedel de Haën, Seelze</i>
<i>Ethanol</i>	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
<i>Aqua dest (Aqua ad iniectabilia)</i>	<i>DeltaSelect GmbH, Dreieich</i>
<i>Guanidinhydrochlorid</i>	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
<i>SDS (Dodecylsulfat Na-Salz)</i>	<i>Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg</i>
<i>Proteaseinhibitor</i>	<i>Roche, Mannheim</i>
<i>NaOH 1 M</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>NanoDrop 1000 Spectrophotometer</i>	<i>peQlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen</i>
<i>BCA™ Protein Assay Kit</i>	<i>Thermoscientific, Rockford, USA</i>

2.9. Real-time Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (Real-time RT-PCR)

Um die Genexpression eines spezifischen Gens in Zellen nachzuweisen, muss die abgelesene RNA untersucht werden. Die reverse Transkriptase (RT) ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, mit deren Hilfe RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben wird. Die cDNA dient im Anschluss als Ausgangsmaterial für die PCR, mit deren Hilfe spezifische cDNA-Sequenzen amplifiziert werden.

2.9.1. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese der RNA aus Typ-II-Pneumozyten erfolgte mit Hilfe des QantiTect® Reverse Transcriptase Kits und wurde nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

Im ersten Schritt wurden mögliche DNA-Reste in den Proben entfernt. Die Reaktionsansätze erfolgten nach folgendem Pipettierschema auf Eis:

Reagenzien	$\leq 1 \mu\text{g RNA}$
7x gDNA Wipeout Puffer	2 μl
aufgereinigte RNA	x μl
RNase freies Wasser	y μl
Gesamtvolumen	14 μl

Die eingesetzte Menge an aufgereinigter RNA wurde aus dem im NanoDrop Spectrophotometer ermittelten Gesamt-RNA-Gehalt der Probe berechnet.

(Beispielrechnung: Eine Probe enthält 0,4661 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNA. Um 1 μg RNA einzusetzen werden 2,1 μl Probe benötigt).

Daraufhin erfolgte eine 2minütige Inkubation im Heizblock bei 42°C.

Die Reaktionsansätze für die Reverse Transkription erfolgten nach folgendem Pipettierschema ebenfalls auf Eis:

Reagenzien	≤ 1 µg RNA
Aufgereinigte, DNA freie RNA	14 µl
RT-Puffer	4 µl
RT Primer Mix	1 µl
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Zur Inaktivierung der reversen Transkriptase kamen die Proben für 15 min bei 42°C und für 3 min bei 95°C in den Heizblock und wurden anschließend bei -20°C gelagert.

Material:

QantiTect® Reverse Transcriptase Kit:

Qiagen GmbH, Hilden

2.9.2. cDNA-Amplifikation mittels Real-time RT-PCR

Mithilfe der Real-time RT-PCR wurden Expressionsprofile der Superoxiddismutasen (SODs), Cholinkinasen (CKs) und CTP: Phosphocholin Cytidylyltransferase alpha (CCT alpha) auf mRNA-Ebene ermittelt.

Die Reaktionsansätze zur Durchführung der PCR wurden nach folgendem Schema im Kälteblock angefertigt (10 µl pro Tube):

- 4 µl RNase freies Wasser
- 4,5 µl Syber Green
- 0,5 µl Primer pur (Qiagen) bzw. 2 x 0,25 µl Primer 1 : 5 Verdünnung (Eurofins)
- + 1,0 µl cDNA-Probe

Anschließend erfolgte die Amplifikation des entsprechenden cDNA-Abschnittes im PCR-Gerät Rotor-Gene Q.

Einstellungen eines Amplifikations-Zyklus:

Denaturierungstemperatur:	94°C	40 s
Annealing-Temperatur:	55°C	40 s
Extensionstemperatur:	72°C	40 s
Zyklenzahl:	35 Wiederholungen	

Die Auswertung erfolgte anhand der relativen Quantifizierung, bei der die Expression des Zielgens mit der des Housekeeping Gens (HKG) L32 normalisiert wurde. Diese Normalisierung diente der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte sowie unterschiedliche RNA-Extraktionskoeffizienten das Zielgen und das HKG gleichermaßen betreffen (Pfaffl 2004). Die Ermittlung des Expressionsunterschieds erfolgte schließlich über die $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode nach folgendem Berechnungsschema:

$$\Delta\text{CT} = \text{CT Zielgen} - \text{CT Referenzgen (HKG L32)}$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT Behandlung} - \Delta\text{CT Kontrolle (PBS/nOVA)}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

Der CT- (Cycle Threshold) Wert ist eine theoretische Größe, die den Anfang der Phase des exponentiellen Wachstums einer Kurve beschreibt. Er stellt den PCR-Zyklus dar, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Der $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ -Wert der PBS/nOVA Tiere wurde in jeder durchgeführten RT-PCR gleich 100 % gesetzt und als Flächenwert \pm SEM graphisch aufgetragen. Die $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ -Werte der anderen Behandlungsgruppen wurden anhand der PBS/nOVA-Referenzwerte prozentual entsprechend umgerechnet und ebenfalls als Flächenmittelwert \pm SEM graphisch veranschaulicht. Als Negativkontrollen wurden cDNA-Ansätze ohne Zugabe der reversen Transkriptase hergestellt und parallel in der PCR analysiert. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass die Amplifikate durch Kontamination mit genomischer DNA entstanden sind. Alle Ansätze erfolgten in Doppelbestimmung.

Material:

<i>RNase freies Wasser</i>	<i>Qiagen GmbH, Hilden</i>
<i>Syber Green PCR KIT</i>	<i>Qiagen GmbH, Hilden</i>
<i>Real-time RT-PCR-Gerät Rotor-Gene Q</i>	<i>Qiagen GmbH, Hilden</i>
<i>Primer von Eurofins:</i>	<i>Eurofins MWG Operon, Ebersberg</i>
<i>Kupfer-Zink-SOD</i>	
- <i>CuZnSOD mus for:</i>	5'-CCGTACAATGGTGGTCCATGAG-3'
- <i>CuZnSOD mus rev:</i>	5'-GCAATCCCAATCACTCCACAGG-3'
<i>Extrazelluläre SOD</i>	
- <i>ESOD mus for:</i>	5'-TCAGCCATGTTGGCCTTCTTG-3'
- <i>ESOD mus rev:</i>	5'-CGTGTCGCCTATCTTCTCAACC-3'
<i>Cholinkinase alpha</i>	
- <i>CK alpha for:</i>	5'-CAGCAACTGCACAAGATCC-3'
- <i>CK alpha rev:</i>	5'-ATAAGCATCAGCTTCCGCC-3'
<i>Cholinkinase beta</i>	
- <i>CK beta for:</i>	5'AACCTGCTCTTCCGATGCTCAC-3'
- <i>CK beta rev:</i>	5'-TGCGAGAATGGCGAACATCAC-3'
<i>CTP: Phosphocholin Cytidylyltransferase alpha</i>	
- <i>CCT alpha for:</i>	5'-GAGCCTAACTTTTCTTACTCCC-3'
- <i>CCT alpha rev;</i>	5'-CCACTCCTCTCTCCAATCAC-3'
<i>QuantiTect®Primer Assay:</i>	<i>Qiagen GmbH, Hilden</i>
<i>Mangan-SOD (MnSOD)</i>	<i>QuantiTect® Primer Assay</i>
	<i>Assay name: Mm_Sod2_1-SG</i>
	<i>Cat. No.: QT00161707</i>
<i>Ribosomales Protein L32 (RpL32)</i>	<i>QuantiTect®Primer Assay</i>
	<i>Assay name: Mm_RpL32_2_SG</i>
	<i>Cat. No.: QT01752387</i>

2.10. Western Blot

2.10.1. Herstellung von SDS–Polyacrylamid Gelen

Zu Beginn der Gelherstellung wurden folgende Lösungen angesetzt:

Solution 1: Rotiphorese 30

		100 ml:	200 ml:
Solution 2:	1,5 M Tris-Base	18,7 g	37,4 g
(pH 8,8)	8 mM EDTA	0,3 g	0,6 g
	0,4 % SDS	0,4 g	0,8 g
Solution 3:	0,5 M Tris-HCL	6,2 g	12,4 g
(pH 6,8)	8 mM EDTA	0,3 g	0,6 g
	0,4 % SDS	0,4 g	0,8 g

Die Lösungen wurden auf einer Rührplatte in wenig Aqua dest gelöst und mit HCL bzw. NaOH auf den gewünschten pH-Wert titriert. **12 %**

Trenngel:	Sol. 1	9 ml (Mengen pro Gel)
	Sol. 2	5,6 ml
	Aqua dest	7,9 ml
	APS (10 %)	150 µl
	TEMED	15 µl

Sammelgel:	Sol. 1	1,2 ml (Menge für 1-2 Gele)
	Sol. 3	2,0 ml
	Aqua dest	3,4 ml
	APS	50 µl
	TEMED	10 µl

Zur Herstellung der Gelplatten wurden jeweils zwei Glasplatten (10 x 10 cm) mit Ethanol 70 % gereinigt, mit Spacern (1 mm) voneinander getrennt und zur Abdichtung in eng anliegende Plastiktütchen gesteckt. Zum Gießen der Gele wurden die

zusammengebauten Gelplatten in eine Gelkammer eingeklemmt. Zuerst wurde das feinporige Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen (ca. 6,5 ml pro Gel) und mit jeweils 1 ml Isopropanol überschichtet. Die Aufgabe des Isopropanols bestand darin, die Gelgrenzen zu glätten und den Kontakt des Gels mit Sauerstoff zu verhindern, da dieser die zur Polymerisation notwendigen Radikale abfangen würde. Es folgte eine radikalische Polymerisation über 30 min, bei der Monomere mit Hilfe von Radikalen unter Auflösung von Mehrfachbindungen zu Polymeren reagierten. Dabei dienten die Gelsubstanzen APS und TEMED als Radikalstarter und Polymerisationskatalysatoren. Nach Abgießen des Alkohols wurde das grobporige Sammelgel hergestellt und über das Trenngel pipettiert (ca. 2,5 ml pro Gel). Das Einstecken von Kämmen schaffte Taschen zum Einfüllen der Probe. Nach erneuter Polymerisation über 30 min konnten die Gele entweder über Nacht feucht im Kühlschrank gelagert oder direkt weiter für den Western Blot verwendet werden.

Material:

<i>Rotiphorese 30 (30 % Acrylamid, 0,8 % Bis-Acrylamid)</i>	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
<i>Tris Base (Tris(hydroxymethyl)-methylamin)</i>	<i>ACROS Organics, New Jersey, USA</i>
<i>EDTA (Ethylenediaminetetraacetat)</i>	<i>Sigma Chemical Co, St. Louis, USA</i>
<i>SDS (Dodecylsulfat Na-Salz)</i>	<i>Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg</i>
<i>Tris-HCL (Tris-hydrochlorid)</i>	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
<i>Ethanol</i>	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
<i>Aqua dest (Aqua ad iniectabilia)</i>	<i>DeltaSelect GmbH, Dreieich</i>
<i>Salzsäure (1 M)</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Natronlauge (1 M)</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>APS 10 % (Ammoniumperoxodisulfat)</i>	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
<i>TEMED (Tetramethylethyldiamin)</i>	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
<i>Isopropylalkohol (2-Propanol)</i>	<i>Riedel de Haën, Seelze</i>
<i>Gelkammer (Vertical Dual-Gel System)</i>	<i>Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH, Heidelberg</i>

2.10.2. Vorbereitung der Proben und Elektrophorese

Der Western Blot ist ein Verfahren zum Nachweis von spezifischen Proteinen in einem Proteingemisch mit Hilfe markierender Antikörper. Mittels der Gelelektrophorese werden die Proteine auf einem Polyacrylamidgel nach ihrer Größe in einzelne

Proteinbanden aufgetrennt. Anschließend werden die getrennten Proteinbanden mittels eines senkrecht zum Gel gerichteten elektrischen Feldes auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, wo sie mit spezifischen Antikörpern detektiert werden können.

Zu Beginn des Versuchs wurden folgende Lösungen hergestellt:

Dissoziationspuffer: 30 mM Tris-HCL (pH 7,4)
15 % Glyzerin
3 % SDS
0,04 % Bromphenolblau
15 % Mercaptoethanol

Elektrophoresepuffer: 75 g Glyzin
(pH 8,6) 25 g TRIS-Base
7,5 g SDS
Ad 5 l Aqua dest

Zur Vorbereitung der Proben wurden je Probe 15 µg Protein eingesetzt und mit 1 % SDS sowie mit Dissoziationspuffer (DP) auf ein Gesamtvolumen von 20 µl pro Geltasche aufgefüllt. (Gemäß des Schemas (Probe + 1 % SDS) : DP = 1 : 1). Der Gesamtproteingehalt der Probe wurde bereits im Rahmen der Proteinisolierung aus Typ-II-Pneumozyten mittels BCA™ Protein Assay Kit ermittelt. (Beispielrechnung: Eine Probe enthielt 4,55 µg/µl Protein. Um 15 µg Protein einzusetzen wurden 3,3 µl Probe benötigt. Um ein Gesamtvolumen von 20 µl zu erhalten wurden 3,3 µl Probe + 6,7 µl 1 % SDS + 10 µl DP gemischt.) Das Proteingemisch wurde anschließend für 3 min bei 95°C im Wärmeblock erhitzt und auf Eis abgekühlt. Zum Durchführen der Elektrophorese wurden die vorbereiteten Glasplatten aus den Tütchen genommen, in die Elektrophoresekammer eingespannt und mit etwas Elektrophoresepuffer auf Dichtigkeit geprüft. Danach wurden 20 µl Probengemisch und 5 µl Marker in die Taschen des Sammelgels aufgetragen, die Glasplatten wie auch die Elektrophoresekammern mit viel Elektrophoresepuffer gefüllt und die Elektrophorese gestartet:

Sammelgel 25 mA für ca. 30 min pro Gel

Trenngel 25 mA für ca. 45 min pro Gel

Nach Beenden der Elektrophorese wurde der Puffer von den Gelen abgossen, die Glaskammern vorsichtig geöffnet und die Trenngele für den folgenden Western Blot zugeschnitten.

Material:

<i>Tris-HCL (Tris-hydrochlorid)</i>	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
<i>Glycerin</i>	<i>ACROS Organics, New Jersey, USA</i>
<i>SDS (Dodecylsulfat Na-Salz)</i>	<i>Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg</i>
<i>Bromphenolblau</i>	<i>Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg</i>
<i>2-Mercaptoethanol</i>	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
<i>Glyzin</i>	<i>Riedel de Haën, Seelze</i>
<i>Tris Base (Tris(hydroxymethyl)-methylamin)</i>	<i>ACROS Organics, New Jersey, USA</i>
<i>Aqua dest (Aqua ad iniectabilia)</i>	<i>DeltaSelect GmbH, Dreieich</i>
<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</i>	<i>Fermentas GmbH, St. Leon-Rot</i>

2.10.3. Western-Blot

Zu Beginn des Blots wurden folgende Lösungen hergestellt:

Blotpuffer A (2 l): 50 mM Borsäure (6,2 g) mit NaOH auf pH 9 eingestellt
20 % Methanol (400 ml)

Blotpuffer B (2 l): 50 mM Borsäure (6,2 g) mit NaOH auf pH 9 eingestellt
5 % Methanol (100 ml)

Färbelösung:

Coomassie-Blue	1 g
Methanol	400 ml
Eisessig	100 ml
Aqua dest	500 ml

Entfärber:

Eisessig	100 ml
Methanol	300 ml
Aqua dest	600 ml

Zur Blot-Vorbereitung wurden je 5 Filterpapiere pro Gel in Puffer A bzw. Puffer B eingeweicht. Die zugeschnittene Membran wurde kurz in Methanol geschwenkt und dann 15 min in Puffer A inkubiert.

Blotaufbau: Anode (+)
20 % Blotpuffer A (5 Filter)
Membran
Gel
5 % Blotpuffer B (5 Filter)
Kathode (-)

Das Blotten von 4 Gelen à 8 x 10 cm erfolgte bei 260 mA über 1 Stunde (ca. 0,8 mA/cm²). Nach Beenden des Blottes wurde der Marker von der geblotteten Membran abgeschnitten und die Membranen über Nacht in Blocking Solution (zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen) im Kühlschrank gelagert.

Die Polyacrylamidgele wurden 10 min in der Färbelösung geschwenkt. Anschließend folgte die Entfärbung auf dem Schüttler unter mehrfachem Wechsel des Entfärbers über 10 Stunden.

Material:

<i>Borsäure</i>	<i>Fisher Scientific, Loughborough, Leicestershire, UK</i>
<i>Filterpapier (Electrode Paper)</i>	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden</i>
<i>Membran (Immobilon-p Transfer Membranes)</i>	<i>Millipore Corporation, Bedford, USA</i>
<i>Blocking Solution</i>	<i>Candor Bioscience GmbH, Wangen</i>
<i>Coomassie Brilliant Blue</i>	<i>Serva Feinbiochemica, Heidelberg</i>
<i>Methanol</i>	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
<i>Eisessig</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
<i>Hofer TE77XP Semi-Dry Transfer Unit</i>	<i>SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg</i>

2.10.4. Antikörper–Detektion

Der 1. Antikörper (AK) wurde mit LowCross-Buffer verdünnt. Dazu wurden 6,2 µl Anti-MnSOD-AK bzw. 10 µl Anti-ACTB-AK zur Positivkontrolle auf 20 ml aufgefüllt. Die Membran wurde einmal in Waschpuffer gewaschen und 1 Stunde mit dem 1. AK auf dem Schüttler inkubiert. Es folgte ein 5 x 7 minütiges Waschen mit Waschpuffer auf dem Schüttler. Zur Herstellung des 2. AK-Gemisches wurde dieser AK im Verhältnis 1 : 500 mit LowCross-Buffer verdünnt. Dazu wurden 40 µl AK auf 20 ml aufgefüllt. Die Membran wurde 45 min mit dem 2. AK auf dem Schüttler inkubiert und erneut 5 x 7 min mit Waschpuffer gewaschen. Zum Substratnachweis wurde eine Tablette Substrat für alkalische Phosphatase in 20 ml Aqua dest gelöst und die Membran 5–7 min in dieser Lösung inkubiert. Anschließend wurde sie mit H₂O abgespült und zwischen Filterpapier getrocknet.

Für die anschließende Detektion des Housekeeping-Proteins β -Aktin auf der gleichen Membran war ein Entfernen der gebundenen primären und sekundären AK der ersten Immunodetektion erforderlich. Dazu wurden die Western Blot Membranen 60 min mit Stripping Buffer inkubiert. Anschließend wurde mit neuem AK wie oben verfahren. β -Aktin diente als interner Standard zur Normalisierung der Signale, so dass die Proteinexpression verschiedener Proben untereinander verglichen werden konnte.

Die Volumen-Quantifizierung der Western Blot-Banden erfolgte mit der E.A.S.Y Win32 Software von Herolab. Pro Membran wurde das Volumen der Kontroll-/Referenzgruppe gleich 100 % gesetzt und das Volumen der anderen Gruppe entsprechend prozentual umgerechnet.

Material:

<i>Washing Buffer</i>	<i>Candor Bioscience GmbH, Wangen</i>
<i>LowCross-Buffer</i>	<i>Candor Bioscience GmbH, Wangen</i>
<i>1. AK Anti-MnSOD (Ab2), Rabbit Polyclonal (1 µg/µl)</i>	<i>Biomol GmbH, Hamburg</i>
<i>1. AK Anti-ACTB, Rabbit Polyclonal (1 µg/µl)</i>	<i>Abnova GmbH, Heidelberg</i>
<i>2. AK Anti-Rabbit IgG, gekoppelt an alkalische Phosphatase</i>	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
<i>Substrat für alkalische Phosphatase (Sigma Fast™ BCiP®/NBT)</i>	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
<i>Stripping Buffer</i>	<i>Candor Bioscience GmbH, Wangen</i>

Tabelle 4: Zum Western Blot verwendete Primär- und Sekundärantikörper sowie deren eingesetzten Konzentrationen

Antikörper	Konzentration
Anti-SOD 2 (MnSOD)	0,2 µg/ml
Anti-ACTB (β-Aktin)	2 µg/ml
Anti-Rabbit IgG	1:500

2.11. Verbrauchsmaterialien

Objektträger Superfrost® Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Kanülen (0,45 x 13 mm)	Becton Dickinson GmbH, Franklin Lakes, USA
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhrchen, Falcon® (15 ml & 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
1 ml-Spritzen	Becton Dickinson, Heidelberg
Elisa-Mikrotiterplatten 96 Well	Iwaki, Japan
Petrischalen	Greiner, Nürtingen
STRIP Tubes 0,1 ml für Rotor-Gene	LTF-Labortechnik GmbH & Co.KG, Wasserburg

2.12. Geräte

Bench Heraeus Lamin Air® HLB 2448	Heraeus Instruments GmbH, Osterode
Brutschrank Cytoperm 2, Heraeus Instruments	Thermo Scientific, Hanau
Digital pH-Meter 646	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
Durchlichtmikroskope	
Leica DMRB	ProMicron, Kirchheim/Neckar
Leitz®	Esselte Leitz GmbH & Co. KG, Wetzlar
Eppendorf Multipipette® Plus	Eppendorf AG, Hamburg
Christ Alpha I-5	Aichach/Oberbernbach
Heizblock	Liebisch GmbH Co. KG, Bielefeld
Rotilabor® Block-Heater H250	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kühlgeräte:	
-80°C Hera freeze, HFU 586 basic	Kendro Laboratory Products, Hanau
-20°C	Liebherr, Ochsenhausen
+4°C	Liebherr, Ochsenhausen
Magnetrührer MR2002	Heidolph, Kehlheim
Mikrowelle	AEG, Frankfurt am Main
Plattenphotometer Tecan Ultra 384	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Pipettierhilfe pipettus®-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Schlittenmikrotom	Leica SM2000R, Nussloch
U-3200 Spectrophotometer	Scientific Instruments, Schwäbisch Gmünd
Vortex Mischer REAX 2000	Heidolph, Kehlheim
Schüttler	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Analysenwaage SBC 21	Scaltec Instruments GmbH, Heiligenstadt
Digitale Präzisionswaage 440-47 N	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products, Hanau

Verifuge 3.2RS	Heraeus Sepatech GmbH , Osterode/Harz
Zytozentrifuge mit Zytokammern	Shandon southern products, Astmoor, GB
Filterkarten	Thermo Electron Corporation, Anatomical Pathology, Pittsburgh, USA

2.13. Software

Image-Pro Discovery	Media Cybernetics, Inc., Bethesda,USA
Magellan™	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Ascent Software	Ta'Xbiex, Malta
E.A.S.Y Win32 Software	Herolab GmbH, Wiesloch
Rotor-Gene Q Series Software	Qiagen GmbH, Hilden

2.14. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte zunächst mit dem nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Test, um alle Versuchsgruppen hinsichtlich der globalen Nullhypothese „zwischen den Gruppen besteht kein Unterschied“ zu überprüfen. Beim Vorliegen einer Signifikanz wurden paarweise Gruppenvergleiche mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests angeschlossen. Da die Gruppengröße zum Teil recht klein war, erfolgte die Beurteilung der Signifikanz anhand der *exakte Signifikanz* [2*(1-seitig Sig.)]. Bei beiden statistischen Tests wurde ein p-Werte $\leq 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) wurden mit (*), hoch signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) mit (**) und höchst signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) mit (***) gekennzeichnet. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts oder als Boxplot-Diagramm mit Median, oberem (75 %) und unterem (25 %) Quartil sowie den beiden Extremwerten angegeben.

3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss der Nitrierung von Allergenen auf verschiedene strukturelle, biochemische und molekularbiologische Parameter des allergischen Asthmas untersucht werden. Dies geschah unter Einbeziehung des antioxidativen Enzymhaushalts der SOD-Unterformen (CuZnSOD, MnSOD, ECSOD) in Typ-II-Pneumozyten von C57BL/6-Mäusen.

Für die Versuche wurden C57BL/6-Wildtypiere entsprechend des Protokolls zur Induktion eines akuten allergischen Asthmas behandelt und die aus ihnen gewonnenen Materialien dem weiteren Verwendungszweck entsprechend aufgearbeitet.

Bei einem Teil der Tiere erfolgte durch invasive Lungenfunktionsanalyse die Messung der Atemwegshyperreagibilität gegenüber Methacholin mit anschließender histologischer Aufarbeitung der Lungen ex situ. Die angefertigten Schnitte wurden in einer HE-Übersichtsfärbung hinsichtlich ihres Entzündungsgrades beurteilt und mit Hilfe von Antikörpern auf das Vorkommen der CuZnSOD und MnSOD immunhistochemisch untersucht. Bei dem anderen Teil der Tiere wurden Typ-II-Pneumozyten isoliert und im gleichen Zuge Plasma und BAL gewonnen. Mittels Zytospin wurde die BAL-Zytologie ermittelt und aus dem zellfreien Lavage-Überstand Gesamtprotein und Gesamtphospholipid bestimmt. Im Plasma wurde die Gesamt-SOD-Aktivität gemessen.

Aus den isolierten und in Trizol gelagerten Typ-II-Pneumozyten wurden RNA und Proteine extrahiert. In einem weiteren Schritt wurde aus der RNA mittels reverser Transkription cDNA hergestellt und als Ausgangsmaterial für die Real-time RT-PCR verwendet. So konnten spezifische cDNA-Sequenzen der an der Phospholipidsynthese beteiligten Enzyme und der antioxidativen Enzyme der SOD-Untergruppen amplifiziert werden. Die erhobenen Daten ließen Aussagen über einen Einfluss allergischer Entzündung auf die Genexpression zu. Um einen möglichen allergischen Effekt auch auf Proteinebene zu untersuchen, wurde exemplarisch die Expression des MnSOD-Proteins im Western Blot bestimmt.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit Daten von zwölf verschiedenen Gruppen erhoben (PBS/OVA, PBS/nOVA, OVA/OVA, OVA/nOVA, nOVA/nOVA, PBS/KLH, PBS/nKLH, nKLH/OVA, nKLH/nKLH, OVA/KLH, nOVA/KLH, nOVA/nKLH). Da die

Ergebnisse einzelner Gruppen zum Teil sehr ähnlich waren, wurde auf die einzelne Darstellung aller Versuchsgruppen verzichtet. Vielmehr findet sich im Ergebnisteil eine Auswahl an sieben repräsentativen Gruppen, die hinsichtlich der untersuchten Parameter miteinander verglichen wurden. Besonders interessant waren die Vergleiche zwischen der Kontrollgruppe PBS/nOVA und den *allergisierten* Gruppen OVA/OVA und nOVA/nOVA. Die zweite Kontrollgruppe PBS/nKLH wurde mit der ebenfalls *allergisierten* nKLH/nKLH-Gruppe verglichen. Der letzte Vergleich umfasste die Gruppen nOVA/KLH und nOVA/nKLH. Die erhobenen Daten sind in diesem Ergebnisteil der Übersichtlichkeit halber meist nur in Graphen abgebildet. Die den Graphen zugrundeliegenden deskriptiven Daten (Mittelwerte \pm Standardabweichung und SEM) sowie die in der Zytologie bestimmten Daten (Median, oberes und unteres Quartil, minimaler und maximaler Wert) sind in Tabellenform im Anhang aufgelistet. (s. Weiterführende Tabellen im Anhang)

Die Ergebnisse der übrigen fünf Gruppen (PBS/OVA, OVA/nOVA, PBS/KLH, nKLH/OVA, OVA/KLH) sind ebenfalls im Anhang abgebildet. Zusätzlich findet sich eine kurze schriftliche Zusammenfassung dieser Ergebnisse und der daraus abzuleitenden Erkenntnisse am Ende des Ergebnis- und Diskussionsteils.

3.1. Lungenfunktionsanalyse

Die Auswirkung einer *Allergisierung* mit (n)OVA bzw. (n)KLH auf die Atemwegshyperreaktivität (AHR) wurde in C57BL/6-Mäusen mit Hilfe des FlexiVent®Systems nach aerosolierter Methacholinprovokation bestimmt. Bei Inhalation wirkt Methacholin auf die glatte Muskulatur in den Atemwegen und kann bei bestehender AHR eine Atemwegskonstriktion auslösen. Bestimmt wurde die Resistance als Maß eines erhöhten Atemwegswiderstandes. Bei allen Tieren fand sich bei zunehmender Methacholinkonzentration ein Anstieg der Resistance. Allerdings wurden zwischen den *allergisierten* Mäusen und den mit PBS sensibilisierten Kontrollen keine Unterschiede beobachtet. Auch führte die Verwendung nitrierter Substanzen zu keiner weiteren Erhöhung der Resistance. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Entwicklung einer Methacholin-induzierten Atemwegshyperreaktivität in dem verwendeten Mausstamm weder durch *Allergisierung* noch durch die Verwendung nitrierter Substanzen beeinflusst wird.

Abbildung 2 zeigt eine repräsentative Graphik einer Resistance-Messreihe bei ansteigender Methacholinkonzentration, in der verschiedene OVA-Gruppen miteinander verglichen wurden. Die Graphen der KLH-Gruppen entsprachen dieser Abbildung, so dass auf ihre separate Darstellung verzichtet wurde.

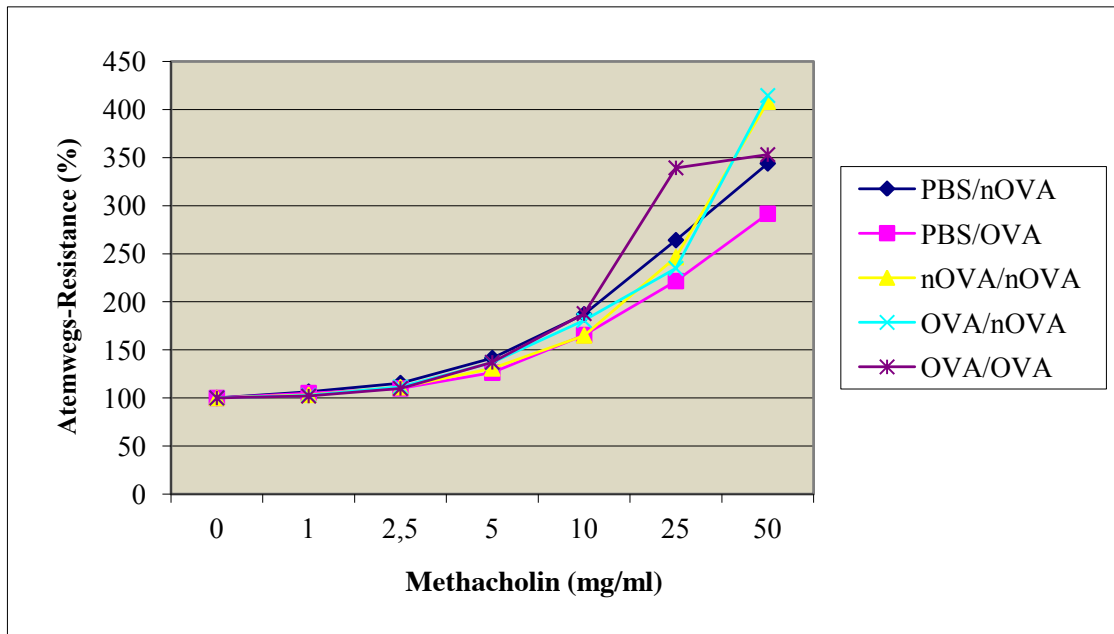


Abbildung 2: Messung der Resistance als Maß der Atemwegshyperreaktivität in Prozent

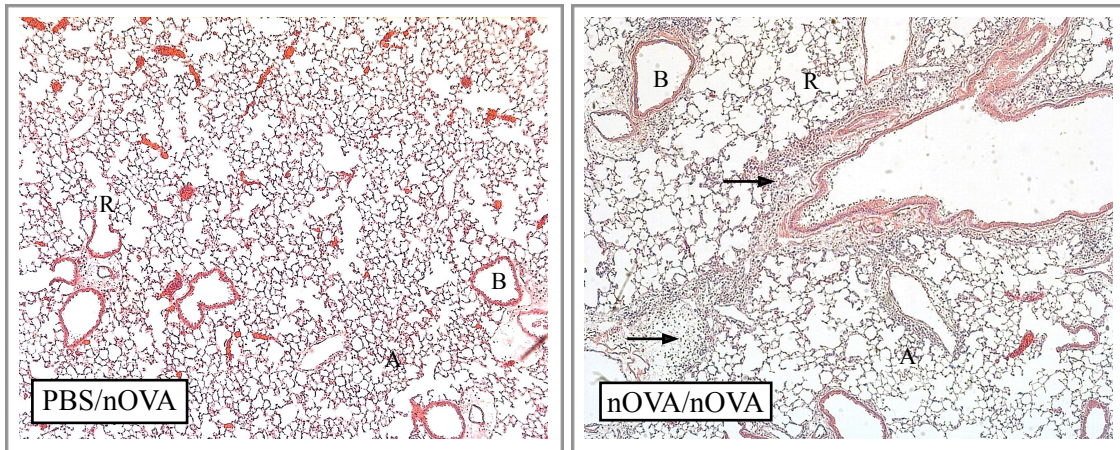
Gemessen wurde die Atemwegsresistance in C57BL/6-Mäusen nach Inhalation von Methacholin in ansteigender Konzentration unter Verwendung des FlexiVent®Systems 24 h nach der letzten Allergenexposition. Die Kurven verbinden die zu jedem Messzeitpunkt erhobenen Mittelwerte pro Gruppe. Auf die Darstellung der SEM wurde aufgrund der hohen Abweichung verzichtet. Wegen der geringen intergruppalen Unterschiede erfolgte keine statistische Datenauswertung, sondern eine rein deskriptive Analyse der erhobenen Ergebnisse. $n = 4-6$

3.2. Lungenhistologie in der HE-Färbung

Mit PBS sensibilisierte Kontrolltiere und Tiere der OVA- und KLH-Gruppen wurden in einem 28-tägigen Versuchsprotokoll intraperitoneal sensibilisiert und inhalativ provoziert. Am 29. Tag wurden die Lungen entnommen, in Formalien fixiert und in Paraffin eingebettet. Die anschließend angefertigten Schnittpräparate wurden HE gefärbt. Abbildungen 3a und 3b zeigen elf für die verschiedenen Gruppen repräsentative Lungenhistologieschnitte, die nach ihrem optischen Eindruck bewertet wurden.

In den Kontrollgruppen PBS/nOVA und PBS/nKLH zeigte sich eine unauffällige Lungenhistologie ohne Anzeichen einer Entzündung. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der OVA/OVA- und nOVA/nOVA-Gruppe eine ausgeprägte leukozytäre Infiltration, die peribronchiolär und perivaskulär ihre stärkste Ausprägung annahm. Dabei war die Infiltration vor allem in den Wänden der pulmonalen Gefäße, der terminalen und respiratorischen Bronchiolen sowie in den korrespondierenden Alveolen zu finden. Stellenweise kam es zu einem Übergreifen der Entzündung auch auf entfernteres Lungengewebe mit Ausbildung eines interstitiellen Ödems und dem Nachweis vereinzelter Immunzellen intraseptal und intraalveolär. Die Bronchialwand erschien insgesamt verbreitert, die Bronchialmuskulatur stellenweise hypertrophiert und die Epitheloberfläche mancherorts aufgeraut mit nach intraluminal abgeschilferten Zellen. Diese Veränderungen waren in der nOVA/nOVA-Gruppe noch ausgeprägter als in der OVA/OVA-Gruppe. So schien eine Nitrierung des OVAs die entzündliche Reaktion zusätzlich zu verstärken. Diese Aussage spiegelte sich auch in der Gruppe nKLH/nKLH wieder, welche in ihrem Entzündungsmuster der nOVA/nOVA-Gruppe ähnelte. Im Vergleich der nOVA/KLH- und nOVA/nKLH-Gruppen verhielt sich die nOVA/KLH-Gruppe entsprechend der Kontrollen und zeigte keine inflammatorische Immunzelleinwanderung. Ein positiver Effekt auf die inflammatorische Infiltration der Lunge wurde mit der zusätzlichen Nitrierung des KLH erzielt. Die nOVA/nKLH-Gruppe zeigte ebenfalls eine entzündliche Reaktion, wobei diese ein geringeres Ausmaß annahm als die der OVA/OVA und nOVA/nOVA-Gruppen.

A



B

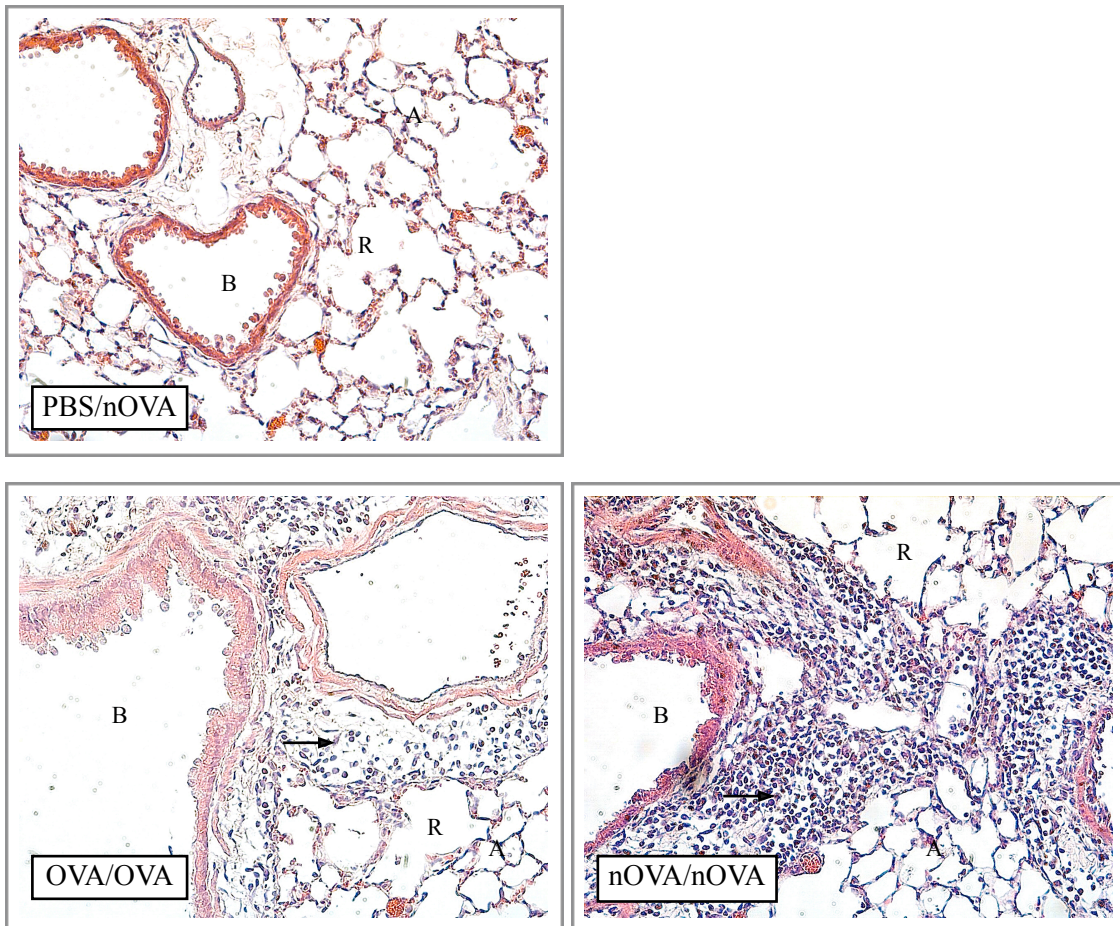
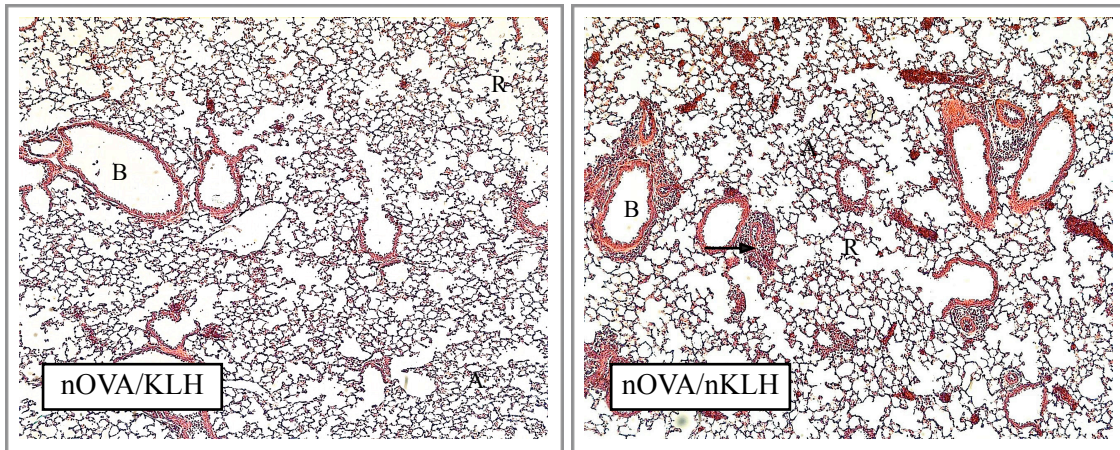


Abbildung 3a: Lichtmikroskopische Darstellung von repräsentativen Lungen-Paraffinschnitten der OVA-Gruppen

24 h nach der letzten Allergenprovokation wurden die Lungen *in toto* entnommen, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach dem Schneiden mit dem Mikrotom in ca. 2 μ m dicke Scheiben und dem Färben mit HE erfolgte die histologische Auswertung nach optischem Eindruck.

B = Bronchiolus, R = Bronchiolus respiratorius, A = Alveolen, Pfeil = leukozytäres Infiltrat
[HE-Färbung, A: 50fache und B: 200fache Vergrößerung]

A



B

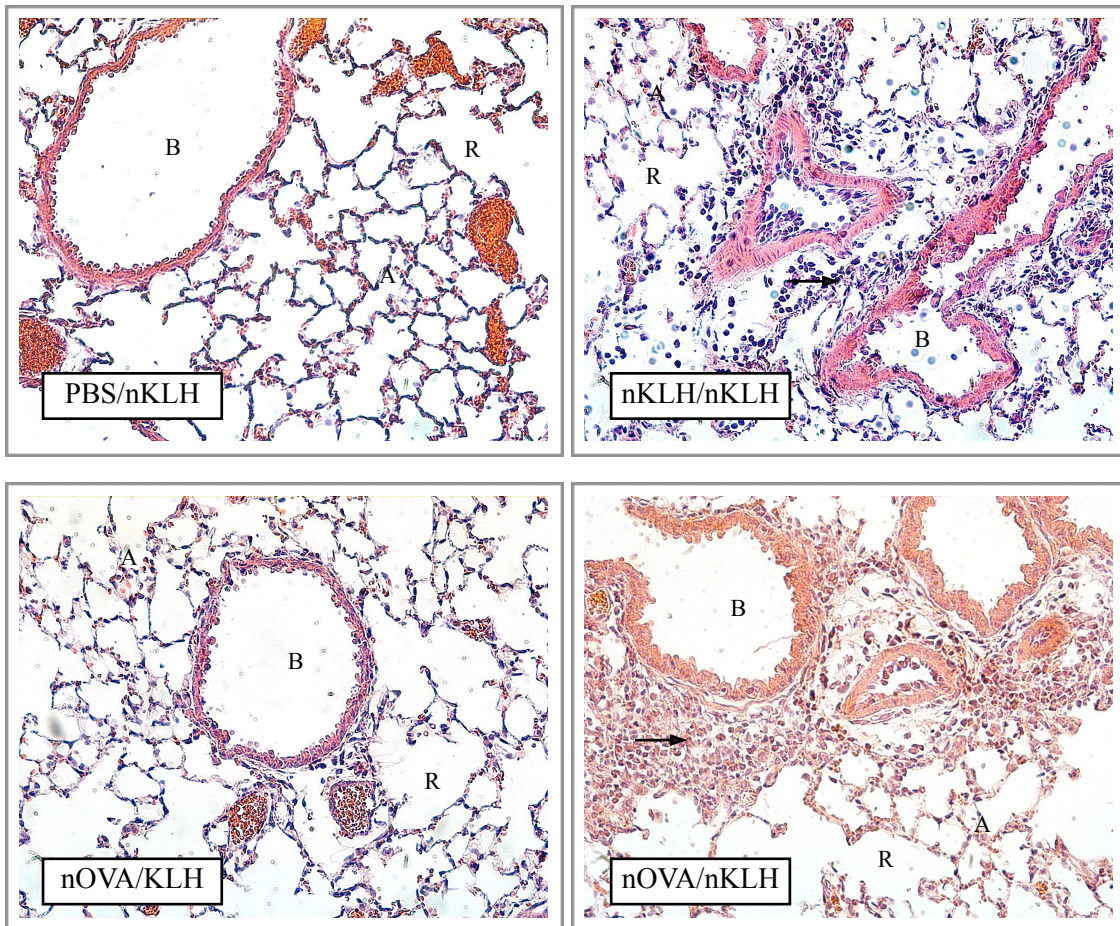


Abbildung 3b: Lichtmikroskopische Darstellung von repräsentativen Lungen-Paraffinschnitten der KLH-Gruppen

24 h nach der letzten Allergenprovokation wurden die Lungen *in toto* entnommen, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach dem Schneiden mit dem Mikrotom in ca. 2 μ m dicke Scheiben und dem Färben mit HE erfolgte die histologische Auswertung nach optischem Eindruck.

B = Bronchiolus, R = Bronchiolus respiratorius, A = Alveolen, Pfeil = leukozytäres Infiltrat

[HE-Färbung, A: 50fache und B: 200fache Vergrößerung]

3.3. Zytologie der BAL

Die BAL wurde im Rahmen der Typ-II-Zellgewinnung durchgeführt. Mittels Zytopsin wurden die BAL-Zellen isoliert und zur besseren Unterscheidung nach Pappenheim gefärbt. Die Differentialzellauszählung erfolgte anhand von fünf Bildausschnitten und konzentrierte sich auf Makrophagen, Lymphozyten, eosinophile und neutrophile Granulozyten. Repräsentative Zytopsinpräparate der einzelnen Gruppen sind in den Abbildungen 4a und 4b dargestellt. Die BALs der Kontrollgruppen PBS/nOVA und PBS/nKLH zeigten fast ausschließlich Makrophagen. Die Präparate der Gruppen OVA/OVA und nOVA/nOVA wurden von Eosinophilen dominiert, wobei die nOVA/nOVA-Gruppe eine deutlich höhere Eosinophilenzahl aufwies als die OVA/OVA-Gruppe. Vergleichbar viele Eosinophile wie die nOVA/nOVA-Gruppe wiesen auch die Präparate der nKLH/nKLH-Gruppe auf. Während bei der nOVA/KLH-Gruppe ähnlich der Kontrollen vorwiegend Makrophagen vorherrschten, zeigte die Gruppe nOVA/nKLH ein inhomogenes Bild. Dieses äußerte sich dadurch, dass es neben dem Großteil der nOVA/nKLH-Präparate mit überwiegend Makrophagen einige Präparate gab, die neben Makrophagen auch viele eosinophile Zellen zeigten.

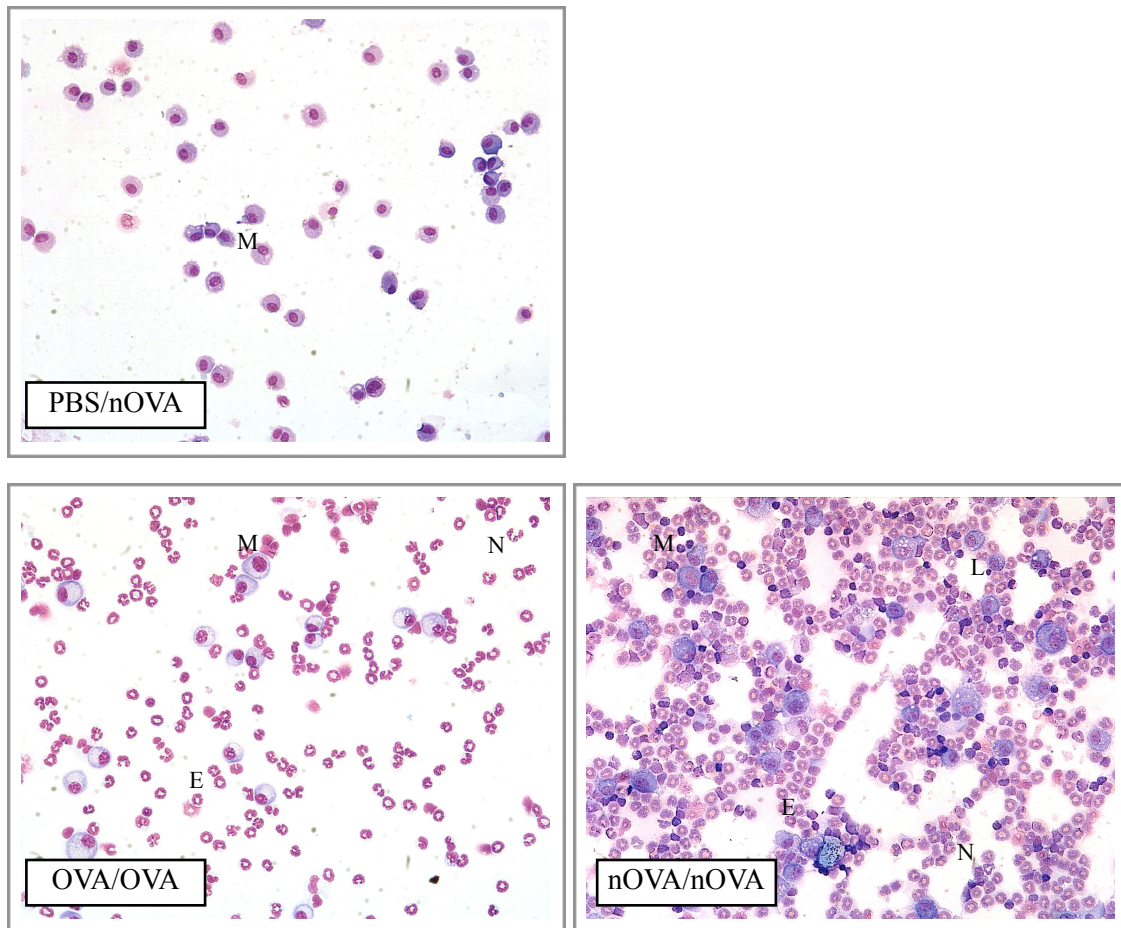


Abbildung 4a: Lichtmikroskopische Darstellung von repräsentativen Zytospinpräparaten der OVA-Gruppen

*Diese wurden 48 h nach der letzten Allergenprovokation im Rahmen der Typ-II-Zellisolierung und BAL-Gewinnung durchgeführt. Nach der Papanheim-Färbung erfolgte die mikroskopische Auszählung von fünf repräsentativen Bildausschnitten anhand morphologischer Kriterien. M = Makrophage, L = Lymphozyt, E= Eosinophile Granulozyten, N = Neutrophiler Granulozyt
[Papanheim-Färbung, 200fache Vergrößerung]*

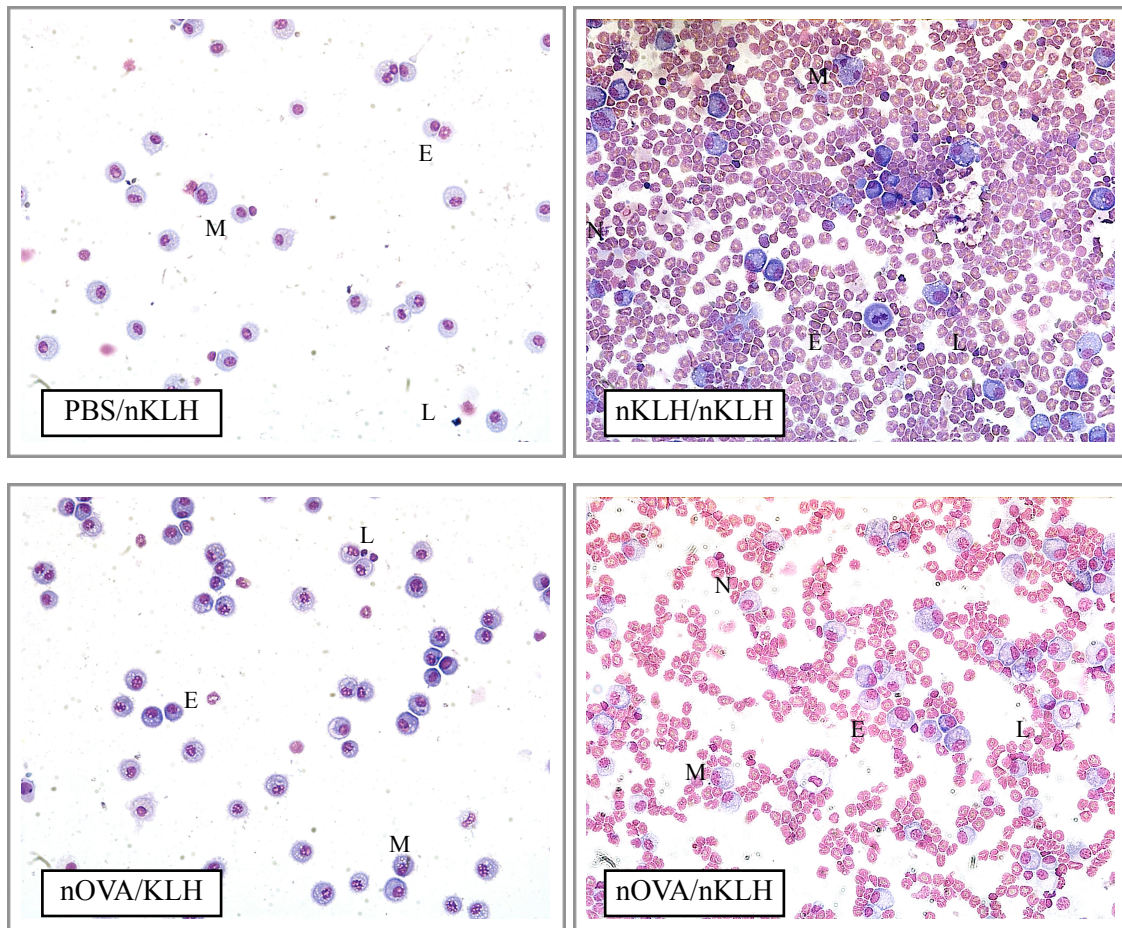


Abbildung 4b: Lichtmikroskopische Darstellung von repräsentativen Zytospinpräparaten der KLH-Gruppen

Diese wurden 48 h nach der letzten Allergenprovokation im Rahmen der Typ-II-Zellisolierung und BAL-Gewinnung durchgeführt. Nach der Papanheim-Färbung erfolgte die mikroskopische Auszählung von fünf repräsentativen Bildausschnitten anhand morphologischer Kriterien. M = Makrophage, L = Lymphozyt, E= Eosinophile Granulozyten, N = Neutrophiler Granulozyt

[Papanheim-Färbung, 200fache Vergrößerung]

3.3.1. Differentialzellzahlen der BAL

Die folgenden Abbildungen 5-9 stellen die jeweilige Anzahl verschiedener Differentialzellen der Lungenzytologie in Boxplot-Diagrammen dar.

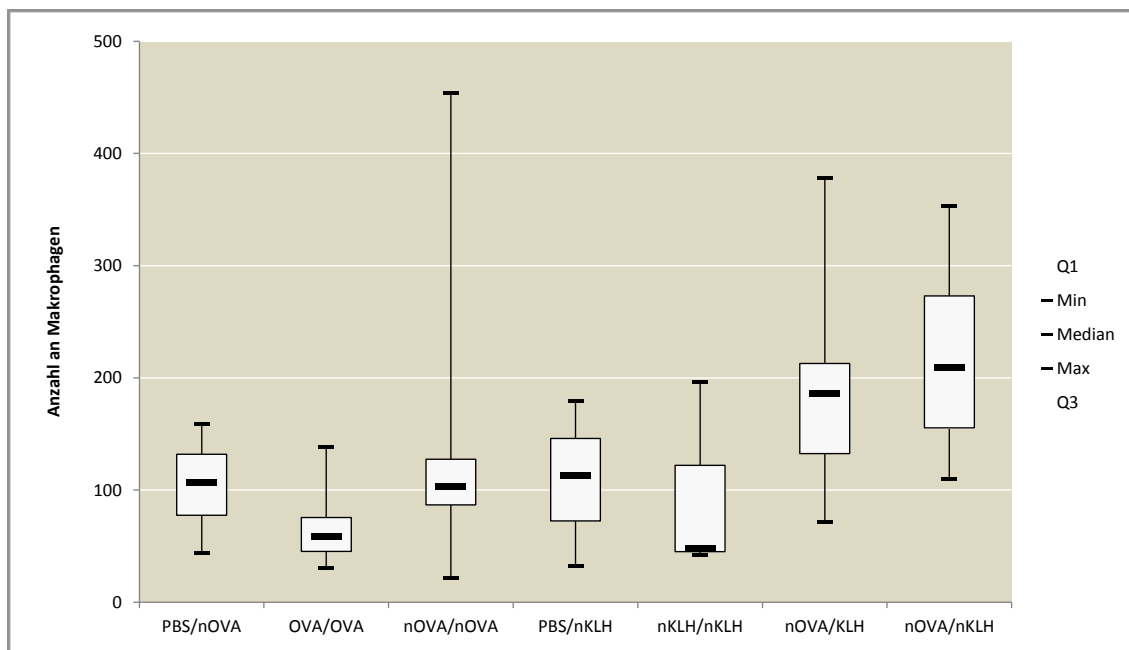


Abbildung 5: Anzahl an Makrophagen in der BAL

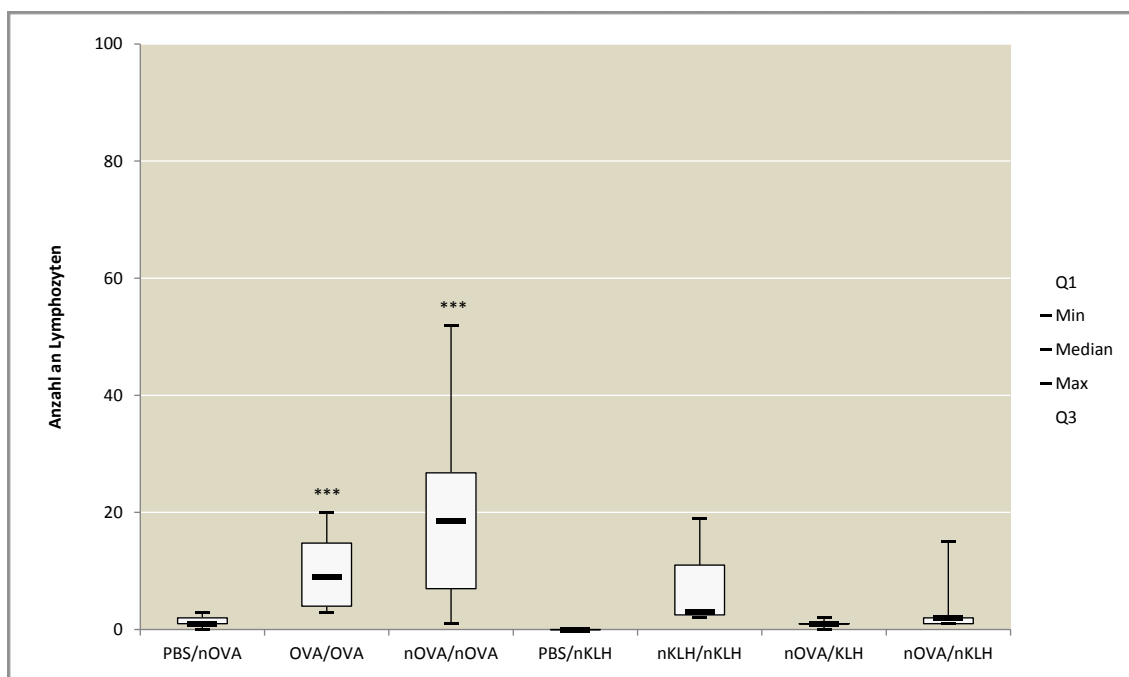


Abbildung 6: Anzahl an Lymphozyten in der BAL

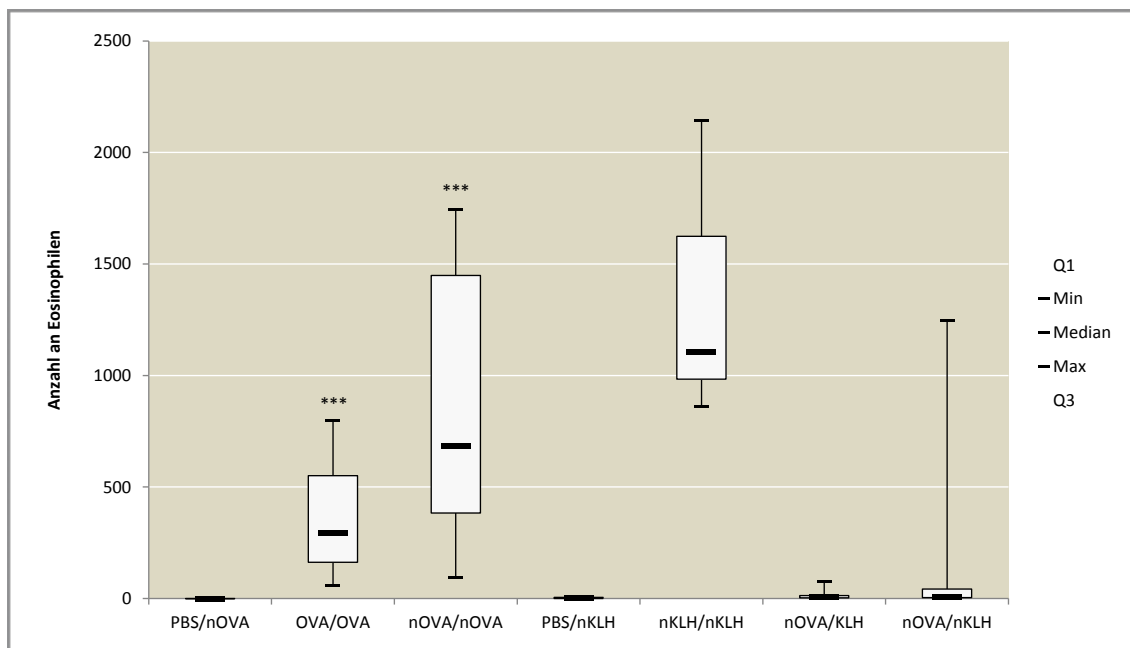


Abbildung 7: Anzahl an Eosinophilen in der BAL

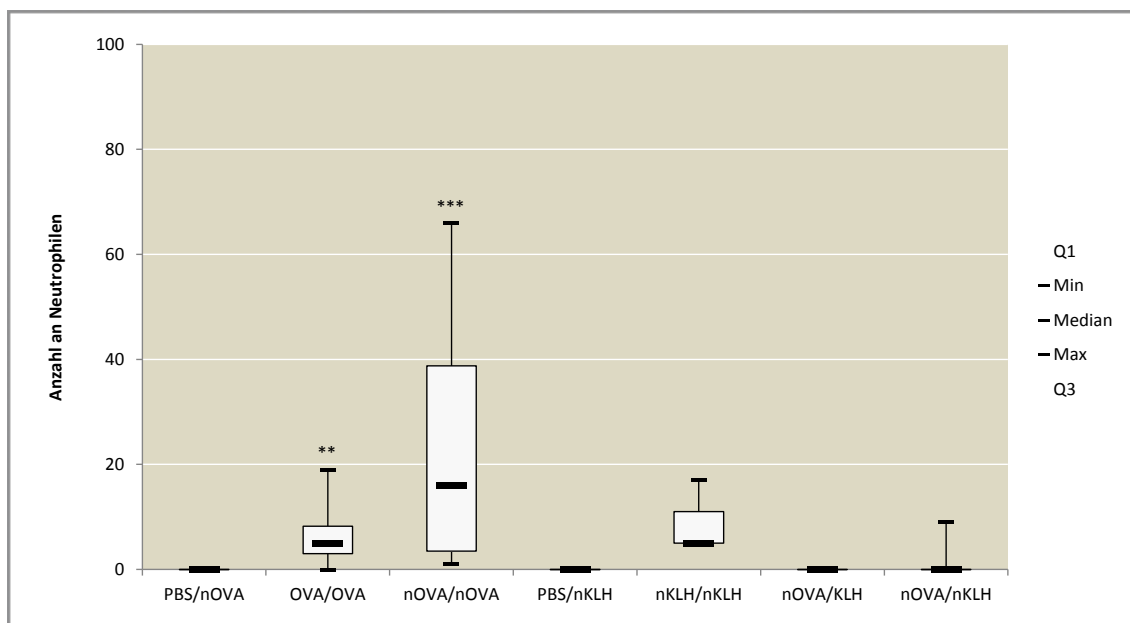


Abbildung 8: Anzahl an Neutrophilen in der BAL

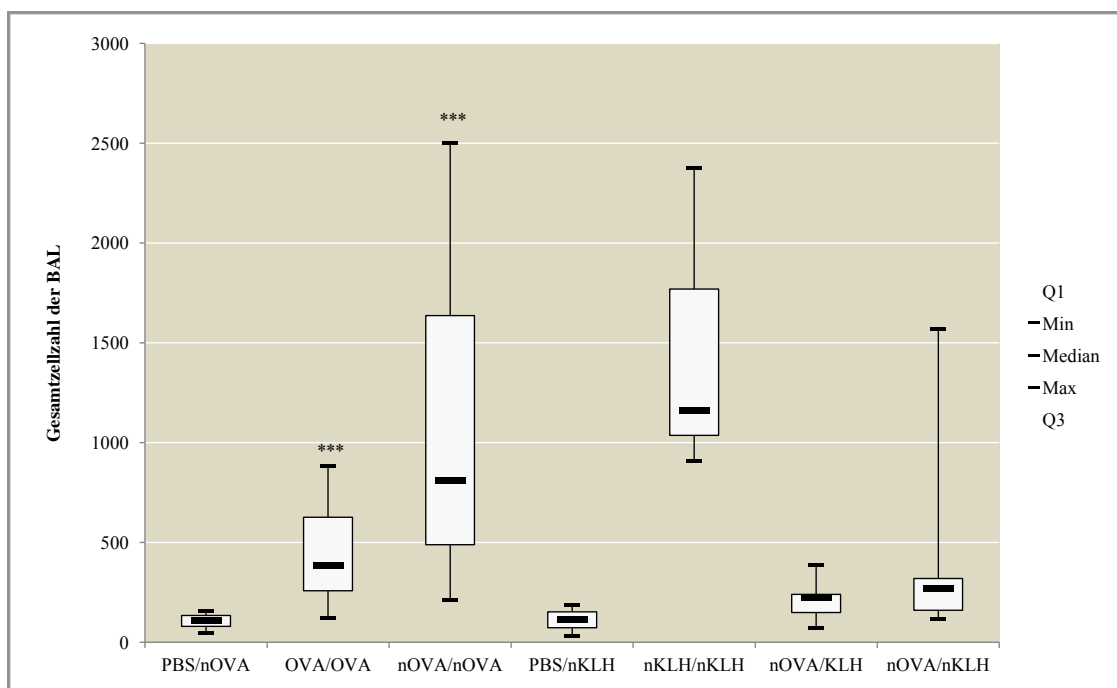


Abbildung 9: Gesamtzellzahl der BAL

Zu den Abbildungen 5-9: Dargestellt sind die Differentialzellzahlen in Boxplot-Diagrammen. Die Differentialzellauszählung der Zytospinpräparate erfolgte mikroskopisch anhand von je fünf repräsentativen Bildausschnitten nach morphologischen Kriterien. Dargestellt sind jeweils Median, oberes und unteres Quartil sowie minimaler und maximaler Wert. $n = 3-10$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Die den Boxplot-Diagrammen (Abbildungen 5-9) zugrundeliegenden Zahlenwerte sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Differentialzellzahlen der BAL

	PBS/ nOVA (n = 10)	OVA/ OVA (n = 8)	nOVA/ nOVA (n = 8)	PBS/ nKLH (n = 3)	nKLH/ nKLH (n = 3)	nOVA/ KLH (n = 6)	nOVA/ nKLH (n = 7)
Makrophagen							
Median	107	59	104	113	48	187	209
Q1	78	45	87	73	45	133	156
Q3	132	76	128	146	122	213	273
Min	44	31	22	32	42	72	110
Max	159	138	454	179	196	378	353
Lymphozyten							
Median	1	9***	19***	0	3	1	2
Q1	1	4	7	0	3	1	1
Q3	2	15	27	0	11	1	2
Min	0	3	1	0	2	0	1
Max	3	20	52	0	19	2	15
Eosinophile							
Median	0	297***	685***	1	1106	8	7
Q1	0	163	383	1	984	3	5
Q3	0	551	1449	6	1625	14	43
Min	0	58	96	0	861	2	2
Max	0	800	1746	10	2143	77	1245
Neutrophile							
Median	0	5**	16***	0	5	0	0
Q1	0	3	4	0	5	0	0
Q3	0	8	39	0	11	0	0
Min	0	0	1	0	5	0	0
Max	0	19	66	0	17	0	9
Gesamtzellzahl							
Median	108	387***	809***	114	1162	225	268
Q1	79	257	489	73	1036	149	160
Q3	134	626	1636	152	1769	239	319
Min	46	124	211	32	910	74	115
Max	159	882	2500	189	2375	386	1570

Die Differentialzellauszählung der Zytospinpräparate erfolgte mikroskopisch anhand von je fünf repräsentativen Bildausschnitten nach morphologischen Kriterien. Dargestellt sind Median, oberes und unteres Quartil sowie minimaler und maximaler Wert. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

In allen vier Differentialzellzahlen wie auch in der Gesamtzellzahl zeigten sich im globalen statistischen Vergleich mittels Kruskal-Wallis Test signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($p = 0,019$ für Makrophagen, $p < 0,001$ für jeweils Lymphozyten, Eosinophile, Neutrophile und die Gesamtzellzahl). Für Zweiervergleiche wurde der Mann-Whitney-Test angeschlossen.

Die Makrophagenzahlen der Versuchsgruppen waren recht homogen und zeigten nur

geringe Schwankungen. Trotz des signifikanten Kruskal-Wallis-Tests fanden sich in den Zweiervergleichen gegen die jeweiligen Kontroll-/Referenzgruppen keine statistisch relevanten Unterschiede.

Anders verhielt es sich mit den Lymphozyten-Zweiervergleichen. Dort wurde sowohl der Unterschied von OVA/OVA als auch der von nOVA/nOVA gegenüber der Kontrolle PBS/nOVA signifikant (p jeweils $< 0,001$). Die meisten Lymphozyten zeigten die Präparate der Gruppe nOVA/nOVA, gefolgt von den Gruppen OVA/OVA und nKLH/nKLH.

In den Paarvergleichen hinsichtlich der Eosinophilenzahl fanden sich erneut signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle PBS/nOVA und den Gruppen OVA/OVA und nOVA/nOVA (p jeweils $< 0,001$). Im Vergleich von PBS/nKLH und nKLH/nKLH fanden sich in letztgenannter Gruppe deutlich mehr Eosinophile als in der Kontrolle. Hinsichtlich der Gruppe nOVA/nKLH war bemerkenswert, dass diese ausgeprägte intragruppale Schwankungen zeigte mit einem Minimalwert von 2 eosinophilen und einem Maximalwert von 1245 eosinophilen Zellen. Im Median entsprach diese Gruppe allerdings der Gruppe nOVA/KLH und den Kontrollen.

Die Zweiervergleiche der Neutrophilen waren mit denen der Eosinophilen vergleichbar. Es fanden sich signifikante Unterschiede zwischen PBS/nOVA und OVA/OVA ($p = 0,006$) und zwischen PBS/nOVA und nOVA/nOVA ($p < 0,001$). Die Gruppe nKLH/nKLH zeigte gegenüber PBS/nKLH eine nicht signifikante Erhöhung der Neutrophilenzahl und die Gruppen nOVA/KLH und nOVA/nKLH verhielten sich wie die Kontrollen.

Hinsichtlich der Gesamtzellzahl war zu erkennen, dass die Gruppen mit vielen eosinophilen Zellen ebenfalls die Gruppen mit den höchsten Gesamtzellzahlen waren. Im Vergleich zu den Kontrollen stieg die Gesamtzellzahl über OVA/OVA zu nOVA/nOVA signifikant an (p jeweils $< 0,001$) und erreichte in der Gruppe nKLH/nKLH ihre höchste Ausprägung. Trotz des großen Zellunterschieds von PBS/nKLH und nKLH/nKLH lag keine Signifikanz vor ($p = 0,1$). Zwischen nOVA/KLH und nOVA/nKLH bestand nur ein geringer Unterschied, der auch im Vergleich zur Kontrollgruppe PBS/nKLH nicht signifikant wurde.

3.3.2. Prozentuale Verteilung der BAL-Zellen

Zur näheren Veranschaulichung der in der BAL enthaltenen Zellpopulationen stellt Abbildung 10 ihre Verteilung prozentual dar.

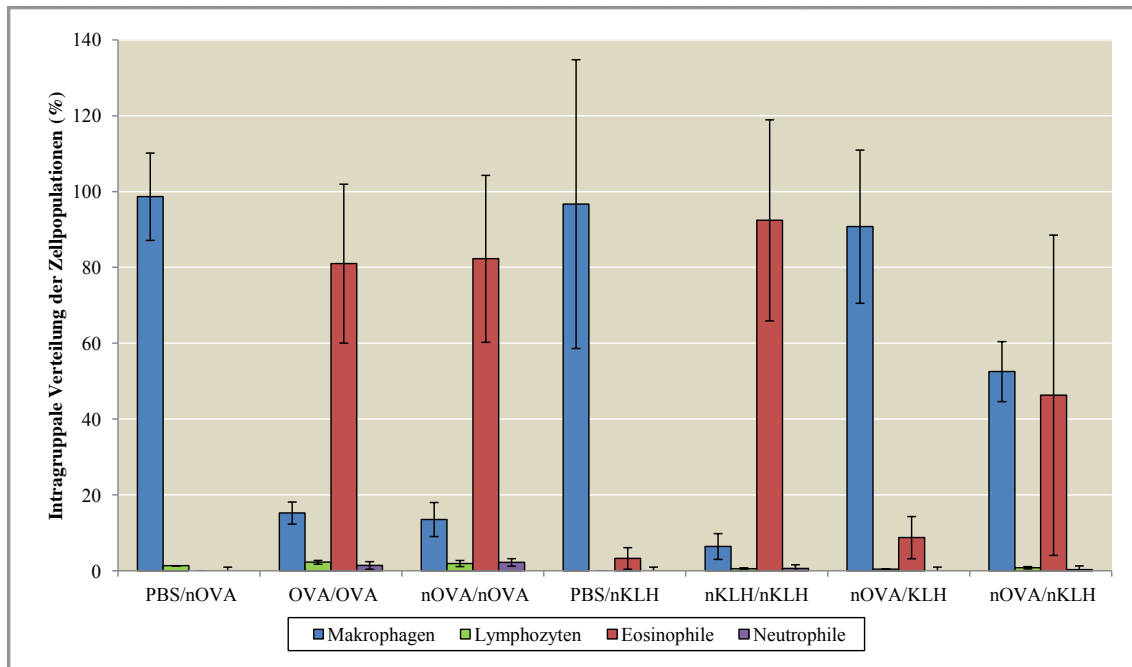


Abbildung 10: Prozentuale Verteilung der in der BAL enthaltenen Zellpopulationen innerhalb einer Gruppe

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Es handelt sich um eine deskriptive Übersicht ohne statistische Auswertung. Die Gesamtzellzahl pro Gruppe wurde gleich 100 % gesetzt und die Mittelwerte sowie die SEM-Werte der Zellpopulationen aller pro Gruppe ausgezählten Präparate auf die 100 % bezogen. Bei dieser Art der Ergebnisdarstellung ist bei der Gruppe nOVA/nKLH zu beachten, dass aufgrund der großen SEM die Mittelwerte zum Teil deutlich von den Medianen abweichen (s. Weiterführende Tabellen im Anhang).

Bei allen mit PBS sensibilisierten Kontrolltieren war der Makrophagenanteil prozentual am stärksten vertreten. Bei den OVA/OVA- und nOVA/nOVA-Gruppen fand sich eine deutliche Zunahme der Eosinophilenzahl bei paralleler relativer Abnahme der Makrophagenzahl. Deutliche Unterschiede zu den Kontrollen fanden sich auch in der nKLH/nKLH Gruppe. Die Gruppe nOVA/KLH verhielten sich wie die Kontrollen. Durch zusätzliche Nitrierung des KLH änderte sich das Bild leicht. Die nOVA/nKLH-Gruppe erreichte zwar nicht die Höhe der Eosinophilenpopulation der (n)OVA und nKLH/nKLH Gruppen, zeigte aber in einigen Präparaten mehr eosinophile Zellen als die Kontrollen. Bei der Auszählung der Lymphozyten und Neutrophilen ergab sich jeweils eine geringfügige Erhöhung in der OVA/OVA- und nOVA/nOVA-Gruppe.

3.4. Gesamtproteingehalt der BAL

Zur Beantwortung der Frage, ob allergische Entzündung und die Verwendung nitrierter Allergene Auswirkungen auf die Integrität und Permeabilität des Lungenepithels besitzt, wurde der Gesamtproteinspiegel in der BAL bestimmt. Die Bestimmung erfolgte nach der BCA-Methode mithilfe des BCA™ Protein Assay Kits.

Im globalen statistischen Vergleich mittels Kruskal-Wallis Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen ($p < 0,001$).

In den Zweiervergleichen zeigte sich eine jeweils signifikante Protein-Zunahme bei der OVA/OVA- und nOVA/nOVA-Gruppe im Vergleich zu der mit PBS sensibilisierten Kontrolle ($190,45 \pm 6,08 \mu\text{g/ml}$ PBS/nOVA vs. $401,91 \pm 32,54 \mu\text{g/ml}$ OVA/OVA vs. $493,19 \pm 53,32 \mu\text{g/ml}$ nOVA/nOVA, $p =$ jeweils $< 0,001$). Im Vergleich der Gruppen OVA/OVA und nOVA/nOVA zeigte die nitrierte Gruppe einen höheren Proteingehalt, ohne dass eine Signifikanz vorlag. Ebenso war der Proteingehalt der nKLH/nKLH Gruppe deutlich, aber nicht signifikant höher als der der Kontrollgruppe PBS/nKLH ($142,45 \pm 11,39 \mu\text{g/ml}$ PBS/nKLH vs. $377,10 \pm 11,71 \mu\text{g/ml}$ nKLH/nKLH, $p = 0,1$). Der Vergleich zwischen nOVA/KLH und nOVA/nKLH erbrachte für die Gruppe nOVA/nKLH insgesamt leicht erhöhte Werte ohne statistisch signifikant zu sein ($180,29 \pm 8,91 \mu\text{g/ml}$ nOVA/KLH vs. $264,00 \pm 41,43 \mu\text{g/ml}$ nOVA/nKLH, $p = 0,234$). Hingegen war der BAL-Proteingehalt sowohl der nOVA/KLH- als auch nOVA/nKLH-Gruppe gegenüber der Kontrolle PBS/nKLH signifikant erhöht ($p = 0,033$ nOVA/KLH und $p = 0,024$ nOVA/nKLH) (s. Abbildung 11).

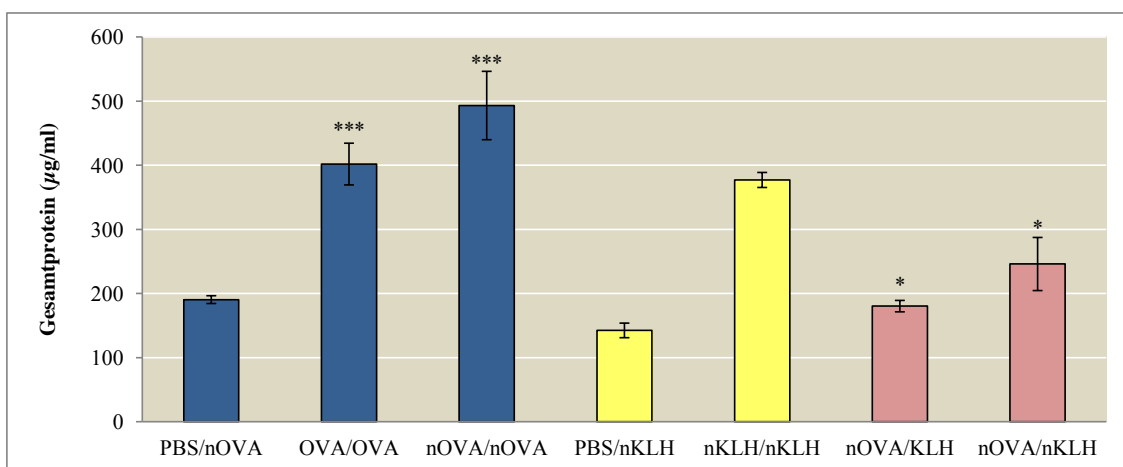


Abbildung 11: Gesamtproteinmenge in der BAL

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM in $\mu\text{g/ml}$. $n = 3-9$. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

3.5. Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zu Phospholipiden als Komponenten des Lungensurfactant

3.5.1. Gesamtpospholipidmenge in der BAL

Da allergische Entzündung auch den terminalen Respirationstrakt betrifft und dessen Struktur und Funktion schädigen kann, ist eine Beteiligung der Alveolen an der Pathogenese des allergischen Asthmas wahrscheinlich. Die Schäden schließen auch den pulmonalen Surfactant ein, der als Phospholipid-Proteingemisch die Alveolen stabilisiert und für den Gasaustausch essentiell ist. Um zu untersuchen, wie sich allergische Entzündung und die Verwendung nitrierter Allergene auf die Surfactantkomposition des verwendeten murinen in vivo-Modells auswirkt, wurden die Gesamtpospholipidspiegel in der BAL und die an der Phospholipidsynthese beteiligten Enzyme in Typ-II-Pneumozyten bestimmt.

Bei der Phospholipidbestimmung zeigte sich im globalen statistischen Vergleich mittels Kruskal-Wallis Test ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen ($p < 0,001$). Im Zweiervergleich zeigte sich der Phospholipidspiegel der OVA/OVA und nOVA/nOVA-Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe PBS/nOVA signifikant vermindert ($17,78 \pm 0,78 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ PBS/nOVA vs. $10,70 \pm 0,77 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ OVA/OVA vs. $11,33 \pm 0,74 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ nOVA/nOVA, $p =$ jeweils $< 0,001$). Zwischen OVA/OVA und der nitrierten Form nOVA/nOVA bestanden allerdings keine Unterschiede. Nur leicht vermindert war der Phospholipidspiegel der nKLH/nKLH-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe PBS/nKLH ($14,59 \pm 0,72 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ PBS/nKLH vs. $13 \pm 2,76 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ nKLH/nKLH). Zwischen den Gruppen nOVA/KLH und nOVA/nKLH fanden sich keine Unterschiede. Beide Phospholipidlevel entsprachen in etwa denen der Kontrollen ($17,41 \pm 1,17 \mu\text{g}/100\mu\text{l}$ nOVA/KLH vs. $15,92 \pm 0,47 \mu\text{g}/100\mu\text{l}$ nOVA/nKLH) (s. Abbildung 12).

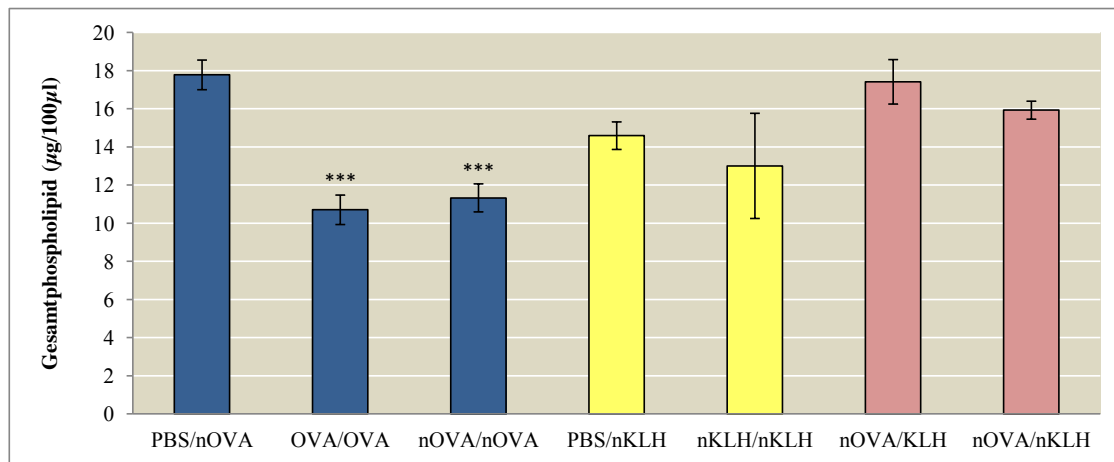


Abbildung 12: Gesamtphospholipidmenge in der BAL

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM in $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$. $n = 3-9$. *** $p < 0,001$

3.5.2. mRNA-Expression der CTP: Phosphocholin Cytidylyltransferase alpha in Typ-II-Pneumozyten

Neben der Erforschung des extrazellulären Phospholipidgehalts schloss sich eine Analyse des Surfactantmetabolismus auf zellulärer Ebene an. Ausgangsmaterial war die isolierte mRNA der Typ-II-Zellen, welche in cDNA umgeschrieben und mittels reverser Transkription vervielfältigt wurde. Untersucht wurden die Hauptenzyme der Phospholipidsynthese. Der Kennedy-Pathway zur Bildung des Hauptphospholipids Phosphatidylcholin besteht aus drei enzymatischen Schritten. Untersucht wurde die Expression der Enzyme der beiden ersten Schritte; die Cholinase alpha und beta (CK alpha und beta) sowie die CTP: Phosphocholin Cytidylyltransferase alpha (CCT alpha).

Im globalen statistischen Vergleich mittels Kruskal-Wallis Test zeigte sich hinsichtlich der CCT-mRNA-Expression ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen ($p = 0,024$).

In den Paarvergleichen war der CCT-mRNA-Gehalt der OVA/OVA-Gruppe deutlich, der CCT-mRNA-Gehalt der nOVA/nOVA-Gruppe signifikant gegenüber der Kontrolle PBS/nOVA vermindert ($100 \pm 18,05$ % PBS/nOVA vs. $47,71 \pm 6$ % OVA/OVA, $p = 0,057$, vs. $36,7 \pm 6,75$ % nOVA/nOVA, $p = 0,029$). Dabei unterschieden sich die Gruppen OVA/OVA und die nitrierte Form nOVA/nOVA kaum voneinander. Die CCT-mRNA-Expression war in der Gruppe nKLH/nKLH gegenüber der Kontrolle

PBS/nKLH leicht erhöht ($81,25 \pm 12,09$ % PBS/nKLH vs. $99,50 \pm 6,87$ % nKLH/nKLH). Ebenfalls leicht erhöht war der CCT-Spiegel in der nOVA/nKLH-Gruppe im Vergleich zu nOVA/KLH ($52,91 \pm 10,22$ % nOVA/KLH vs. $86,67 \pm 22,70$ % nOVA/nKLH) (s. Abbildung 13).

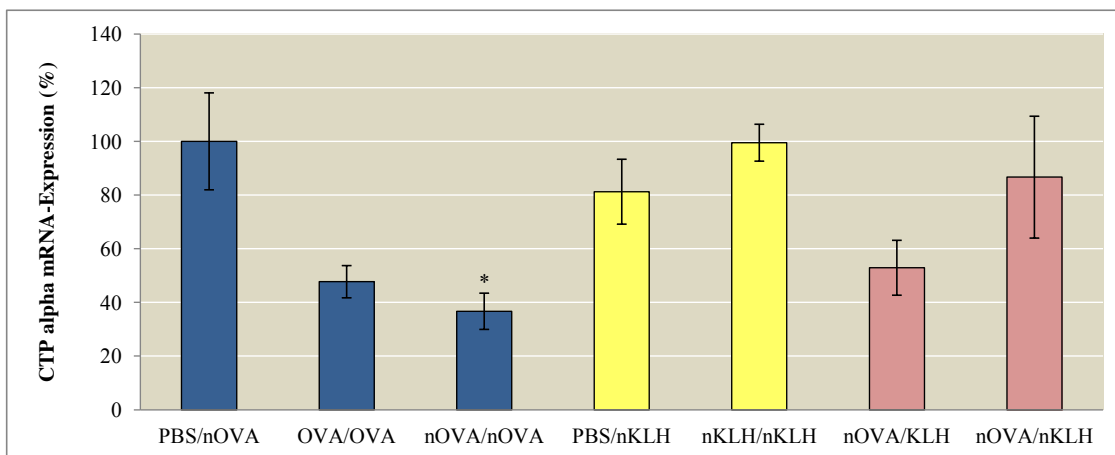


Abbildung 13: Real-time RT-PCR der CTP: Phosphocholin Cytidylyltransferase alpha in Typ-II-Pneumozyten

Die ermittelten $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte der PBS/nOVA-Gruppe wurden gleich 100 % gesetzt und die Werte der anderen Gruppen entsprechend berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM in Prozent. $n = 3-4$.

* $p < 0,05$

3.5.3. mRNA-Expression der Cholinase alpha in Typ-II-Pneumozyten

Hinsichtlich der CK alpha-mRNA-Expression zeigte sich im globalen statistischen Vergleich mittels Kruskal-Wallis Test ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen ($p = 0,008$).

In den Zweiervergleichen war die CK alpha-mRNA-Expression der Gruppen OVA/OVA und nOVA/nOVA deutlich, aber nicht signifikant gegenüber PBS/nOVA vermindert ($100 \pm 12,23$ % PBS/nOVA vs. $23,69 \pm 9,09$ % OVA/OVA, $p = 0,114$ vs. $27,42 \pm 11,24$ % nOVA/nOVA, $p = 0,2$). Dabei zeigten die OVA/OVA und nOVA/nOVA-Gruppen einander recht homogene Werte. Die CK alpha-Expression war in der Gruppe nKLH/nKLH gegenüber PBS/nKLH leicht erhöht ($117,34 \pm 13,17$ % PBS/nKLH vs. $140,39 \pm 53,30$ % nKLH/nKLH) und ergab zwischen den Gruppen nOVA/KLH und nOVA/nKLH keinen Unterschied ($224,95 \pm 38,67$ % nOVA/KLH vs. $225,56 \pm 51,52$ % nOVA/nKLH). Im globalen Vergleich aller Gruppen ist bemerkenswert, dass der CK alpha-mRNA-Gehalt in den mit (n)KLH behandelten Tieren insgesamt deutlich über dem der mit (n)OVA behandelten Tieren lag (s. Abbildung 14).

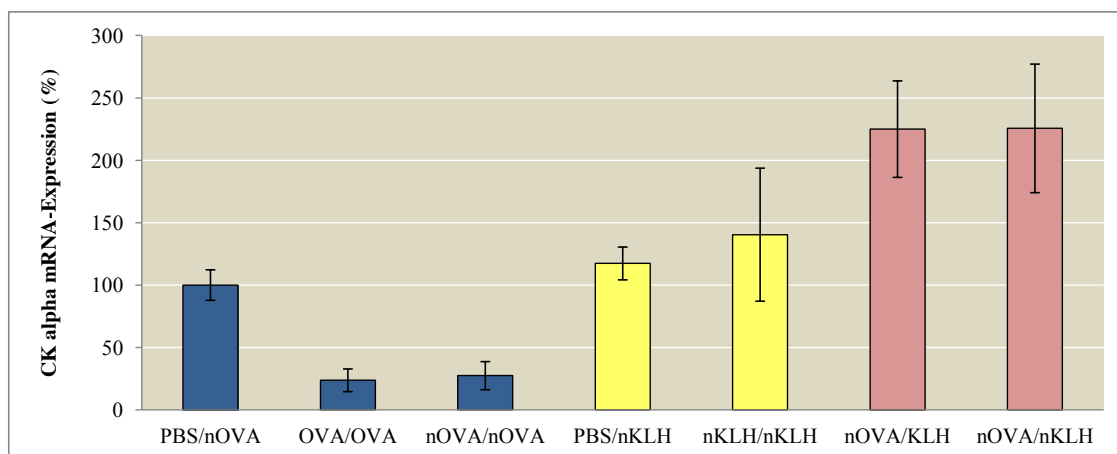


Abbildung 14: Real-time RT-PCR der Cholinase alpha in Typ-II-Pneumozyten

Die ermittelten $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte der PBS/nOVA-Gruppe wurden gleich 100 % gesetzt und die Werte der anderen Gruppen entsprechend berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM in Prozent. $n = 3-4$

3.5.4. mRNA-Expression der Cholinkinase beta in Typ-II-Pneumozyten

Der globale statistische Vergleich mittels Kruskal-Wallis Test ergab hinsichtlich der CK beta-mRNA-Expression keinen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen ($p = 0,227$). Daher wurde kein Mann-Whitney-Test zum Erhalt von Zweiervergleichen angeschlossen.

Der CK beta-mRNA-Gehalt der Typ-II-Pneumozyten stieg in den Gruppen OVA/OVA und nOVA/nOVA im Vergleich zur Kontrolle PBS/nOVA an ($100 \pm 31,92$ % PBS/nOVA vs. $176,86 \pm 23,18$ % OVA/OVA vs. $136,89 \pm 20,27$ % nOVA/nOVA). Ein weiterer Anstieg fand sich in der Gruppe nKLH/nKLH gegenüber PBS/nKLH ($75,23 \pm 7,88$ % PBS/nKLH vs. $122,56 \pm 32,27$ % nKLH/nKLH). Die CK beta-mRNA-Expressionen der Gruppen nOVA/KLH und nOVA/nKLH waren untereinander recht homogen, gegenüber der Kontrolle PBS/nKLH aber deutlich erhöht ($163,25 \pm 41,63$ % nOVA/KLH vs. $172,51 \pm 36,69$ % nOVA/nKLH) (s. Abbildung 15).

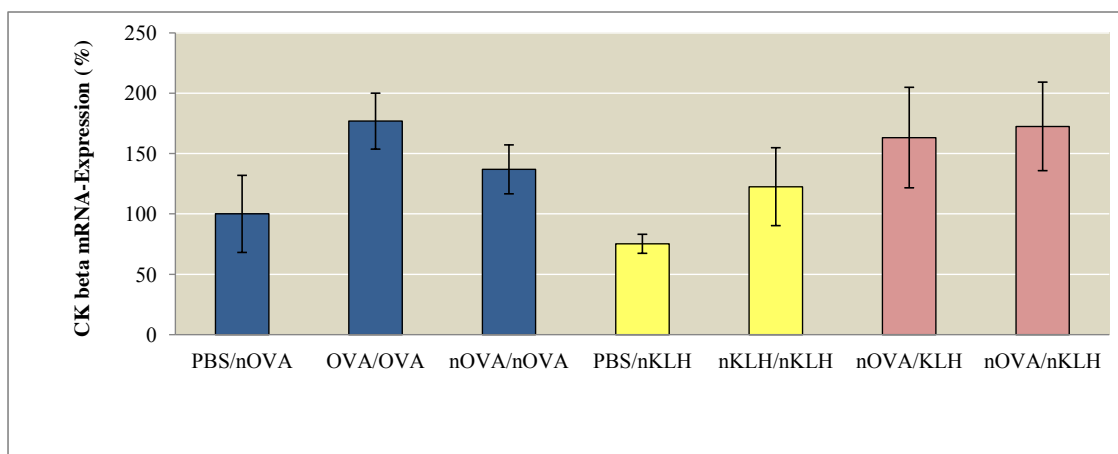


Abbildung 15: Real-time RT-PCR der Cholinkinase beta in Typ-II-Pneumozyten

Die ermittelten $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte der PBS/nOVA-Gruppe wurden gleich 100 % gesetzt und die Werte der anderen Gruppen entsprechend berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM in Prozent. $n = 3-4$. Aufgrund der fehlenden statistischen Signifikanz im globalen Vergleich der Gruppen wurde auf die Durchführung des Mann-Whitney-Tests verzichtet.

3.6. Immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen zu Superoxiddismutasen als Enzyme der antioxidativen Abwehr

3.6.1. Enzymaktivität der Gesamt-SOD im Plasma

Die Lunge ist in besonderem Maße oxidativem Stress ausgesetzt, was zum einen auf die aerobe Lebensweise des Organismus, zum anderen auf die mit vielen Lungenerkrankungen einhergehende Entzündung zurückzuführen ist. Um angemessen auf diesen Stressor reagieren zu können, hat die Lunge ein komplexes System an Antioxidantien entwickelt, unter denen die Superoxiddismutasen eine wichtige Rolle einnehmen. Die folgenden Unterkapitel beschäftigen sich mit möglichen Auswirkungen von allergischer Entzündung auf diese Antioxidantiengruppe. Zur Untersuchung der SOD-Aktivität in der systemischen Zirkulation wurde die Gesamt-SOD-Aktivität im Plasma bestimmt. Dazu ließ sich mit Hilfe des OxiSelect™ Superoxide Dismutase Activity Assay Kits mit Hilfe eines Xanthine/Xanthineoxidase Systems für jede Probe eine Inhibierungsrate für Superoxidanionen ermitteln, welche mit der Höhe der jeweiligen SOD-Aktivität korrelierte.

Die Messung der SOD-Aktivität im globalen statistischen Vergleich mittels Kruskal-Wallis Test ergab keine signifikanten intergruppalen Unterschiede ($p = 0,141$). Daher wurde auf eine Zweieranalyse verzichtet.

Insgesamt zeigte sich ein recht homogenes Bild mit geringfügigen Schwankungen (s. Abbildung 16). Die Gesamt-SOD Aktivität der Gruppen OVA/OVA und nOVA/nOVA war im Gegensatz zur Kontrolle PBS/nOVA minimal erhöht ($31,29 \pm 1,57$ % PBS/nOVA vs. $34,11 \pm 2,70$ % OVA/OVA vs. $37,07 \pm 0,72$ % nOVA/nOVA). Und auch die Vergleiche von PBS/nKLH mit nKLH/nKLH und nOVA/KLH mit nOVA/nKLH zeigten für alle Gruppen annähernd gleiche Aktivitäts-Werte ($31,72 \pm 0,60$ % PBS/nKLH vs. $29,67 \pm 1,95$ % nKLH/nKLH vs. $33,38 \pm 1,55$ % nOVA/KLH vs. $33,70 \pm 1,67$ % nOVA/nKLH).

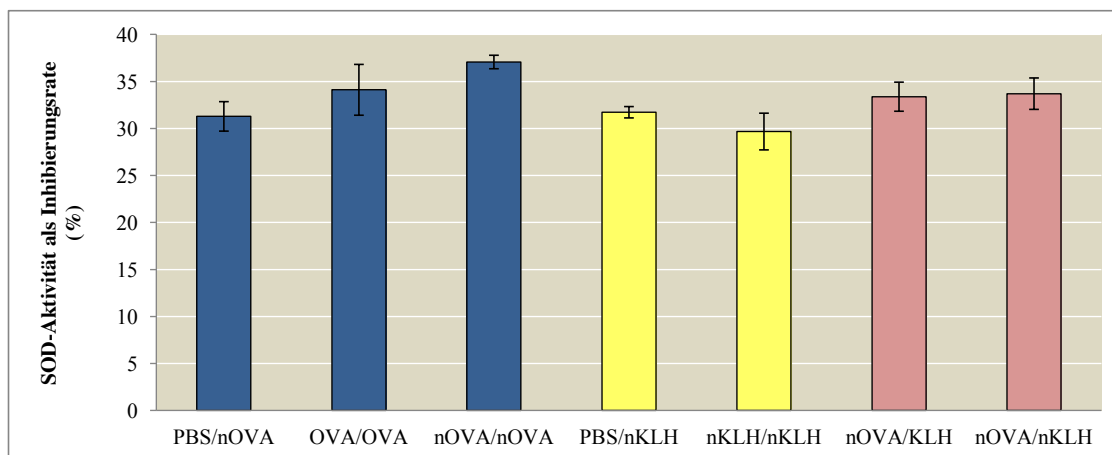


Abbildung 16: Gesamt-SOD-Aktivität im Plasma

Die Werte sind angegeben als Inhibierungsrate von Superoxidanionen in Prozent. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. $n = 3-5$. Aufgrund der fehlenden statistischen Signifikanz im globalen Vergleich der Gruppen wurde auf die Durchführung des Mann-Whitney-Tests verzichtet.

3.6.2. Immunhistochemischer Nachweis der Kupfer-Zink-SOD

Immunhistochemisch wurden unter Verwendung verschiedener Antikörper die Unterformen der Superoxiddismutasen markiert. Mittels dieser Spezialfärbung konnte die CuZnSOD in allen Präparaten sowohl in den Atemwegen als auch in der alveolären Region nachgewiesen werden. Die glatte Muskulatur zeigte nur eine sehr geringe Anreicherung und auch das Gefäßendothel blieb weitgehend negativ.

Es fand sich bei allen Präparaten eine beträchtliche Konzentration an CuZnSOD in den bronchiolären Epithelzellen, was an einer intensiven Rotfärbung erkennbar war. Dabei wirkte die Farbintensität bei den Kontrollgruppen PBS/nOVA und PBS/nKLH intensiver als bei den OVA/OVA und nOVA/nOVA-Gruppen.

Bei allen Gruppen fanden sich auch peripher intraseptal und intraluminal einzelne Zellen positiv markiert. Im Vergleich der Gruppen untereinander schienen die Septen der Kontrollgruppen etwas stärker positiv markiert als die der (n)OVA-Gruppen. Umgekehrt fanden sich analog der starken Infiltration mit Entzündungszellen intraluminal mehr positive Zellen in den (n)OVA-Gruppen als in den Kontrollen. Im Vergleich der Gruppen OVA/OVA und nOVA/nOVA ließ sich optisch kein bedeutsamer Unterschied erkennen. In der Gruppe nKLH/nKLH zeigten die bronchiolären Epithelzellen und alveolären Septen eine deutlich schwächere Färbung als bei den

Kontrollen. Andererseits fanden sich analog der (n)OVA-Gruppen viele positive Zellen intraluminal. Bei Betrachtung der Gruppen nOVA/KLH und nOVA/nKLH waren diese eher in die Kategorie der Kontrollen einzuordnen. So zeigten vor allem die bronchiolaren Epithelzellen ein stark positives CuZnSOD-Reaktionsprodukt (s. Abbildungen 17a und 17b).

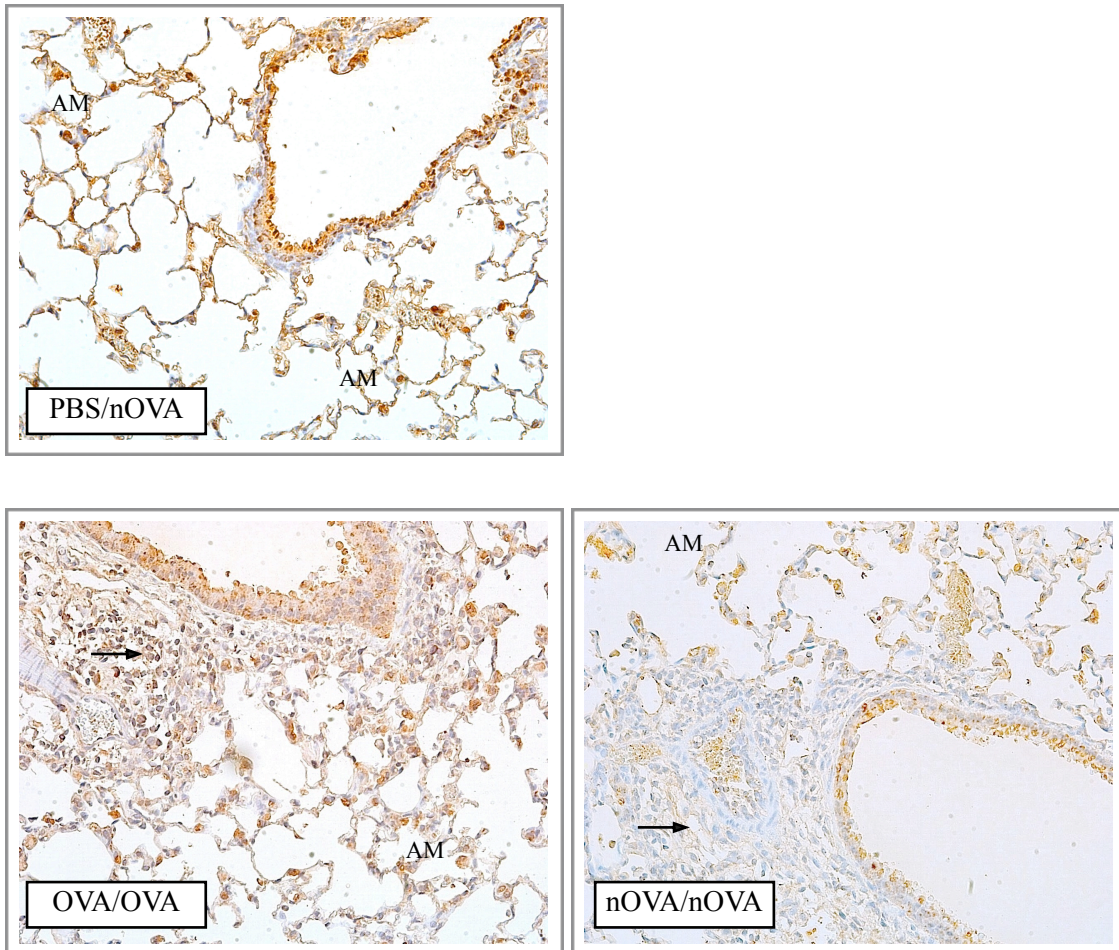


Abbildung 17a: Immunhistochemische Detektion der CuZnSOD in repräsentativen Lungen-Paraffinschnitten der OVA-Gruppen

24 h nach der letzten Allergenprovokation wurden die Lungen *in toto* entnommen, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach dem Schneiden mit dem Mikrotom in ca. 2 μ m dicke Schnitte erfolgte die immunhistochemische Färbung mit Hilfe des Histostain®-SP Kits unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen die CuZnSOD. Die Auswertung erfolgte nach optischem Eindruck.

Pfeil = leukozytäres Infiltrat, AM = Alveolarmakrophage
 [Immunhistochemische Färbung, 200fache Vergrößerung]

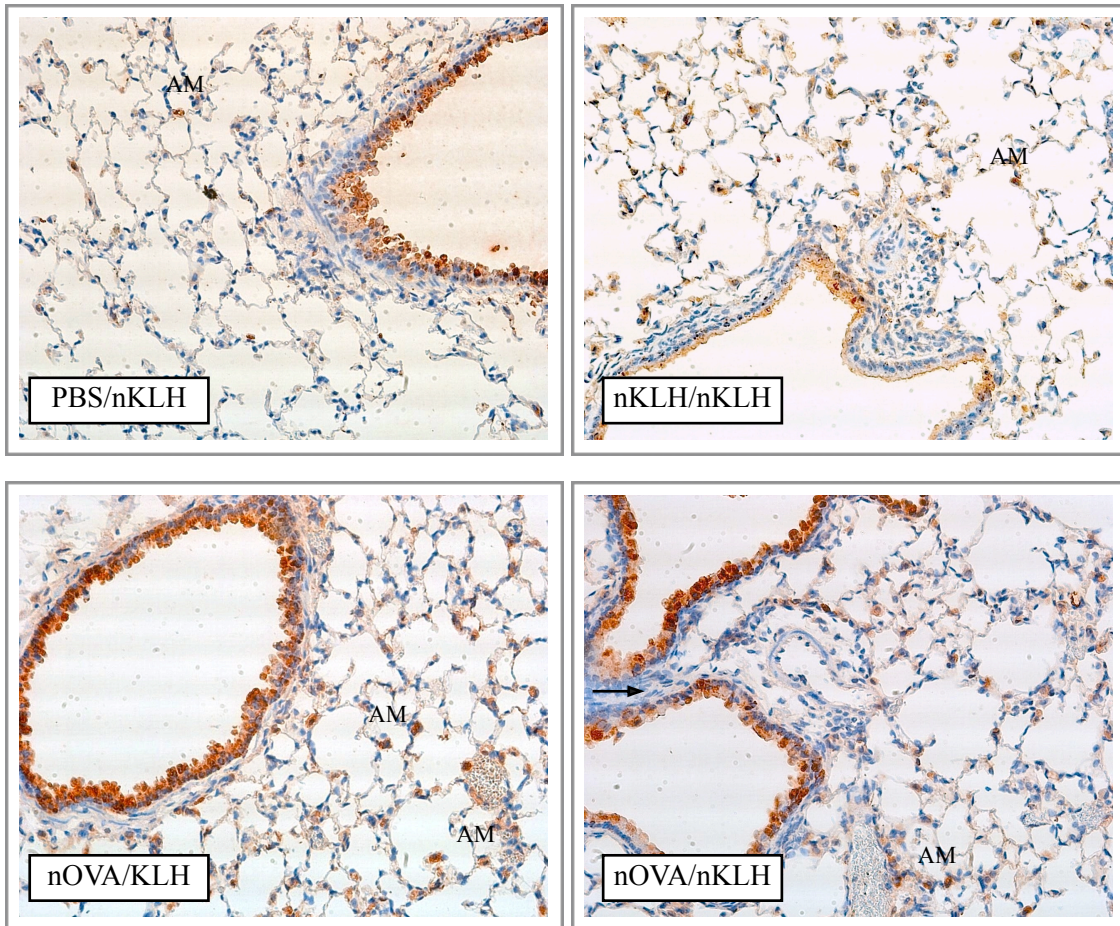


Abbildung 17b: Immunhistochemische Detektion der CuZnSOD in repräsentativen Lungen-Paraffinschnitten der KLH-Gruppen

24 h nach der letzten Allergenprovokation wurden die Lungen *in toto* entnommen, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach dem Schneiden mit dem Mikrotom in ca. 2 μm dicke Schnitte erfolgte die immunhistochemische Färbung mit Hilfe des Histostain®-SP Kits unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen die CuZnSOD. Die Auswertung erfolgte nach optischem Eindruck.

Pfeil = leukozytäres Infiltrat, AM = Alveolarmakrophage

[Immunhistochemische Färbung, 200fache Vergrößerung]

3.6.3. mRNA-Expression der Kupfer-Zink-SOD in Typ-II-Pneumozyten

Um die Auswirkungen der allergischen Entzündung und die Verwendung nitrierter Allergene auf die zelluläre Genexpression von Antioxidantien zu untersuchen, wurde die mRNA der SOD-Unterformen mittels Real-time RT-PCR bestimmt.

Im globalen statistischen Vergleich mittels Kruskal-Wallis Test zeigte sich hinsichtlich der CuZnSOD-mRNA-Expression ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen ($p = 0,003$).

Der lokale Vergleich mittels Mann-Whitney-Test erbrachte eine deutliche Reduktion der CuZnSOD-mRNA zwischen der Kontrollgruppe PBS/nOVA und OVA/OVA ($100 \pm 4,93$ % PBS/nOVA vs. $48,27 \pm 3,21$ % OVA/OVA, $p = 0,057$), die zwischen PBS/nOVA und nOVA/nOVA signifikant wurde ($100 \pm 4,93$ % PBS/nOVA vs. $49,31 \pm 1,6$ % nOVA/nOVA, $p = 0,029$). Der Vergleich der Gruppen PBS/nKLH und nKLH/nKLH zeigte eine geringe, nicht signifikante mRNA-Reduktion ($123,23 \pm 10,37$ % PBS/nKLH vs. $95,29 \pm 4,43$ % nKLH/nKLH), während sich zwischen den Gruppen nOVA/KLH und nOVA/nKLH keine Unterschiede fanden ($124,75 \pm 31,62$ % nOVA/KLH vs. $125,65 \pm 8,39$ % nOVA/nKLH).

Bei gleichzeitiger Betrachtung aller Gruppen war auffällig, dass die CuZnSOD-mRNA-Spiegel in den mit (n)KLH behandelten Tieren insgesamt höher waren als in den drei OVA-Gruppen (PBS/nOVA, OVA/OVA und nOVA/nOVA) (s. Abbildung 18).

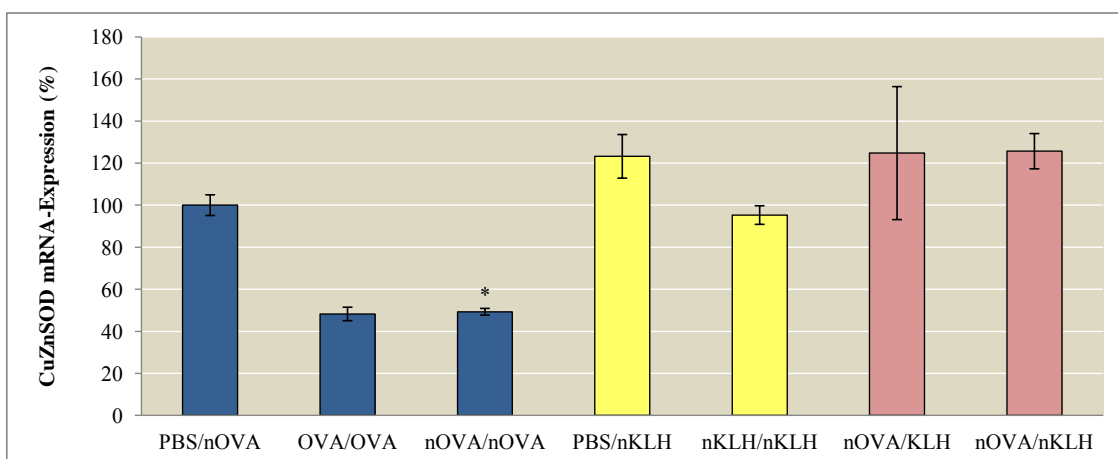


Abbildung 18: Real-time RT-PCR der CuZnSOD in Typ-II-Pneumozyten

Die ermittelten $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte der PBS/nOVA-Gruppe wurden jeweils gleich 100 % gesetzt und die Werte der anderen Gruppen entsprechend umgerechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM in Prozent.

$n = 3-4$. * $p < 0,05$

3.6.4. Immunhistochemischer Nachweis der Mangan-SOD

In der immunhistochemischen Untersuchung der MnSOD konnte in allen angefärbten Lungenpräparaten eine MnSOD-Expression nachgewiesen werden. Diese Expressionen waren jedoch nicht homogen, sondern unterschieden sich intergruppal sowohl in der vorherrschenden Lokalisation als auch im Ausprägungsgrad. Bei genauerer Betrachtung erschien das Muster der Anfärbung eher granulär, was auf die mitochondriale Lokalisation der MnSOD innerhalb der Zellen zurückzuführen ist (Chang et al. 1995).

Die beiden Kontrollgruppen PBS/nOVA und PBS/nKLH lieferten ein vergleichbares Bild. In diesen Präparaten zeigten vor allem die Epithelzellen der Bronchiolen eine intensive Rotfärbung. Ebenso konnte eine Rotfärbung schwächerer Ausprägung in der glatten Muskulatur der Bronchiolen sowie in den Wänden der größeren Lungengefäße nachgewiesen werden. In der Lungenperipherie fanden sich nur vereinzelt Anfärbungen von Zellen des Septum intraalveolare. Das Bronchiolarepithel der Gruppen OVA/OVA und nOVA/nOVA zeigte eine geringere Immunfärbung als das der Kontrollen. Andererseits fand sich intraalveolär eine deutlich stärkere Färbung der MnSOD, korrelierend mit der erhöhten Anzahl intraalveolärer Zellen. Im Vergleich der Gruppen OVA/OVA und nOVA/nOVA fanden sich optisch keine Unterschiede hinsichtlich des MnSOD-Reaktionsproduktes. Die Versuchsgruppe nKLH/nKLH exprimierte MnSOD sowohl in den bronchiolaren Epithelzellen, septal als auch in intraalveolären Zellen. Die Gruppen nOVA/KLH und nOVA/nKLH ähnelten bezüglich ihrer immunhistochemischen Reaktion eher dem Bild der Kontrollen. Neben einer intensiven Anfärbung der bronchiolaren Epithelzellen fanden sich nur vereinzelt angefärbte Zellen im Bereich der alveolären Septen (s. Abbildungen 19a und 19b).

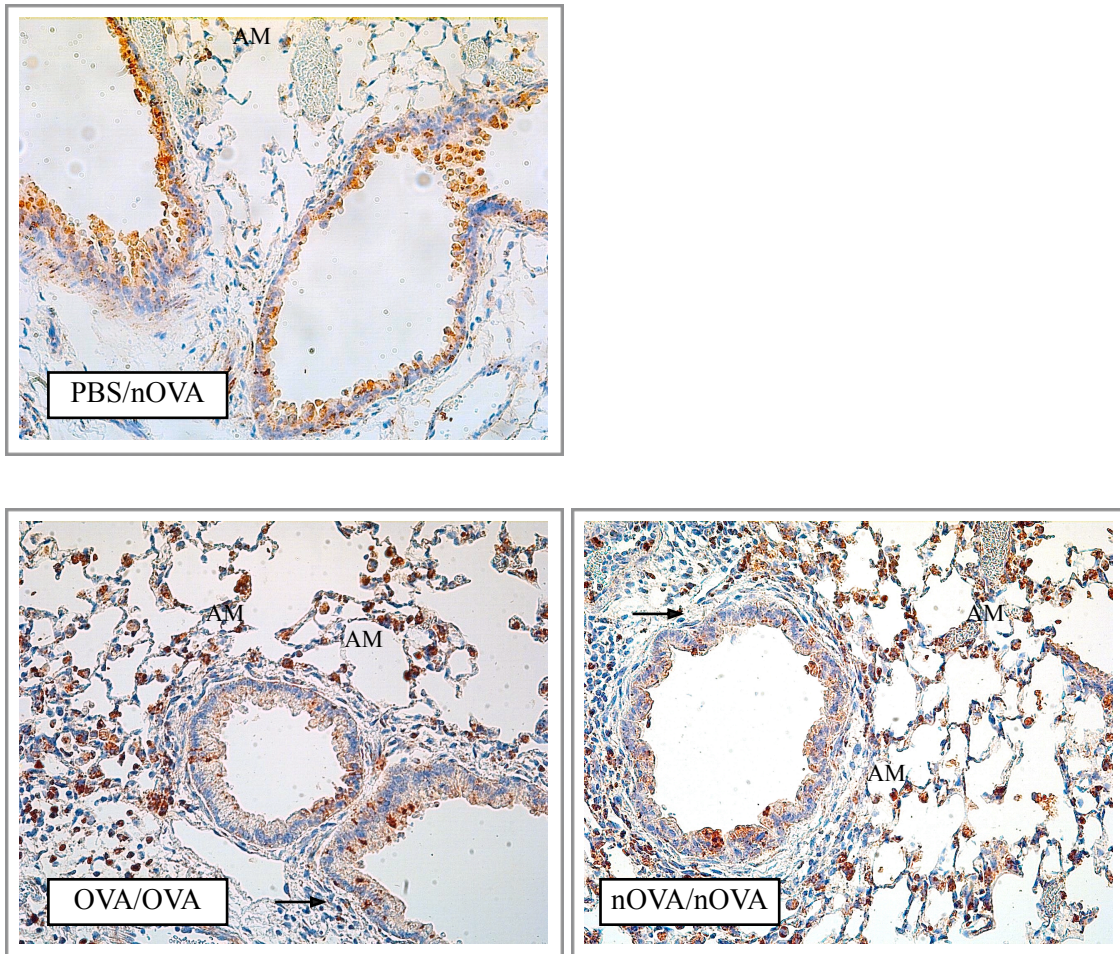


Abbildung 19a: Immunhistochemische Detektion der MnSOD in repräsentativen Lungen-Paraffinschnitten der OVA-Gruppen

24 h nach der letzten Allergenprovokation wurden die Lungen *in toto* entnommen, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach dem Schneiden mit dem Mikrotom in ca. 2 μm dicke Scheiben erfolgte die immunhistochemische Färbung mit Hilfe des Histostain®-SP Kits unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen die MnSOD. Die Auswertung erfolgte nach optischem Eindruck.

Pfeil = leukozytäres Infiltrat, AM = Alveolarmakrophage

[Immunhistochemische Färbung, 200fache Vergrößerung]

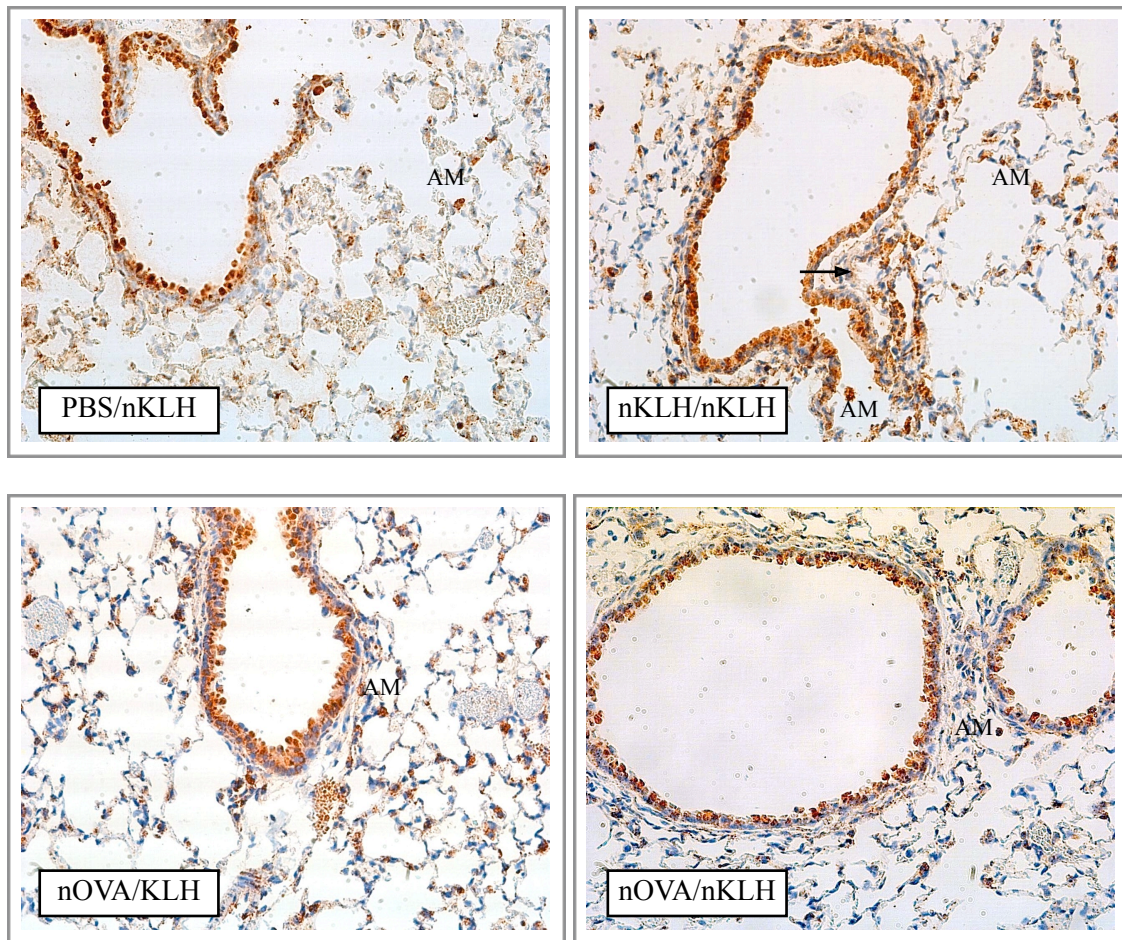


Abbildung 19b: Immunhistochemische Detektion der MnSOD in repräsentativen Lungen-Paraffinschnitten der KLH-Gruppen

24 h nach der letzten Allergenprovokation wurden die Lungen *in toto* entnommen, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach dem Schneiden mit dem Mikrotom in ca. 2 μ m dicke Scheiben erfolgte die immunhistochemische Färbung mit Hilfe des Histostain®-SP Kits unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen die MnSOD. Die Auswertung erfolgte nach optischem Eindruck.

Pfeil = leukozytäres Infiltrat, AM = Alveolarmakrophage

[Immunhistochemische Färbung, 200fache Vergrößerung]

3.6.5. mRNA-Expression der Mangan-SOD in Typ-II-Pneumozyten

Als globaler statistischer Vergleich zeigte sich mittels des Kruskal-Wallis-Tests hinsichtlich der MnSOD-mRNA-Expression ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen ($p = 0,025$).

In den Zweiervergleichen zeigte sich eine nicht signifikante Reduktion der mRNA-Expression in den Gruppen OVA/OVA und nOVA/nOVA gegenüber der Kontrolle PBS/nOVA ($100 \pm 13,92$ % PBS/nOVA vs. $40,38 \pm 10,38$ % OVA/OVA vs. $49,34 \pm 9,55$ % nOVA/nOVA). Weiterhin war der mRNA-Spiegel der nKLH/nKLH-Tiere gegenüber dem der Kontrolltiere PBS/nKLH deutlich vermindert ($87,74 \pm 9,05$ % PBS/nKLH vs. $45,09 \pm 8,94$ % nKLH/nKLH, $p = 0,1$). Eine mRNA-Reduktion von nOVA/KLH zu nOVA/nKLH war deutlich, wurde aber ebenfalls nicht signifikant ($107,18 \pm 4,11$ % nOVA/KLH vs. $71,54 \pm 7,48$ % nOVA/nKLH, $p = 0,057$) (s. Abbildung 20).

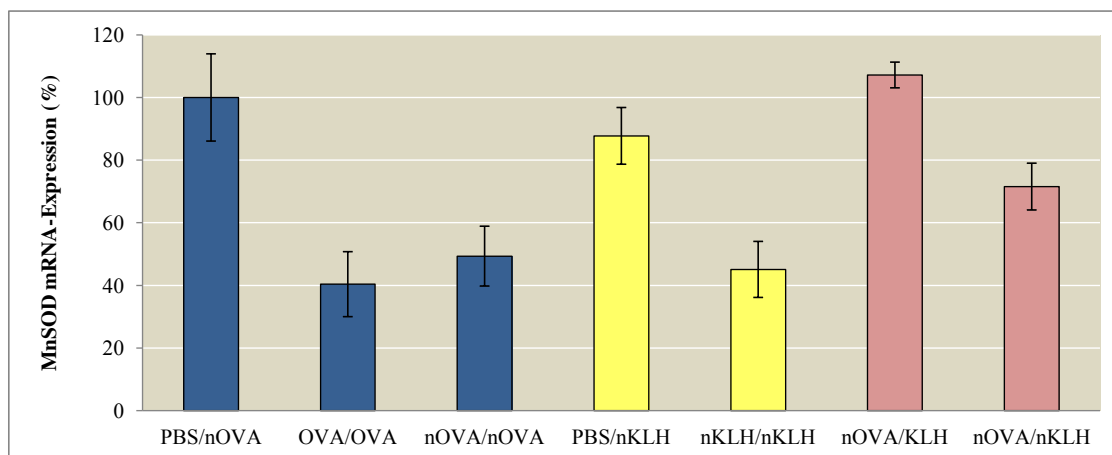


Abbildung 20: Real-time RT-PCR der MnSOD in Typ-II-Pneumozyten

Die ermittelten $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte der PBS/nOVA-Gruppe wurden jeweils gleich 100 % gesetzt und die Werte der anderen Gruppen entsprechend umgerechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM in Prozent.

$n = 3-4$

3.6.6. Proteinexpression der Mangan-SOD in Typ-II-Pneumozyten

Welchen Einfluss allergische Entzündung und die Verwendung nitrierter Allergene auf die Proteinexpression von MnSOD in Typ-II-Pneumozyten hat, wurde mittels Western Blot und anschließender Immunodetektion unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen MnSOD-Protein untersucht. Als interner Standard zur Normalisierung der Signale wurde β -Aktin in einer 2. Antikörperreaktion verwendet.

Pro Blot wurden jeweils zwei Versuchsgruppen miteinander verglichen. Aufgrund der zum Teil geringen Tierzahlen wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet und nur eine deskriptive Analyse durchgeführt. Daher sind die Daten der Zweiervergleiche nicht als absolute Zahlen, sondern eher als Trend zu verstehen. Die Immunodetektion zeigte jeweils eine spezifische Bande bei ca. 24 kDA für MnSOD und ca. 42 kDA für β -Aktin. Die Volumenquantifizierung der Banden erfolgte mit der E.A.S.Y Win32 Software von Herolab. Pro Membran wurde das Volumen der Kontroll-/Referenzgruppe gleich 100 % gesetzt und das Volumen der anderen Gruppe entsprechend prozentual umgerechnet.

Vergleich der Gruppen PBS/nOVA und nOVA/nOVA

Im Vergleich von PBS/nOVA und nOVA/nOVA fanden sich in der Kontrollgruppe PBS/nOVA stärkere Bandensignale als in der nOVA/nOVA-Gruppe, was mit einer höheren MnSOD-Proteinexpression korrelierte. Die quantitative Analyse der Bandenvolumina ergab einen Mittelwert von $100 \pm 9,54$ % für PBS/nOVA vs. $29,40 \pm 10,56$ % für nOVA/nOVA (s. Abbildung 21).

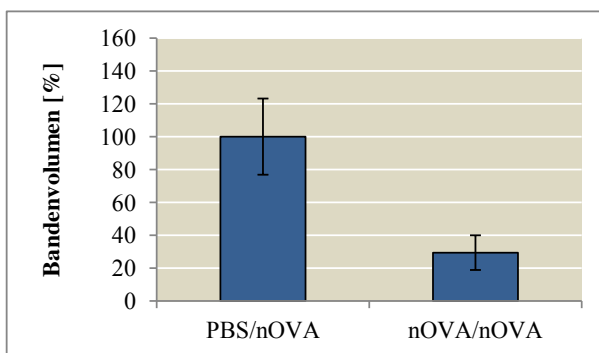
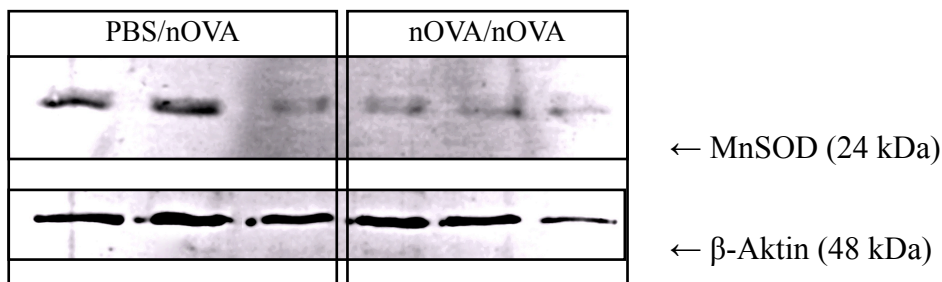


Abbildung 21: Western Blot der MnSOD in Typ-II-Pneumozyten. Vergleich der Gruppen PBS/nOVA und nOVA/nOVA.

Vergleich der Gruppen PBS/nOVA und nOVA/nOVA hinsichtlich ihrer MnSOD-Proteinexpression. Die Bandenquantifizierung erfolgte mit der E.A.S.Y Win32 Software von Herolab. Das Volumen der Kontrollgruppe wurde gleich 100 % gesetzt und das Volumen der anderen Gruppe entsprechend prozentual umgerechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM in Prozent. Auf eine statistische Auswertung wurde aufgrund der geringen Gruppengröße verzichtet. $n = 3$

Vergleich der Gruppen PBS/nKLH und nKLH/nKLH

Im Vergleich von PBS/nKLH und nKLH/nKLH fanden sich in der Kontrollgruppe PBS/nKLH stärkere Bandensignale als in der nKLH/nKLH-Gruppe, was mit einer höheren MnSOD-Proteinexpression korrelierte. Die quantitative Analyse der Bandenvolumina ergab einen Mittelwert von $100 \pm 30,77$ % für PBS/nKLH vs. $67,70 \pm 48,70$ % für nKLH/nKLH (s. Abbildung 22).

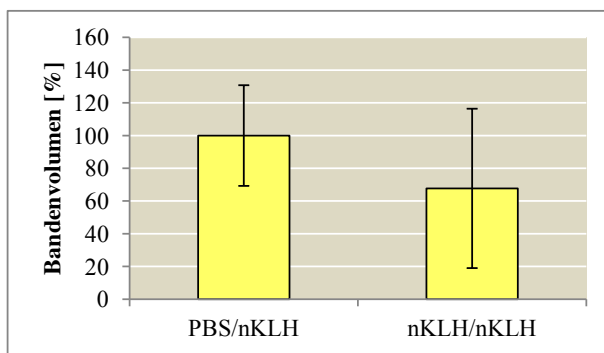
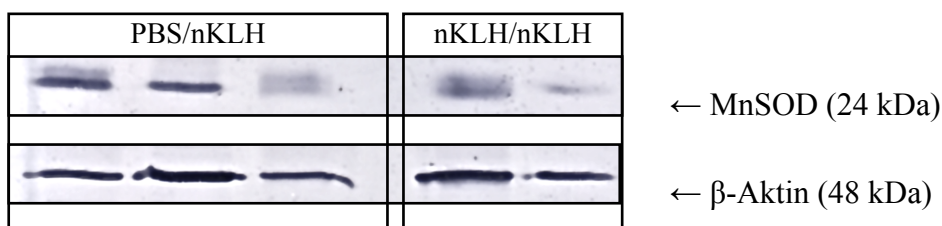


Abbildung 22: Western Blot der MnSOD in Typ-II-Pneumozyten. Vergleich der Gruppen PBS/nKLH und nKLH/nKLH.

Vergleich der Gruppen PBS/nKLH und nKLH/nKLH hinsichtlich ihrer MnSOD-Proteinexpression. Die Bandenquantifizierung erfolgte mit der E.A.S.Y Win32 Software von Herolab. Das Volumen der Kontrollgruppe wurde gleich 100 % gesetzt und das Volumen der anderen Gruppe entsprechend prozentual umgerechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM in Prozent. Auf eine statistische Auswertung wurde aufgrund der geringen Gruppengröße verzichtet. $n = 2-3$

Vergleich der Gruppen nOVA/KLH und nOVA/nKLH

Im Vergleich von nOVA/KLH und nOVA/nKLH fanden sich in der Gruppe nOVA/KLH stärkere Bandensignale als in der nOVA/nKLH-Gruppe, was mit einer höheren MnSOD-Proteinexpression korrelierte. Die quantitative Analyse der Bandenvolumina ergab einen Mittelwert von $100 \pm 51,52$ % für nOVA/KLH vs. $54,66 \pm 10,61$ % für nOVA/nKLH (s. Abbildung 23).

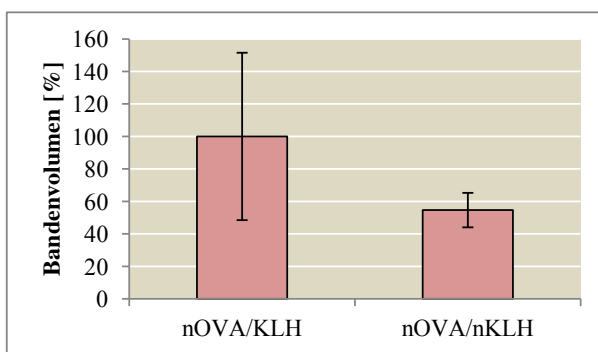
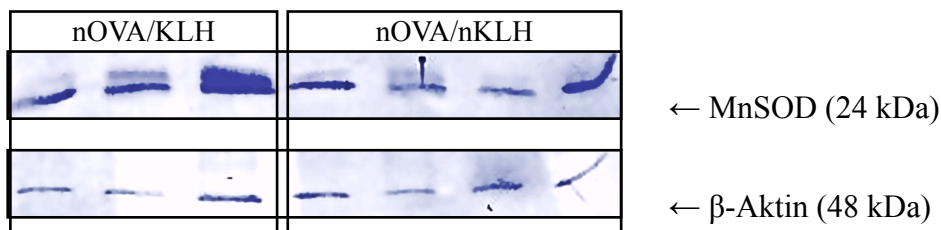


Abbildung 23: Western Blot der MnSOD in Typ-II-Pneumozyten. Vergleich der Gruppen nOVA/KLH und nOVA/nKLH.

Vergleich der Gruppen nOVA/KLH und nOVA/nKLH hinsichtlich ihrer MnSOD-Proteinexpression. Die Bandenquantifizierung erfolgte mit der E.A.S.Y Win32 Software von Herolab. Das Volumen der Referenzgruppe wurde gleich 100 % gesetzt und das Volumen der anderen Gruppe entsprechend prozentual umgerechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM in Prozent. Auf eine statistische Auswertung wurde aufgrund der geringen Gruppengröße verzichtet. $n = 3-4$

Vergleich der Gruppen nOVA/nKLH und nOVA/nOVA

Im Vergleich von nOVA/nKLH und nOVA/nOVA fanden sich in der Gruppe nOVA/nKLH stärkere Bandensignale als in der nOVA/nOVA-Gruppe, was mit einer höheren MnSOD-Proteinexpression korrelierte. Die quantitative Analyse der Bandenvolumina ergab einen Mittelwert von $100 \pm 15,08$ % für nOVA/nKLH vs. $16,20 \pm 2,47$ % für nOVA/nOVA. (s. Abbildung 24)

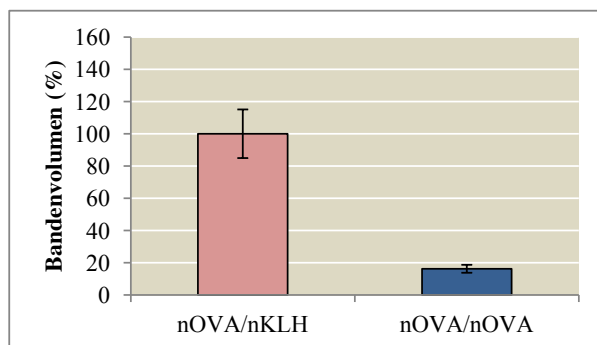
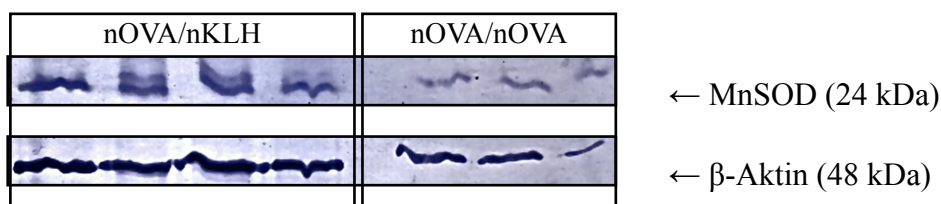


Abbildung 24: Western Blot der MnSOD in Typ-II-Pneumozyten. Vergleich der Gruppen nOVA/nKLH und nOVA/nOVA.

Vergleich der Gruppen nOVA/nKLH und nOVA/nOVA hinsichtlich ihrer MnSOD-Proteinexpression. Die Bandenquantifizierung erfolgte mit der E.A.S.Y Win32 Software von Herolab. Das Volumen der Referenzgruppe wurde gleich 100 % gesetzt und das Volumen der anderen Gruppe entsprechend prozentual umgerechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM in Prozent. Auf eine statistische Auswertung wurde aufgrund der geringen Gruppengröße verzichtet. $n = 3-4$

3.6.7. mRNA-Expression der extrazellulären SOD in Typ-II-Pneumozyten

Für die ECSOD-mRNA-Expression zeigte sich im globalen statistischen Vergleich mittels Kruskal-Wallis Test kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen ($p = 0,582$). Aus diesem Grunde wurden keine Zweiervergleiche angeschlossen. Trotzdem ließen sich in Abbildung 25 einige Trends erkennen. Die mRNA-Expression von nOVA/nOVA war gegenüber PBS/nOVA vermindert, wohingegen der OVA/OVA-Mittelwert aufgrund der großen SEM nicht genau einzuordnen war ($100 \pm 5,62$ % PBS/nOVA vs. $101,71 \pm 35,06$ % OVA/OVA vs. $76,44 \pm 11,01$ % nOVA/nOVA). Die Gruppen nKLH/nKLH, nOVA/KLH und nOVA/nKLH zeigten annähernd äquivalente mRNA-Spiegel, die gegenüber der Kontrolle PBS/nKLH leicht erhöht waren ($132,25 \pm 27,64$ % PBS/nKLH vs. $154,67 \pm 41,49$ % nKLH/nKLH vs. $151,39 \pm 33,07$ % nOVA/KLH vs. $159,13 \pm 25,28$ % nOVA/nKLH). Analog der CuZnSOD-mRNA-Expression war hinsichtlich des globalen Gruppenvergleichs bemerkenswert, dass die mit (n)KLH behandelten Tiere insgesamt höhere Spiegel an ECSOD-mRNA exprimierten als die Tiere der drei OVA-Gruppen (PBS/nOVA, OVA/OVA und nOVA/nOVA).

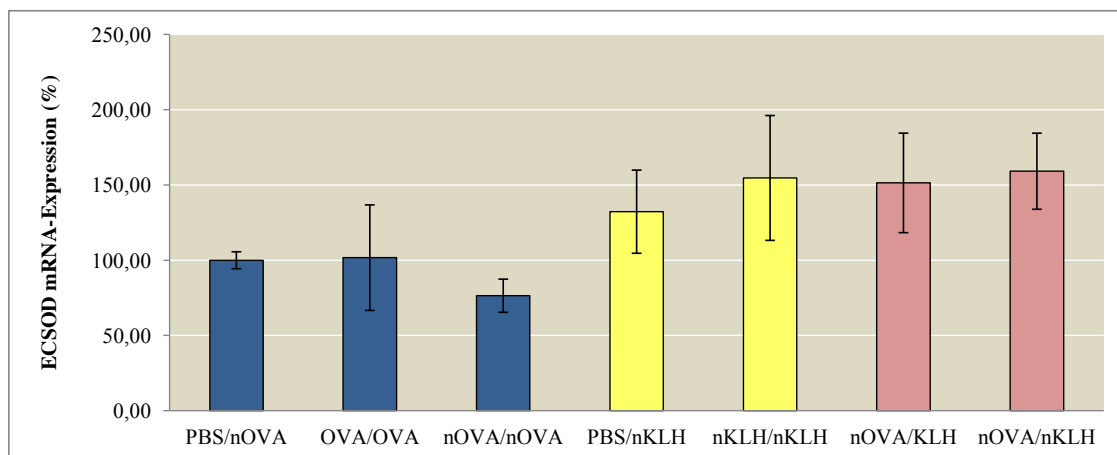


Abbildung 25: Real-time RT-PCR der ECSOD in Typ-II-Pneumozyten

Die ermittelten $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte der PBS/nOVA-Gruppe wurden gleich 100 % gesetzt und die Werte der anderen Gruppen entsprechend umgerechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM in Prozent.

$n = 3-4$. Aufgrund der fehlenden statistischen Signifikanz im globalen Vergleich der Gruppen wurde auf die Durchführung des Mann-Whitney-Tests verzichtet.

3.7. Ergebniszusammenfassung der zusätzlichen Gruppen PBS/OVA, PBS/KLH, OVA/nOVA, OVA/KLH, nKLH/OVA

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zu den sieben bereits bekannten Gruppen noch Daten von fünf weiteren Gruppen erhoben, auf die aus Gründen der Übersichtlichkeit im allgemeinen Ergebnisteil nicht eingegangen werden kann. Da diese Gruppen aber zusätzliche Hinweise über den Einfluss nitrierter Substanzen auf die allergische Entzündung liefern, findet sich eine kurze Ergebniszusammenfassungen an dieser Stelle und eine Interpretation der Ergebnisse am Ende des Diskussionsteils. Die dieser Zusammenfassung zugrundeliegenden deskriptiven Daten (Mittelwerte \pm Standardabweichung und SEM bzw. Median, oberes und unteres Quartil, minimaler und maximaler Wert) sind in Tabellenform im Anhang aufgelistet (s. Weiterführende Tabellen im Anhang).

Die Gruppe PBS/OVA wurde hinsichtlich ihrer Lungenfunktion, Lungenhistologie, BAL-Zytologie, Gesamtproteine und Gesamtphospholipide untersucht. Insgesamt stimmten ihre Ergebnisse mit den erhobenen Befunden der PBS/nOVA-Kontrollgruppe überein. Ebenso verhielt es sich mit den Gruppen PBS/KLH und PBS/nKLH, deren Vergleich in den oben genannten Parametern sehr homogene Ergebnisse zeigte.

Mit der Gruppe OVA/nOVA wurden alle Versuche inklusive der Untersuchung der Typ-II-Pneumozyten durchgeführt. Die dabei erhobenen Befunde glichen sehr stark den Befunden der OVA/OVA-Gruppe.

Im Vergleich der Gruppen OVA/KLH und nOVA/KLH zeigten sich in den Ergebnissen der Lungenfunktion, Lungenhistologie, BAL-Zytologie, Gesamtprotein- und Gesamtphospholipidbestimmungen nur sehr geringe Unterschiede zwischen den Gruppen. Auch die Ergebnisse der nKLH/OVA-Gruppe entsprachen weitgehend den erhobenen Befunden der Gruppen OVA/KLH und nOVA/KLH.

4. Diskussion

Die Lunge steht während des Atmungsprozesses in ständigem direktem Kontakt mit der Atmosphäre und stellt aufgrund ihrer enormen Oberfläche einen Hauptangriffspunkt für oxidative Schäden dar. Dabei sind die Lungenzellen nicht nur einem hohen lokalen Sauerstoffpartialdruck, sondern auch verschiedenen Luftschadstoffen in Form von Pollen, Dieselabgasen, Zigarettenrauch, Ozon und Stickstoffdioxid (NO₂) ausgesetzt. Zur Erforschung dieser Luftschadstoffe wurden zahlreiche epidemiologische Untersuchungen sowie Expositionsstudien an Menschen und Tieren durchgeführt. In diesem Zusammenhang verdeutlichen viele Studien den schädigenden Einfluss des atmosphärischen Luftschadstoffs NO₂ auf die Lunge. NO₂ gilt als Hauptoxidans wegen seiner hohen Reaktivität mit Epithelien und Proteinen als besonders gefährlich. Neben Änderungen von Lungenstruktur und Zellmetabolismus führte eine NO₂-Inhalation im Tiermodell bei bestehender Sensibilisierung gegen OVA zu einer Verstärkung der allergischen Symptomatik (Bevelander et al. 2007, Poynter et al. 2006). Eine mögliche Begründung dieser Beobachtung lieferten Franze et al. (Franze et al. 2005). Die Studie beschreibt die Fähigkeit von NO₂, das Birkenpollenallergen Bet V 1-A effizient zu nitrieren. Die gleiche Studie fand in ultrafeinen Stäuben von Ballungsgebieten nitrierte Proteine, wobei der Grad der Nitrierung mit der für Sommersmog typischen Konzentration von Stickoxiden und Ozon korrelierte. Experimente mit transgenen und sensibilisierten BALB/C-Mäusen zeigten, dass aus diesen Tieren isolierte und kultivierte Milzzellen nach Stimulation mit in vitro nitriertem OVA eine höhere Proliferationsrate und Zytokinsekretion aufwiesen als nach Stimulation mit dem unmodifizierten Allergen (Gruijthuijsen et al. 2006).

In parallelen Untersuchungen mit nativem und nitriertem Birkenpollenallergen Bet V 1-A zeigten die nitrierten Allergene stärkere Effekte als die nicht nitrierten Formen. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass posttranslationale Proteinmodifikationen die Immunreaktion eines Organismus verstärken und unterstreichen die Vermutung, dass Verkehrsabgase die Zunahme von Allergien fördern. Im Gegensatz zu endogener Nitrierung, wie sie beispielsweise im Rahmen von Entzündung vorkommt, sind exogen nitrierte Proteine Fremdstoffe, auf die ein Organismus mit Abwehrreaktionen reagiert. Da die Lunge in besonderem Maße gegenüber diesen Fremdstoffen exponiert wird, sind Veränderungen von Lungenfunktion, epithelialer Struktur und Funktion sowie der BAL-

Zusammensetzung zu erwarten. Die biochemischen und molekularen Mechanismen, die diesen Veränderungen zugrunde liegen, sind bisher noch weitgehend ungeklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde am Mausmodell des allergischen Asthmas, durch Verwendung zweier Allergene in nativer und nitrierter Form, der Einfluss der Nitrierung von Allergenen auf verschiedene Parameter des allergischen Asthmas untersucht. Dazu wurden C57BL/6-Wildtypiere entsprechend des Protokolls zur Induktion eines akuten allergischen Asthmas behandelt und mit PBS / (n)OVA / (n)KLH sensibilisiert und inhalativ provoziert. Bei einem Teil der Tiere wurde die Atemwegshyperreaktivität gegenüber Methacholin gemessen und die Lungen anschließend histologisch aufgearbeitet. Bei dem anderen Teil der Tiere wurden Plasma und BAL gewonnen und Typ II-Pneumozyten isoliert. Im Plasma wurde die Gesamt-SOD-Aktivität gemessen, mittels Zytospin die BAL-Zytologie ermittelt und aus dem zellfreien Lavage-Überstand Gesamtprotein und Gesamtphospholipid bestimmt. Die isolierten Typ-II-Pneumozyten wurden mittels Real-time RT-PCR hinsichtlich ihres mRNA-Gehalts an Phospholipid-synthetisierenden Enzymen und antioxidativen Enzymen der SOD-Untergruppen untersucht und der Proteingehalt der MnSOD mittels Western Blot bestimmt.

4.1. Lungenfunktionsanalyse

Die Atemwegshyperreaktivität (AHR) gilt als ein Hauptmerkmal des Asthmas und kann in verschiedenen Mausmodellen studiert werden. 24 Stunden nach der letzten Allergenexposition erfolgte die Messung der Atemwegsresistance (als Maß der AHR) mit Hilfe des FlexiVent®Systems gegenüber ansteigenden Dosen von aerosolisiertem Methacholin.

Als Ergebnis fanden sich bei den C57BL/6-Mäusen keine Unterschiede zwischen den mit (n)OVA oder (n)KLH *allergisierten* Tieren und den mit PBS-behandelten Kontrollgruppen. Ebenso konnten nitrierte Substanzen den Ausprägungsgrad der AHR nicht beeinflussen.

Die Gründe, die dieser Beobachtung zugrunde liegen, sind vielfältig. Beispielsweise hat das jeweilige Versuchssetting in Form verschiedener Versuchsprotokolle, Art und Dauer der Allergenexposition sowie Alter und Geschlecht der Mäuse einen großen Einfluss auf die Lungenfunktion. Zahlreiche Studien belegen signifikante Auswirkungen des

genetischen Hintergrundes auf den asthmatischen Phänotyp, so dass der Auswahl des Mausstamms eine besondere Bedeutung zukommt (Zhu and Gilmour 2009, Gueders et al. 2009).

Wegen ihrer Hyporesponsivität gegenüber Methacholin und der oftmals beobachteten niedrigen Level an antigenspezifischem IgE gelten C57BL/6-Mäuse, im Gegensatz zu anderen häufig verwendeten Stämmen wie BALB/c oder A/J, als *Low Responder* gegenüber einer T_H2-dominierten T-Helferzellantwort (Whitehead et al. 2003, Takeda et al. 2001). Welche Rolle T-Helferzellen in der Entwicklung von AHR spielen, erläutern Wills-Karp et al. (Wills-Karp and Ewart 1997).

Sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen gibt es zwei Arten von CD4-positiven-T-Helferzellen, die sich hinsichtlich ihres Zytokinprofils unterscheiden. Während T_H1-Zellen IL-2, IFN- γ und TNF- β produzieren, sind die Hauptzytokine der T_H2-Zellen IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Die T_H2-Zytokine sind für die Immunregulation wichtig und nehmen eine zentrale Rolle in der Entwicklung allergischer Erkrankungen ein. Immunantworten können entweder zu einem T_H1- oder T_H2-Typ polarisieren. Dieser Prozess wird durch die Natur und Dosis des Antigens und dem während des ersten Primens durch ein spezifisches Antigen vorherrschenden Zytokinmilieu beeinflusst.

Verschiedene Mausstämme scheinen eine genetische Prädisposition zu einer T_H1- oder T_H2-Antwort zu besitzen. Diese ist unabhängig von der Art der Provokation und möglicherweise auf ihre hochgradige Inzucht-Natur zurückzuführen. Vor diesem Hintergrund scheinen C57BL/6-Mäuse eher zu einer T_H1-Immunantwort zu tendieren, wohingegen BALB/c-Tiere eher zu einer T_H2-Antwort prädisponieren. Es gibt verschiedene Studien, die die immunpathologische Rolle von T_H2-Zytokinen in der Pathogenese von Allergen-induzierter AHR unterstützen. Beispielsweise fanden sich immer wieder Erhöhungen von T_H2-Zytokinen in den Lungen von humanen Asthmatikern und Allergen-provozierten Mäusen (Kim et al. 2010).

Auch Gueders et al. verglichen die Mausstämme C57BL/6 und BALB/c hinsichtlich ihrer bronchialen Hyperreagibilität und fanden bei den BALB/c-Tieren höhere AHR-Level gegenüber Methacholin (Gueders et al. 2009). Die Autoren brachten diese Beobachtung mit einer unterschiedlichen IL-13-Verteilung in Verbindung, welches als T_H2-Zytokin wichtig für die Entwicklung von AHR nach Allergenexposition sein soll (Leigh et al. 2004). Beispielsweise konnte eine Behandlung mit anti-IL-13-Antikörpern

die Entwicklung einer AHR inhibieren (Yang et al. 2005). Des Weiteren fanden die Autoren im Lungengewebe der BALB/c-Mäuse eine erhöhte Anzahl an Mastzellen, welche sie ebenfalls mit der erhöhten AHR in Verbindung brachten. Sie begründeten den Zusammenhang damit, dass eine Mastzelldegranulation zu einer Mediatorfreisetzung in Form von Histamin, Leukotrienen und TNF- α führe. Diese Mediatoren sollen in der Lage sein, die vaskuläre Permeabilität zu erhöhen, Entzündungszellen zu rekrutieren und direkt mit den Zellen der glatten Muskulatur zu agieren, was zu einer erhöhten AHR beitragen könnte (Bradding, Walls and Holgate 2006).

Einen weiteren Grund für die unterschiedliche Empfänglichkeit für Allergen-induzierte AHR könnte die direkte Beobachtung liefern, dass AHR genetisch beeinflusst wird. Beispielsweise demonstrierten Ackerman et al., unter Verwendung rekombinanter Mäuse mit erhöhter nativer AHR, dass der AHR-Phänotyp mit der Interaktion verschiedener Loci auf Chromosom 2 und 6 assoziiert war (Ackerman et al. 2005).

Diese genetischen Einflüsse könnten sich unter anderem auf den Aufbau der Atemwege auswirken. Durch den Einsatz von in vivo Mikro-CT-Imaging von C57BL/6, A/J und BALB/c-Stämmen fanden Thiesse et al. hinsichtlich der Lungenstruktur signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Thiesse et al. 2010). Beispielsweise zeigten sich einige Atemwegsabschnitte der C57BL/6-Mäuse im Gegensatz zu den anderen zwei Mausstämmen deutlich vergrößert und *ausgebeult*, was die Autoren auf Unterschiede in der Gewebeszusammensetzung (insbesondere der kollagenen Matrix) zurückführten und mit einer verminderten Atemwegsresistance in Verbindung brachten.

Auch Van Hove et al. befassten sich mit der Lungenstruktur von Mäusen und erläuterten den Einfluss der Hyperplasie der glatten Atemwegsmuskulatur (ASM) auf die Zunahme der Resistance (Van Hove et al. 2009). In dieser Studie entwickelten nur die BALB/c-Mäuse nach zweimaliger intraperitonealer OVA-Sensibilisierung und nachfolgender zweiwöchiger Exposition mit OVA-Allergen eine signifikante ASM-Hyperplasie und AHR. Auch andere Untersuchungen belegen in Tiermodellen und humanen Studien eine Verbindung zwischen ASM und AHR, da sowohl AHR als auch erhöhte ASM nach Resolution der Atemwegsentzündung persistieren (Southam et al. 2007). Daneben zeigen mathematische Modelle, dass sich Atemwege mit erhöhtem ASM-Volumen stärker verschließen als Atemwege mit kleinem Volumen (Bossé et al. 2010).

Inwiefern die oben erwähnten genetischen Faktoren einen Einfluss auf die unterschiedliche Atemwegsanatomie haben bleibt unklar. Weiterhin bleibt in unserem Mausmodell unsicher, ob die fehlende Erhöhung der Atemwegsresistance nach Allergenexposition durch eine unterschiedliche Verteilung von Zytokinen und Mastzellen verursacht wurde.

4.2. Lungenhistologie und BAL-Zytologie

Zur morphologischen Untersuchung des Lungengewebes wurden am 29. Tag des Versuchsprotokolls mikrometerdünne und HE-gefärbte Gewebeschnitte hergestellt und mikroskopisch beurteilt. Zur Komplementierung dieser Ergebnisse wurden die BAL-Zellen mittels Zytospin isoliert und zur differentiellen Auszählung nach Pappenheim gefärbt.

Die histologischen Veränderungen zeigten eine entzündliche Reaktion in den unteren Atemwegen, die peribronchiolär und perivaskulär ihre stärkste Ausprägung annahm. Stellenweise bestand ein Übergreifen der Entzündung auf entfernteres Lungengewebe mit mononuklearer und eosinophiler Infiltration des Interstitiums. Diese pathologischen Veränderungen fanden sich in den Gruppen OVA/OVA, nOVA/nOVA, nKLH/nKLH und in geringerer Ausprägung ebenfalls in der Gruppe nOVA/nKLH. Korrelierend mit den histopathologischen Resultaten fanden sich erhöhte Level an Entzündungszellen im BALF von Mäusen der Gruppen OVA/OVA, nOVA/nOVA, nKLH/nKLH und in geringerem Ausmaß auch in der Gruppe nOVA/nKLH. So zeigte sich neben einer deutlicher Prädominanz von eosinophilen Zellen, eine erhöhte Gesamtzellzahl sowie erhöhte Level an Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten. Im Gegensatz dazu zeigten die mit PBS sensibilisierten Kontrollen weder histologisch noch zytologisch eine pathologische Veränderung.

Die Verwendung dergleichen nitrierten Substanzen zur Sensibilisierung und Provokation konnte die entzündliche Reaktion noch verstärken. Dies wurde in den Gruppen nOVA/nOVA und nKLH/nKLH ersichtlich, die sowohl histologisch als auch zytologisch die ausgeprägtesten Veränderungen und höchsten Eosinophilenzahlen aufwiesen.

Die Beobachtung, dass OVA eine allergische Atemwegsentzündung induzieren kann,

stimmt mit den Ergebnissen zahlreicher anderer Studien überein, in denen bei C57BL/6- oder BALB/c-Mäusen durch Sensibilisierung mit OVA/Alum und Provokation mit OVA-Aerosol eine akute allergische Entzündung induziert wurde. In allen Studien zeigten beide Mausstämme gegenüber den jeweiligen Kontrollen sowohl eine peribronchioläre und perivaskuläre zelluläre Inflammation als auch einen signifikanten Influx von eosinophilen Zellen im BALF (Van Hove et al. 2009, Zhu and Gilmour 2009, Gueders et al. 2009).

Die beobachtete Zunahme an histologischen und zytologischen Veränderungen bei der Verwendung von nitriertem OVA im Gegensatz zum nicht nitriertem Allergen bestätigte sich in der Studie von Poynter et al. (Poynter et al. 2006). In dieser Studie wurden C57BL/6-Mäuse mit OVA/Alum intraperitoneal immunisiert, mit aerosolisiertem OVA gechallenged und über 3 Tage mit Raumluft oder 25 ppm NO₂ exponiert. Alle Tiere zeigten histologisch ebenfalls eine peribronchioläre und perivaskuläre Entzündung und eine Prädominanz von eosinophilen Zellen in der Zytologie. Jedoch zeigten die OVA/OVA-Tiere, die zusätzlich mit 25 ppm NO₂ exponiert wurden, eine merkliche Zunahme der terminalen bronchiolären Läsionen und der eosinophilen Entzündung. Bei anderen Studien hatte eine NO₂-Exposition keinen Effekt auf die Eosinophilie oder führte gar zu einer Abnahme der eosinophilen Entzündung. Als ein Beispiel ist die Studie von Proust et al. zu nennen (Proust et al. 2002), bei der OVA sensibilisierte BALB/c-Mäuse kurz vor der intranasalen OVA-Challenge mit Raumluft oder 20 ppm/5 ppm NO₂ exponiert wurden. Im Vergleich zur Exposition mit Raumluft führten 20 ppm NO₂ zu einer erhöhten AHR und Lungenpermeabilität sowie zytologisch zu einer erhöhten Neutrophilenzahl. Hinsichtlich der Eosinophilie war allerdings kein intergruppaler Unterschied zu finden. Bei der Verwendung von 5 ppm NO₂ verzeichneten die Autoren sogar eine Reduktion der Eosinophilenzahl im Vergleich zu luftatmenden Kontrollen. Nach Poynter et al. (Poynter et al. 2006) sollen diese unterschiedlichen Effekte von NO₂ auf die BAL-Zytologie und Lungenhistologie sowohl vom Zeitpunkt der NO₂-Exposition relativ zur OVA-Challenge, der Konzentration und Dauer der NO₂-Inhalation als auch vom genetischen Hintergrund der Mäuse abhängig sein. Unter den atmosphärischen Schadstoffen gilt NO₂ als ein Hauptoxidans, welches in der Lage ist, Tyrosinreste zu nitrieren. Auf diese Weise kann NO₂ die Pathologie der allergisch entzündeten Lunge verstärken (Abello et al. 2009). Natürlich können diese Ergebnisse

nicht ohne Weiteres auf unser Studiendesign übertragen werden. Während unser Studienprotokoll vorsieht, die Tiere mit in vitro nitriertem OVA bzw. KLH zu Sensibilisieren und zu Provozieren, exponieren die *NO₂-Studien* die zuvor allergisierten Tiere in vivo. Dabei ist die tatsächliche NO₂-Konzentration, die das Lungengewebe erreicht, aufgrund der hohen Reaktivität von NO₂ unklar. So können sich zwischen den verschiedenen Versuchsprotokollen innerhalb des Lungengewebes Menge und Muster der Tyrosinnitrierungen unterscheiden, was sich wiederum auf die Ergebnisse auswirkt. Versuche zum Nachweis dieser Tyrosinnitrierungen mit Hilfe von Antikörpern könnten zukünftig Aufschluss über ein solches Verteilungsmuster geben (Franze et al. 2004).

Da hinsichtlich der Auswirkungen von (n)KLH auf die Lungenhistologie und -zytologie noch keine Daten vorliegen, können keine Vergleichsstudien herangezogen werden. Allerdings gilt KLH wie OVA als potentes Immunstimulans, welches sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort aktiviert und die Immunantwort in Richtung einer T_H2-Antwort lenkt (Caucig et al. 2010, Yeung et al. 1998). So ist es wahrscheinlich, dass auch in der nKLH/nKLH-Gruppe eine allergische Entzündung induziert wurde, welche die ausgeprägten histologischen und zytologischen Lungenveränderungen erklären kann. Interessanterweise zeigte sich auch in der Gruppe nOVA/nKLH eine stärkere Entzündung, die zwar nicht die Ausmaße der (n)OVA/(n)OVA-Gruppen annahm, sich aber von den Kontrollen PBS/nKLH und nOVA/KLH unterschied. Dazu ist anzumerken, dass die nOVA/nKLH-Gruppe besonders in der Zytologie eine große intragruppale Inhomogenität aufwies. So gab es Präparate, die in ihrer Zellzusammensetzung den Kontrollen ähnelten, während sich andere deutlich von diesen unterschieden. Somit kann nicht ohne Weiteres gefolgert werden, dass die entzündliche Reaktion bei Verwendung zweier verschiedener Allergene alleine auf deren Nitrierung zurückzuführen ist. Möglich wäre auch, dass andere noch unbekannt Störfaktoren das Ergebnis beeinflussten.

4.3. Gesamtproteingehalt der BAL

Zur Beantwortung der Frage, ob allergische Entzündung und die Verwendung nitrierter Allergene Auswirkungen auf die Integrität und Permeabilität des Lungenepithels besitzt, wurde der Gesamtproteinspiegel in der BAL bestimmt.

Dabei zeigte sich der Gesamtproteingehalt sowohl in den OVA/OVA- und nOVA/

nOVA-Gruppen als auch in der nKLH/nKLH-Gruppe gegenüber den jeweiligen mit PBS-sensibilisierten Kontrollen deutlich erhöht. Eine leichte Erhöhung konnte darüber hinaus auch in der nOVA/nKLH-Gruppe nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen zeigen, dass *Allergisierung* die Gesamtproteinmenge in der BAL erhöht und dass die Verwendung nitrierter Substanzen einen zusätzlichen, nicht signifikanten Effekt ausübt.

Dass Sensibilisierung und Challenge mit OVA zu einer Erhöhung des BAL-Gesamtproteins führen kann, zeigte auch die Studie von Zhu et al., in der die drei Mausstämme BALB/cJ, FVB/NJ, C57BL/6J hinsichtlich ihrer Entwicklung von pulmonalen allergischen Reaktionen verglichen wurden (Zhu and Gilmour 2009). Dabei zeigte sich bei allen drei Stämmen nach Sensibilisierung mit OVA/Alum und dreimaliger intranasaler OVA-Challenge eine signifikante Erhöhung des Gesamtproteins im BALF.

In einer anderen Studie wiesen gegen OVA immunisierte und provozierte Meerschweinchen eine mittlere Proteinerhöhung von 350 % gegenüber den unbehandelten Kontrollen auf (Liu, Wang and Enhorning 1995).

Darüber hinaus konnten NO₂-Expositionsstudien das BAL-Protein beeinflussen. Beispielsweise zeigte sich in der BAL von Ratten neben einer Erhöhung der Gesamtzellzahl eine Erhöhung des Gesamtproteins mit zunehmender Konzentration und Dauer der NO₂-Exposition (0.8, 5.0, 10.0 ppm NO₂ für 1 oder 3 Tage) (Müller et al. 1994). Da hinsichtlich der Auswirkungen von (n)KLH (zur Sensibilisierung und Provokation) auf den Gesamtproteingehalt noch keine Daten vorliegen, kann auf keine Vergleichsstudien zurückgegriffen werden. Wie zuvor beschrieben ist es allerdings wahrscheinlich, dass auch in der nKLH/nKLH-Gruppe eine allergische Entzündung induziert wurde, welche für die Erhöhung des Gesamtproteins verantwortlich ist. So scheint die Art des verwendeten Allergens (ob OVA oder KLH) keine Rolle zu spielen.

Die bei der Allergen-Provokation inhalierte Menge an Protein (pro Plastikkammer: 5 ml 1 %iges OVA, nOVA, KLH, nKLH gelöst in PBS) war wahrscheinlich zu gering, um die Erhöhung des Gesamtproteins in der BAL erklären zu können. Vielmehr machen die oben genannten Autoren strukturelle Läsionen der Atemwege infolge entzündlicher Prozesse für die Proteinerhöhung verantwortlich (Zhu and Gilmour 2009, Liu et al. 1995, Müller et al. 1994). Aus unseren Veränderungen in Lungenhistologie und

Zytologie ist ersichtlich, dass durch die Kombination aus Sensibilisierung und Provokation mit (n)OVA und (n)KLH eine entzündliche Atemwegsreaktion hervorgerufen wurde. Diese entzündliche Irritation der Atemwege könnte die epitheliale Permeabilität von zytosolischem Protein in die Alveolen erhöhen. Neben den Epithelschäden besteht auch die Möglichkeit, dass es via kapillarer Leckagen zu einer Exsudation von Plasmabestandteilen in den alveolären Raum kam, welche sich an einer Vergrößerung des alveolären Protein-Pools beteiligten. Darüber hinaus ist ein genereller Anstieg der Proteinproduktion in den Atemwegen möglich. Auch diese Produktionssteigerung im Rahmen von zellulärer Abwehr und beginnenden Reparaturprozessen könnte an einer Erhöhung des Gesamtproteins in der BAL beteiligt gewesen sein.

4.4. Phospholipide als Komponenten des Lungensurfactant

4.4.1. Gesamtphospholipidmenge in der BAL

Allergisches Asthma geht mit entzündlichen Prozessen im terminalen Respirationstrakt einher und kann dessen Struktur und Funktion beeinträchtigen. Diese Prozesse schließen auch das pulmonale Surfactant mit ein, welches als Phospholipid-Proteingemisch neben der Stabilisierung der Alveolen für den Gasaustausch essentiell ist. Dieser Surfactantfilm konnte im Rahmen der BAL ausgewaschen und auf seine Zusammensetzung und Funktion hin untersucht werden.

In dieser Untersuchung zeigte sich der Gesamtphospholipidspiegel sowohl in den OVA/OVA- und nOVA/nOVA-Gruppen als auch in der nKLH/nKLH-Gruppe gegenüber den jeweiligen mit PBS-sensibilisierten Kontrollen erniedrigt. Kein Unterschied zu den Kontrollen fand sich hingegen bei den Gruppen nOVA/KLH und nOVA/nKLH.

Diese Beobachtungen zeigen, dass *Allergisierung* den Gesamtphospholipidspiegel der BAL vermindern kann, ohne dass die Verwendung nitrierter Substanzen einen zusätzlichen Effekt ausübt.

In vielen NO₂-Expositionsstudien wurde der Einfluss von Luftschadstoffen auf das pulmonale Surfactant-System untersucht.

Beispielsweise konnte in einigen älteren Studien eine kurze NO₂-Exposition (3-16 ppm für 1 h und 15 ppm für 28 h) den BAL-Phospholipidgehalt mit zunehmender Dosis und

Dauer erhöhen (Ichinose and Sagai 1989, Guth and Mavis 1985). Ebenso zeigte sich bei Ratten nach Exposition mit 10 ppm NO₂ für 1 und 3 Tage eine Erhöhung der extrazellulären Phospholipide und ein leicht verminderter Anteil an Phosphatidylcholin im Vergleich zu luftatmenden Kontrollen (Müller et al. 1994). Die Autoren schlossen einen Influx an Serum in den alveolären Raum als Ursache der Erhöhung aus, da in der BAL keine erhöhten Mengen an serumspezifischem Sphingomyelin gefunden wurden. Vielmehr zogen sie in Betracht, dass die NO₂-Exposition zu einer Zerstörung von Zellen mit nachfolgender Phospholipid-Freisetzung führte, welche für den Anstieg verantwortlich sein könnte.

Eine andere Studie dieser Autoren untersuchte den Recycling-Mechanismus von Surfactantlipiden in Typ-II-Pneumozyten (Müller, Garn and Hochscheid 2003). Zur Induktion einer Atemwegsentzündung wurden Ratten für 3, 20 oder 28 Tage einer kontinuierlichen 10 ppm NO₂-Exposition ausgesetzt. Anschließend wurden isolierte Typ-II-Zellen *in vitro* mit radioaktiv markierten Surfactant-ähnlichen Liposomen inkubiert und deren Recycling studiert. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen wiesen die Typ-II-Zellen geschädigter Lungen einerseits einen erhöhten Uptake, andererseits eine verminderte Resekretion von Liposomen auf. Diese Beobachtung erklärten die Autoren damit, dass die erhöhte Liposomenaufnahme der Lunge ermöglicht, durch *de novo*-Synthese einen intrazellulären Phospholipidpool zu formen, um angemessen auf Stresssituationen zu reagieren.

Ein unserem Studienprotokoll ähnliches Design liegt der Studie von Liu et al. zugrunde, welche sich mit den Auswirkungen der Surfactant-Dysfunktion auf die metabolische Funktion von Typ-II-Pneumozyten befasst (Liu et al. 1997). Zur Induktion einer milden Asthmaform wurden Meerschweinchen mit OVA bzw. PBS immunisiert und nach 5 Wochen mit OVA-Aerosol *gechallenged*. Neben einer signifikanten Erhöhung des BAL-Proteins zeigte sich eine geringe, nichtsignifikante Verminderung der BAL-Gesamtphospholipidkonzentration im Gegensatz zu den ausschließlich provozierten Kontrollen. Des Weiteren zeigte sich in immunisierten und provozierten Tieren die zelluläre Phospholipidsynthese und Phosphatidylcholinsynthese in Typ-II-Pneumozyten signifikant reduziert. Die Autoren begründeten diese Beobachtung damit, dass die Reduktion der intrazellulären Phospholipid-Produktion nicht lang genug andauerte, um das extrazelluläre BAL-Material merklich zu reduzieren. Der Trend einer

durch *Allergisierung* reduzierten Phospholipidsynthese stimmt mit unseren Ergebnissen überein.

In der Literatur gibt es widersprüchliche Resultate hinsichtlich des extrazellulären Phospholipidgehalts der BAL, was sehr wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Studiendesigns zurückzuführen ist. In diesem Zusammenhang erläutert das Review von Müller et al. (Müller et al. 1998) verschiedene Faktoren, die den alveolären Gesamtpospholipidspiegel beeinflussen. Beispielsweise sei dieser von der Natur und Konzentration des eingesetzten Oxidans und der Dauer der Exposition abhängig. Dabei mache es einen Unterschied, ob die Exposition kontinuierlich oder intermittierend erfolge, da sich bei intermittierender Gabe die Phospholipidwerte durch beginnende Adaptationsmechanismen zwischen den Expositionen normalisieren könnten. Ein weiterer Faktor sei die Auswahl der Tierspezies, da verschiedene Spezies aufgrund ihres individuellen antioxidativen Status unterschiedliche Antworten gegenüber Oxidantien generieren können.

Darüber hinaus können sich die Techniken der Surfactantextraktion unterscheiden. Generell gelten diese als fehleranfällig. So kann das Spülen mit NaCl im Rahmen der BAL beispielsweise die biophysikalische und biochemische Organisation des Surfactant unterbrechen und dadurch Surfactantformen generieren, die in vivo nicht existieren (Griese 1999). Diese Limitationen sollten bei der Interpretation von Ergebnissen immer bedacht werden.

4.4.2. Genexpression der an der Phospholipidsynthese beteiligten Enzyme

Allergische Entzündung kann - neben Einfluss auf den extrazellulären Surfactant zu nehmen - auch Struktur und Metabolismus von Typ-II-Pneumozyten verändern. Basierend auf den Veränderungen der Surfactant-Phospholipide im alveolären Raum kam die Frage auf, ob es parallele Veränderungen auch in der Surfactant-Synthese innerhalb der Typ-II-Pneumozyten gibt. Dazu wurden die Hauptenzyme des Kennedy-Pathways untersucht, der in der Bildung von Phosphatidylcholin mündet. Besonders die CTP: Phosphocholin Cytidyltransferase alpha nimmt in der Synthese von Phospholipiden - durch die Regulation des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts - eine Schlüsselrolle ein (Post et al. 1984). Hinsichtlich der CTP: Phosphocholin

Cytidyltransferase alpha mRNA-Expression zeigte sich diese in der Gruppe OVA/OVA deutlich und in der Gruppe nOVA/nOVA signifikant gegenüber der Kontrolle vermindert. Auch die mRNA-Expression der Cholinase alpha in Typ-II-Pneumozyten war in den OVA/OVA- und nOVA/nOVA-Gruppen gegenüber der Kontrolle deutlich reduziert.

In der Zusammenschau dieser Ergebnisse scheint die *Allergisierung* gegenüber OVA die Expression der zwei Hauptenzyme innerhalb von Typ-II-Pneumozyten zu vermindern. Die herunter regulierte Enzymexpression könnte zu einem verminderten intrazellulären Phospholipidgehalt führen. Unter der Kenntnis, dass Surfactant einem Recycling-Mechanismus unterliegt (Müller et al. 2003), kann der verminderte intrazelluläre Phospholipidgehalt seinerseits den reduzierten extrazellulären Gesamtpospholipidgehalt der BAL erklären. Die Verwendung von nitriertem OVA scheint diesen Effekt nicht zusätzlich zu verstärken.

Eine Erklärung für die beobachtete mRNA-Reduktion von CTP: Phosphocholin Cytidyltransferase alpha und Cholinase alpha in *allergisierten* OVA-Tieren könnte sein, dass die Expression zugunsten anderer Proteine herunter reguliert wurde. Schließlich besitzen alveoläre Typ-II-Pneumozyten neben der Surfactantproduktion weitere wichtige Funktionen, die dazu dienen, die alveoläre Homöostase und den Gasaustausch aufrechtzuerhalten. Das Review von Mason RJ gibt einen Überblick über die verschiedenen metabolischen Eigenschaften der Typ-II-Pneumozyten (Mason 2006). Während einer Entzündung ist beispielsweise die Sekretion antiinflammatorischer und antimikrobieller Substanzen wie SP-A, SP-D, Lysozym und einer ganzen Reihe von Zytokinen und Chemokinen erhöht. Zudem halten Typ-II-Pneumozyten - durch transepithelialen Natriumtransport - die Alveolen frei von Flüssigkeit und können ein bestehendes alveoläres Ödem abbauen. Im Falle einer Schädigung der Lungenstruktur sind Typ-II-Zellen in der Lage, die sehr empfindlichen Typ-I-Zellen zu ersetzen und somit die Epithelschäden auszugleichen.

Anders als mit OVA/OVA und nOVA/nOVA verhält es sich mit der Gruppe nKLH/nKLH. Aus Histologie und Zytologie geht hervor, dass auch in dieser Gruppe eine deutliche allergische Entzündung induziert wurde. Diese scheint allerdings keinen Einfluss auf den Phospholipidgehalt auszuüben. Sowohl der extrazelluläre Gesamtpospholipidgehalt als auch die Expression der zwei Hauptenzyme der

Phospholipidsynthese entsprechen in etwa den Kontrollen. Das gleiche Ergebnis findet sich bei der nOVA/nKLH-Gruppe, bei der Histologie und Zytologie ein leicht entzündliches Bild zeigen.

Weiterhin ist auffällig, dass der Cholinase alpha-mRNA-Gehalt in den mit (n)KLH behandelten Tieren insgesamt deutlich über dem der mit (n)OVA behandelten Tieren liegt. Diese Beobachtungen machen deutlich, dass der Phospholipidmetabolismus nicht nur durch allergene Entzündung als solche, sondern zu einem großen Teil auch von der verwendeten allergenen Substanz beeinflusst wird. Bei OVA als Protein des Eiklars und KLH als Hämolymphe-Protein der *Großen Kalifornischen Schlüssellochnapfschnecke* handelt es sich um sehr unterschiedliche Proteinkomplexe. So ist es denkbar, dass OVA und KLH zu einer teils verschiedenartigen Modulation der Immunfunktion führen. Eine interessante Entdeckung machte die Forschergruppe um Watanabe et al., welche nachwies, dass kommerziell erhältliches OVA (Grad V) mit Endotoxin kontaminiert war (Watanabe et al. 2003).

Überraschenderweise ging in C57BL/6-Mäusen die Sensibilisierung und Provokation mit gereinigtem, endotoxinfreien OVA im Vergleich zu der kontaminierten Form mit einer erhöhten IgE-Akkumulation im Serum, einer ausgeprägteren AHR-Entwicklung und einer deutlichen strukturellen Lungenentzündung einher. Die Autoren führten diese negativ-modulatorischen Effekte von LPS auf die Induktion einer immunologischen Toleranz zurück.

Dieses Ergebnis ist in Einklang mit der *Hygiene-Hypothese*, nach der eine umweltbedingte Endotoxinexposition eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Toleranz gegenüber natürlich vorkommenden Allergenen spielt (Braun-Fahrlander et al. 2002).

Auf der anderen Seite gibt es verschiedene andere Studien, in denen eine LPS-Inhalation neben der klinischen Symptomatik mit einer entzündlichen, neutrophilen Reaktion und einer bronchialen Obstruktion einherging. Dabei waren diese Symptome bei Asthmatikern häufig ausgeprägter als bei gesunden Probanden (Schwartz 2001). Einen Überblick über verschiedene Studien, die sich mit der Assoziation von Endotoxin und Atopie beschäftigen, geben die folgenden Reviews (Simpson and Martinez 2010, Thorn 2001). Diese anscheinend widersprüchlichen LPS-Effekte machen deutlich, dass

der Zeitpunkt der Exposition das Outcome entscheidend beeinflussen kann. So scheint eine Exposition in den frühen Lebensjahren Individuen vor einer Entwicklung von Atopie und Asthma zu schützen. Darüber hinaus wurde in einem Tiermodell der Einfluss von LPS auf verschiedene Phasen des Sensibilisierungsprozesses gegen ein bestimmtes Allergen untersucht. In diesem Modell wurden Ratten intraperitoneal mit OVA sensibilisiert, inhalativ gechallenged und zu verschiedenen Zeitpunkten gegenüber LPS exponiert. Dabei konnte eine frühe LPS-Gabe bis zu 6 Tagen nach der OVA-Applikation die allergische Sensibilisierung verhindern. Eine spätere LPS-Gabe führte hingegen zu einer verstärkten allergisch entzündlichen Antwort mit erhöhten IgE-Werten, einer erhöhten mikrovaskulären Leckage und einem erhöhten zellulären Influx von neutrophilen und eosinophilen Zellen (Tulić et al. 2000). Neben dem Zeitpunkt der Endotoxinexposition scheinen Expressionsveränderungen verschiedener Gene die Antwort eines Organismus auf Endotoxin zu beeinflussen und die Balance der Immunantwort zu verändern. Beispielsweise zeigten sich Mutationen und Polymorphismen in Genen des TLR4 (transmembranaler LPS)-Rezeptors und des CD14-Antigens (ein Teil des Pattern-Recognition Rezeptors für Endotoxin) mit einer veränderten Antwort auf inhaliertes Endotoxin assoziiert (Arbour et al. 2000, Baldini et al. 1999).

Letztendlich bleibt in unserem Vergleich zwischen (n)OVA (Reinheitsgrad V) und (n)KLH die Frage ungeklärt, ob eventuell vorhandene Verunreinigung einer oder beider Substanzen Auswirkungen auf deren allergenes Potential hatte.

Im Gegensatz zur Cholinkinase alpha zeigt sich die Expression der Cholinkinase beta in Typ-II-Pneumozyten sowohl in den (n)OVA- als auch in den (n)KLH-Gruppen gegenüber den Kontrollen PBS/nOVA und PBS/nKLH erhöht. Es ist nicht verwunderlich, dass beide Cholinkinasen nach *Allergisierung* ein eher gegensätzliches Verhalten zeigen, da beide Isoformen von zwei Genen kodiert werden und somit voneinander unabhängige Genprodukte darstellen (Aoyama et al. 2000).

Ihre Unabhängigkeit voneinander bestätigte sich auch in Untersuchungen an Knock-out-Mäusen. Beispielsweise resultierte ein Fehlen der Cholinkinase alpha in embryonaler Letalität, wohingegen ein Verlust der Cholinkinase beta-Aktivität zu einer progressiven muskulären Dystrophie und neonatalen Knochendeformität führte (Vance and Vance

2009).

Die Ergebnisse zusammengenommen deuten darauf hin, dass die Induktion einer allergischen Entzündung Auswirkungen auf die Surfactantkomposition hat. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass ein Austritt von Plasmaproteinen in die Atemwege die normale Surfactant-Aktivität zu inhibieren vermag (Persson et al. 1998, Seeger et al. 1993).

Neben den Plasmaproteinen könnten auch eosinophile Zellen und das Eosinophile kationische Protein (ECP) in der Lage sein, Surfactant zu inhibieren. Bei ECP handelt es sich um eine heparin-bindende Ribonuklease, welche als zytotoxisch gilt und schon seit einigen Jahren als Biomarker für Asthma eingesetzt wird. Dabei scheint ihre Konzentration sowohl mit der Anzahl eosinophiler Zellen als auch mit dem Asthma-Schweregrad zu korrelieren (Bystrom, Amin and Bishop-Bailey 2011).

In diesen Studien wurde nachgewiesen, dass hohe ECP-Konzentrationen mit Epithelexfoliation und Veränderungen des Atemwegsschleims einhergehen.

Darüber hinaus zeigte eine Studie von Young et al., dass ECP in der Lage ist, stabile transmembranale Poren in der Phospholipiddoppelschicht zu formen (Young et al. 1986). Auf diese Weise könnte das ECP auch mit der Surfactantschicht interagieren und deren Funktion beeinträchtigen.

Da das pulmonale Surfactant eine wichtige immunologische Funktion besitzt, kann vermutet werden, dass die beschädigten Abwehrmechanismen mikrobielle Infektionen oder allergische Reaktionen *in vivo* erleichtern. Daneben kann es bei veränderter Zusammensetzung Probleme in der Stabilisierung der Alveolen geben. Auch wenn in unserem Mausstamm die Lungenfunktionsmessung keine besonderen intergruppalen Unterschiede zeigte, so gibt es doch eine Reihe anderer Studien, die belegen, dass eine Surfactant-Dysfunktion die Lungenfunktion beeinträchtigt und an einer Erhöhung der Atemwegsresistance beteiligt ist (Enhorning 2008, Griese 1999).

4.5. Superoxiddismutasen als Enzyme der antioxidativen Abwehr

Die Lunge bietet aufgrund ihrer großen Oberfläche und der hohen lokalen Sauerstoffpartialdrücke in den Alveolen viel Angriffsfläche für oxidativen Stress, der schon während der normalen Respiration auftritt. Komplizierend kommt bei vielen Lungenerkrankungen - wie dem Asthma bronchiale - die Komponente der Entzündung

hinzu, welche mit einer Aktivierung von Entzündungszellen und mit der Generation freier Radikale in Form von ROS und RNS einhergeht. Diese Radikale können in die normale Zellhomöostase eingreifen und intrazelluläre Signalwege modulieren. Durch solche transkriptionalen Veränderungen wird den Zellen ermöglicht, angemessen auf oxidativen Stress zu reagieren (Comhair and Erzurum 2010).

Unter den antioxidativen Enzymen nehmen Superoxiddismutasen eine wichtige Rolle ein, da sie Superoxidradikale zu H₂O₂ abbauen und zu einem großen Anteil an der antioxidativen Kapazität der Lunge beteiligt sind (Kinnula and Crapo 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der induzierten allergischen Entzündung auf die Aktivität der Superoxiddismutasen im Plasma und ihre Expression in Typ-II-Pneumozyten untersucht. Dafür wurden Typ-II-Pneumozyten nach einem Verfahren von Corti et al. (Corti et al. 1996) mit hohem Reinheitsgrad isoliert und ihr SOD-mRNA und -Proteingehalt bestimmt. Auf diese Weise ließ sich isoliert die Genexpression der Typ-II-Zellen untersuchen, ohne dass die Enzymproduktion anderer Zellreihen - wie mesenchymaler und inflammatorischer Zellen - mit eingeschlossen wurde.

4.5.1. Enzymaktivität der Gesamt-SOD im Plasma

Für die SOD-Aktivität im Plasma sind die intrazellulären Enzyme CuZnSOD und MnSOD verantwortlich, welche während des normalen Zellumsatzes in die Zirkulation gelangen. Obwohl die ECSOD in der extrazellulären Matrix gefunden wird, ist sie meist an Heparansulfat-Proteoglykane der Endothelzelloberflächen gebunden (Comhair and Erzurum 2010) und trägt nur wenig zur Plasma-SOD bei (Sandström et al. 1994). Zur Beantwortung der Frage, wie sich oxidativer Stress auf die Aktivität der Gesamt-SOD in der Zirkulation auswirkt, wurde diese nach Induktion einer allergischen Entzündung im Plasma der Versuchstiere bestimmt. Dabei zeigten die untersuchten Gruppen ein recht homogenes Bild mit annähernd gleichen Aktivitätswerten und nur minimalen intergruppalen Schwankungen. Die Verwendung nitrierter Substanzen hatte keinen weiteren Einfluss auf die Gesamt-SOD-Aktivität.

Unsere Resultate weichen von denen der meisten murinen und humanen Asthma-Studien ab, welche nach Antigen-Applikation eine Abnahme der SOD-Aktivität beobachteten. Die Gründe dieser Variation können vielfältig sein und umfassen

verschiedene Assay-Methoden, die Verwendung einer anderen Spezies und nicht zuletzt die hohe Variation der SOD-Aktivität unter Individuen. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen wiesen humane Asthmatiker in der Studie von Comhair et al. (Comhair et al. 2005a) eine Reduktion der systemischen SOD-Aktivität auf. Da zur gleichen Zeit keine Reduktion der plasmatischen Proteinlevel von CuZnSOD und MnSOD vorlagen, konnte der Verlust der SOD-Aktivität nicht auf einer verminderten Proteinproduktion beruhen. Vielmehr führten die Autoren diese Beobachtung auf die Freisetzung einer inaktiven Form der SOD zurück, welche durch oxidative Modifizierungen einzelner Aminosäuren zustande kam.

Auch andere Studien beschäftigten sich mit dem Thema der posttranslationalen Modifizierung von Proteinen. Nitrotyrosin in freier oder proteingebundener Form wurde in Assoziation mit über 50 Erkrankungen detektiert (Greenacre and Ischiropoulos 2001). Darüber hinaus zeigte sich bei atopischen Asthmatikern und sensibilisierten Mäusen nach Allergen-Exposition die Rate an Tyrosinnitrierungen erhöht (Andreadis et al. 2003, Iijima et al. 2001). Dabei scheint es sich bei der Nitrierung von Proteinen um einen sehr selektiven Vorgang zu handeln, der unter anderem von der Sekundärstruktur des Proteins, von der lokalen Umgebung der Tyrosinreste sowie von Natur und Entstehungsort der reaktiven Spezies beeinflusst wird. Beispielsweise scheinen Mitochondrien ein primärer Ort für Protein-Tyrosinnitrierungen zu sein, da sie aufgrund der Atmungskette eine Hauptquelle für die Bildung von ROS und Peroxynitrit darstellen (Abello et al. 2009). Um ihre Integrität zu bewahren, besitzen Mitochondrien eine antioxidative Abwehr in Form der MnSOD, welche die Dismutation von Superoxiden (O_2^-) katalysiert und eine Amplifikation der ROS-Produktion verhindert (Macmillan-Crow and Cruthirds 2001). Doch auch die MnSOD gilt als sensitiv gegenüber oxidativen Modifizierungen. Der Nachweis gelang MacMillan-Crow et al., welche eine selektive *in vivo*-Tyrosinnitrierung humaner MnSOD während einer chronischen Abstoßungsreaktion eines Nierentransplantates beschrieben (MacMillan-Crow et al. 1996).

Bei erhöhtem Gesamt-MnSOD-Protein zeigte sich die Enzymaktivität erniedrigt, was die Autoren auf eine Enzyminaktivierung durch Peroxynitrit zurückführten (MacMillan-Crow and Thompson 1999). Seit dieser ursprünglichen Beobachtung haben viele andere Studien in Menschen, Tieren und einzelnen Zellen nitrierte MnSOD identifiziert. Dass

Nitrierung zu einer Inaktivierung des Enzyms führt, zeigte schließlich ein Versuch mit rekombinanter MnSOD, welche in Position 34 einen 3-Nitrotyrosinrest aufwies. Dieser Nitrotyrosinrest konnte die enzymatische Aktivität im Vergleich zum unmodifizierten Protein auf 3 % vermindern (Neumann et al. 2008). Neben der MnSOD sind auch die anderen zwei Formen der SOD für oxidativen Stress empfänglich. Während Peroxynitrit in der ECSOD überwiegend zu Tyrosinmodifizierung führt (Comhair and Erzurum 2010), kann es in der CuZnSOD durch Bildung von Histidinylnradikalen (Alvarez et al. 2004) oder 6-Nitrotryptophan (Yamakura et al. 2005) zum Verlust der Enzymaktivität kommen. Der Verlust der SOD-Aktivität kann nun seinerseits zu einer erhöhten Peroxynitrit-Formierung und zu weiteren oxidativen Schäden beitragen. Zudem sind die SOD-Modifizierungen in der Lage, die Apoptose von Atemwegsepithelzellen zu triggern. Auf diese Weise führen sie zur Abschilferung der Atemwegsoberfläche, was die Atemwege für die Entwicklung einer Hyperreagibilität prädisponiert (O'Sullivan, Tyner and Holtzman 2003, Bucchieri et al. 2002). Auch in unserer Arbeit schien die optische Epithelabschilferung der HE-gefärbten Histologieschnitte mit dem Grad der Entzündung zuzunehmen. Daher wäre es interessant, die epitheliale Apoptoserate zukünftig auch in unseren Versuchsgruppen durch Immunfärbungen von DNA-Strangbrüchen oder durch Bestimmung der epithelialen Caspase-3-Aktivität zu untersuchen (Comhair et al. 2005b).

Unsere Bestimmung der Gesamt-SOD-Aktivität im Plasma zeigte nur geringfügige Schwankungen zwischen den Versuchsgruppen. Zur weiteren SOD-Analyse wäre es daher interessant, auch die Aktivitäten jeder einzelnen SOD-Unterform separat zu bestimmen und damit ihren jeweiligen Anteil an der Gesamt-SOD zu ermitteln. Durch diese Untersuchungen ließe sich sowohl eine Inaktivierung als auch eine (kompensatorische) Überexpression einzelner SOD-Unterformen erkennen. Darüber hinaus ist bei Asthmatikern nicht nur die Gesamt-SOD-Aktivität der Zirkulation vermindert. Einige Studien belegen auch eine lokalisierte Abnahme der SOD-Aktivität in Epithelzellen asthmatischer Atemwege, im BALF und in BAL-Zellen, welche proportional zum Grad der Atemflusslimitationen ist (Comhair et al. 2000). Da in dieser Arbeit nur die systemische Gesamt-SOD-Aktivität des Plasmas bestimmt wurde, kann keine Aussage darüber getroffen werden, wie sich unser Studiendesign auf die Gesamt-SOD-Aktivität der BAL und der Typ-II-Pneumozyten auswirkt. Vor dem Hintergrund,

dass die einzelnen SOD-Unterformen in den verschiedenen Kompartimenten unterschiedlich reguliert werden, sollten zukünftig auch mit BAL und Typ-II-Zellen entsprechende Aktivität-Assays der Gesamt-SOD und der einzelnen SOD-Unterformen durchgeführt werden.

4.5.2. Immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen der SOD-Unterformen

CuZnSOD

Immunhistochemisch ließ sich die CuZnSOD in allen Lungenpräparaten in den bronchiolären Epithelzellen und der alveolären Region anfärben. Optisch bestanden allerdings intergrupale Unterschiede hinsichtlich der Expressionslokalisation. In den beiden Kontrollen PBS/nOVA und PBS/nKLH und den Gruppen nOVA/KLH und nOVA/nKLH war besonders in den bronchiolären Epithelzellen sowie entlang der alveolären Septen ein ausgeprägtes CuZnSOD-Reaktionsprodukt zu finden. Entlang der Septen sind vor allem die kubischen Typ-II-Pneumozyten dafür bekannt, viel CuZnSOD zu exprimieren (Chang et al. 1995).

Bei den *allergisierten* Tiere der Gruppen OVA/OVA und nOVA/nOVA fanden sich vor allem intraalveoläre Zellen immunhistochemisch gefärbt. Analog der HE-gefärbten Histologieschnitte zeigten auch diese Präparate der OVA/OVA und nOVA/nOVA-Gruppen eine ausgeprägte peribronchioläre und perivaskuläre zelluläre Infiltration mit Übergreifen der Entzündung auf die Alveolen. So scheint es sich bei den intraalveolären Zellen vornehmlich um Immunzellen zu handeln, die CuZnSOD exprimierten. Die Gruppe nKLH/nKLH zeigte epithelial und septal im Vergleich zu den Kontrollen eine schwächere Färbung. Andererseits wies sie analog der (n)OVA-Gruppen intraluminal viele positive Zellen auf.

Dieses immunhistochemische Expressionsmuster steht in keinem Widerspruch mit den erhobenen CuZnSOD-mRNA-Befunden innerhalb der Typ-II-Pneumozyten. In der Real-time RT-PCR zeigte sich die Expression der CuZnSOD-mRNA in den Gruppen OVA/OVA und nOVA/nOVA deutlich gegenüber PBS/nOVA vermindert. Ebenfalls vermindert war die mRNA-Expression der Gruppe nKLH/nKLH gegenüber PBS/nKLH. Die Gruppen nOVA/KLH und nOVA/nKLH entsprachen wiederum den Kontrollen.

Immunhistochemisch bestand kein Unterschied zwischen den Gruppen OVA/OVA und

der nitrierten Form nOVA/nOVA. Hinsichtlich der CuZnSOD-mRNA-Expression wurde nur in der nOVA/nOVA-Gruppe der Unterschied gegenüber der Kontrolle PBS/nOVA signifikant, ein Effekt, der allerdings auf die etwas geringere Gruppen-Tierzahl der OVA/OVA-Gruppe zurückzuführen ist.

MnSOD

Das Immunhistochemische Expressionsmuster der MnSOD war zum größten Teil mit dem der CuZnSOD vergleichbar. So färbte sich bei den Kontrollen insbesondere das Bronchiolar- und Alveolarepithel intensiv rot, während sich in den Gruppen OVA/OVA und nOVA/nOVA eine deutlich stärkere Expression der MnSOD im Bereich der intraalveolären Zellen fand. Bei diesen Zellen könnte es sich um in das Lumen hineinragende, kuboide Typ-II-Zellen handeln. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass intraalveoläre Alveolarmakrophagen und andere Immunzellen angefärbt wurden, welche für ihren Mitochondrienreichtum bekannt sind (Crapo and Stamler 1994). Die Gruppe nKLH/nKLH exprimierte die MnSOD sowohl epithelial, septal als auch intraalveolär, während die Expressionsmuster der Gruppen nOVA/KLH und nOVA/nKLH eher dem der Kontrollen entsprachen.

Neben den immunhistochemischen Befunden war auch der MnSOD-mRNA-Gehalt der Typ-II-Pneumozyten mit dem der CuZnSOD vergleichbar. So zeigte sich die Expression der MnSOD-mRNA in den Gruppen OVA/OVA, nOVA/nOVA und nKLH/nKLH deutlich gegenüber den Kontrollen vermindert. Interessanterweise zeigte diesmal auch die nOVA/nKLH-Gruppe eine leichte Reduktion der mRNA gegenüber der Gruppe nOVA/KLH.

Am Beispiel der MnSOD wurde neben dem MnSOD-mRNA-Gehalt auch der MnSOD-Proteingehalt in Typ-II-Pneumozyten bestimmt. Als Resultat zeigte sich, dass bei reduziertem MnSOD-mRNA-Level der MnSOD-Proteingehalt der Zelle ebenfalls vermindert war. Die Zweiervergleiche der Western Blots ergaben, dass das MnSOD-Protein in der Gruppe nOVA/nOVA gegenüber der Kontrolle PBS/nOVA deutlich vermindert war. Allenfalls leichte Verminderungen zeigten sich in der Gruppe nKLH/nKLH gegenüber der Kontrolle PBS/nKLH und in der Gruppe nOVA/nKLH gegenüber der Referenzgruppe nOVA/KLH. Eine wiederum deutliche Verminderung des MnSOD-Proteins wies die Gruppe nOVA/nOVA gegenüber der Referenzgruppe nOVA/nKLH

auf.

Unter Berücksichtigung aller MnSOD-Parameter (Immunhistochemie, mRNA-Gehalt und Proteingehalt der Typ-II-Pneumozyten) hatte die Verwendung nitrierter Substanzen keinen zusätzlichen Effekt auf die Ausprägung des Entzündungsgrades. So bestand zwischen den Gruppen OVA/OVA und nOVA/nOVA kein bedeutender Unterschied und auch die beobachtete MnSOD-mRNA-Reduktion von nOVA/nKLH gegenüber nOVA/KLH wurde zu keiner Zeit signifikant.

ECSOD

Da die Lunge eines der Hauptgewebe darstellt, in dem mRNA und Protein der extrazellulären Form der SOD (ECSOD) stark exprimiert werden (Kinnula and Crapo 2003), wurde neben den mRNAs von CuZnSOD und MnSOD auch die mRNA der ECSOD innerhalb von Typ-II-Pneumozyten bestimmt. Innerhalb der Lunge findet sich diese SOD-Unterform vor allem im extrazellulären Raum und hat dort die wichtige Aufgabe, die Matrixproteine vor extrazellulären Oxidantien zu schützen (Nozik-Grayck et al. 2005).

Im Trend zeigte sich die ECSOD-mRNA-Expression der OVA/OVA-Gruppe mit der Kontrolle PBS/nOVA vergleichbar und die Expression der nOVA/nOVA-Gruppe leicht gegenüber der Kontrolle vermindert. Die ECSOD-mRNA der Gruppen nKLH/nKLH, nOVA/KLH und nOVA/nKLH waren nur leicht gegenüber PBS/nKLH erhöht. Erneut machte es keinen Unterschied, ob die Tiere mit nitrierten oder nicht nitrierten Substanzen behandelt wurden. Allerdings hatte die Art der verwendeten Substanz einen Einfluss auf die Expression einiger SOD-Unterformen. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass sowohl der CuZnSOD- als auch der ECSOD-mRNA-Gehalt in den mit (n)KLH behandelten Tieren deutlich über dem der mit (n)OVA behandelten Tiere lag. Die gleiche Beobachtung wurde bereits hinsichtlich der Cholinase alpha gemacht, dem Enzym, welches den ersten Schritt der Phospholipidsynthese reguliert. So scheint es, dass nicht nur der Phospholipidmetabolismus, sondern auch der Antioxidantienmetabolismus entscheidend von der zur Induktion der allergenen Entzündung verwendeten Substanz beeinflusst werden. Gleichzeitig wird die zuvor aufgestellte Vermutung unterstrichen, dass OVA und KLH zu einer verschiedenartigen Modulation der Immunfunktion führen können.

In der Untersuchung von Hochscheid et al. (Hochscheid et al. 2002) wurde in Ratten durch Exposition mit 10 ppm NO₂ für 3 Tage eine akute Lungenentzündung induziert. Nach der Isolierung von Typ-II-Pneumozyten wurde in diesen Zellen die mRNA-Expression, der Proteingehalt und die Gesamt-SOD-Aktivität der CuZnSOD und MnSOD bestimmt. Zusammenfassend zeigten sich mRNA- und Proteinspiegel der CuZnSOD erhöht, die MnSOD-mRNA vermindert, deren Protein unverändert und die Gesamt-SOD-Aktivität der Typ-II-Pneumozyten reduziert. Diese Dissoziationen von mRNA-Level, Protein und Aktivität der CuZnSOD und MnSOD in Typ-II-Pneumozyten führten die Autoren darauf zurück, dass die Expressionen beider Gene sowohl auf transkriptionaler als auch auf translationaler und posttranslationaler Ebene kontrolliert werden.

Natürlich können die Ergebnisse der NO₂-Expositionsstudie nicht direkt auf unsere Resultate übertragen werden. Vielmehr zeigen die widersprüchlichen Daten, dass die Ausprägung der Entzündungsparameter und die antioxidative Abwehr entscheidend von der Natur und Konzentration des Oxidans, der Tierspezies und des Versuchsprotokolls beeinflusst werden. So gibt es Unterschiede im Ausprägungsgrad, aber auch in der Art der durch verschiedene Oxidantien bzw. Allergene induzierten Entzündung. Während obige Expositionsstudie die Lungen direkt mit inhalierten Oxidantien exponierte, wurde in unseren Versuchstieren durch intraperitoneale Sensibilisierung und inhalative Provokation eine allergische Entzündung ausgelöst. So ist es wahrscheinlich, dass die allergische Komponente zu einem anderen antioxidativen Expressionsmuster führte, als die direkte chemische und physikalische Reizung der Atemwege. Trotzdem ist die Annahme - einer Regulation der Gene auf allen Stufen der Proteinbiosynthese - auch auf unser Versuchsmodell zu übertragen. Wie bereits ausführlich berichtet, kann oxidativer Stress in Form von Peroxynitrit zu einer posttranslationalen Modifizierung von Proteinen führen und auf diese Weise deren Struktur und Funktion verändern. Daher liegt die Vermutung nahe, dass Peroxynitrit oder andere Entzündungszell-Radikale auch mit den DNA-Doppelsträngen und den bereits gebildeten mRNAs interferieren (Thannickal and Fanburg 2000). Solche Strukturveränderungen hätten Ablesungsfehler auf Transkriptions- und Translationsebene zur Folge und könnten mit qualitativen und quantitativen Proteinveränderungen einhergehen. Wahrscheinlicher ist die Erklärung, dass die Expressionen der CuZnSOD und MnSOD innerhalb von Typ-II-

Pneumozyten zugunsten anderer anti-inflammatorischer und antimikrobieller Proteine, Zytokine oder Chemokine herunter reguliert wurden. Als Ausgleich der SOD-Reduktion in Typ-II-Zellen könnte die SOD-Expression in anderen Zellen, wie beispielsweise in mesenchymalen und inflammatorischen Zellen, wiederum gesteigert sein. Entsprechende Untersuchungen von mRNA und Protein in Lungenfibroblasten oder Alveolarmakrophagen könnten diese Vermutung verifizieren.

4.5.3. Therapeutische Konsequenzen

Die Bedeutung von Antioxidantien für einen Organismus wurde in verschiedenen Tierstudien mit Hilfe von transgenen Mäusen und Knock-out-Tieren untersucht (Kinnula and Crapo 2003, Tsan 2001).

Der dabei häufig beobachtete Überlebensvorteil Antioxidantien-überexprimierender Tiere legt die Vermutung nahe, dass auch eine exogene Antioxidantien-Gabe einen gesundheitlichen Benefit haben könnte. Die Bedeutung exogener Antioxidantien in der Therapie von entzündlichen Erkrankungen wie Asthma wurde bereits in verschiedenen Tierstudien untersucht. Allerdings ist ihr Einsatz durch eine geringe Löslichkeit, eine ineffektive Permeabilität sowie einem ausgeprägten First-pass-Metabolismus begrenzt (Ratnam et al. 2006). Darüber hinaus besitzen SODs eine sehr kurze Plasma-Halbwertszeit von unter 10 min, bevor sie renal oder hepatisch eliminiert werden (Muzykantov 2001).

Um ihre pharmakologischen und kinetischen Eigenschaften zu verbessern, wurden verschiedene SOD-Modifizierungen vorgenommen. Diese Modifizierungen umfassen beispielsweise die liposomale Verkapselung und die Kopplung an Trägersubstanzen wie Polyethylenglycol oder an Antikörper gegen endotheliale Antigene wie dem *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1* (PECAM1) (Ratnam et al. 2006, Muzykantov 2001).

Auf diese Weise konnte in Tiermodellen die Lebensdauer der exogenen SODs in vivo, ihre zelluläre Aufnahme und ihre Effektivität in der Abwehr von oxidativen Schäden gesteigert werden (Suntres 2011).

In einem alternativen Ansatz wurden neben den exogenen SODs verschiedene Klassen von synthetischen SOD-Mimetika entwickelt. Diese bieten den Vorteil, dass sie sich aufgrund ihres geringeren Molekulargewichts leichter im Gewebe verteilen, hohe

intrazelluläre Konzentrationen erreichen und keine Antigenität besitzen (Kinnula and Crapo 2003).

Verschiedene SOD-Mimetika zeigten in einer Reihe von in vitro und in vivo Studien eine effiziente antioxidative Kapazität und konnten die Entstehung von Lungenschäden in Tiermodellen mit erhöhtem oxidativem Stress verhindern (Li and Zhou 2011, Cinci et al. 2010, Masini et al. 2005).

4.6. Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Wirkungsweise zweier Allergene in nativer und nitrierter Form anhand eines Mausmodells des allergischen Asthmas untersucht. Dazu wurden C57BL/6-Mäuse mit nitrtem und unmodifiziertem OVA und KLH intraperitoneal sensibilisiert und inhalativ provoziert. Neben der Bestimmung von Lungenfunktion, Histologie, BAL- und Plasmabestandteilen wurden Typ-II-Pneumozyten isoliert und molekularbiologisch untersucht. Auf diese Weise ließen sich Informationen über ihren Surfactant- und Antioxidantienmetabolismus erhalten. Die abgeleiteten Ergebnisse werden im Folgenden zur Beantwortung der Fragestellungen dieser Arbeit herangezogen.

1) Bewirken nitrierte Allergene in einem kompletten Individuum eine stärkere Entzündungsreaktion als die entsprechenden nicht nitrierten Allergene?

Der Vergleich der Gruppen OVA/OVA und nOVA/nOVA ergab ein heterogenes Bild.

In einigen Untersuchungen lösten die nitrierten Allergene eine stärkere Entzündungsreaktion aus als die nicht nitrierten Allergene. Beispielsweise waren die histologischen Veränderungen in Form von strukturellen Läsionen und zellulären Infiltraten in der nOVA/nOVA-Gruppe deutlicher ausgeprägt als bei den OVA/OVA-Tieren. In der Zytologie wies die nitrierte Gruppe eine höhere Anzahl an Lymphozyten, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sowie eine höhere Gesamtzellzahl auf, was ebenfalls mit einer stärkeren Entzündungsreaktion zu vereinbaren ist. Darüber hinaus fand sich bei den nOVA/nOVA-Tieren als Ausdruck einer gestörten Integrität und Permeabilität des Lungenepithels ein höherer Gesamtproteingehalt in der BAL.

Auf der anderen Seite zeigten sich in den Untersuchungen von Lungenfunktion, Phospholipiden und Superoxiddismutasen keine Unterschiede zwischen der nitrierten und nicht nitrierten Gruppe.

Diese uneinheitlichen Resultate und fehlenden intergruppalen Signifikanzen erschweren die eindeutige Beantwortung der oben formulierten Fragestellung. Allerdings ist zu beachten, dass die allergischen Entzündungskomponenten in einem Organismus nicht in allen Kompartimenten gleich stark ausgeprägt sind. Vor diesem Hintergrund lässt sich schließlich festhalten, dass nitrierte Allergene in einem kompletten Individuum zu einer

stärkeren Entzündungsreaktion tendieren als die entsprechenden nicht nitrierten Allergene.

2) Kann eine Nitrierung des Allergens allein in der Phase der systemischen Sensibilisierung eine entzündliche Reaktion verstärken?

Die Frage ließ sich durch den Vergleich der Gruppen OVA/KLH, nOVA/KLH und nKLH/OVA beantworten.

Bei diesem Vergleich ergaben die Ergebnisse der Lungenfunktion, Lungenhistologie, BAL-Zytologie, Gesamtprotein- und Gesamtphospholipidbestimmungen ein homogenes Bild mit lediglich geringfügigen intergruppalen Unterschieden. Daraus wird deutlich, dass die Verwendung einer nitrierten Substanz nur im Rahmen der Sensibilisierung mit keiner Verstärkung der entzündlichen Reaktion einhergeht.

3) Kann eine Nitrierung des Allergens allein in der Phase der lokalen Allergenprovokation eine entzündliche Reaktion verstärken?

Zur Beantwortung dieser Frage wurden die Ergebnisse der Gruppen PBS/OVA vs. PBS/nOVA, PBS/KLH vs. PBS/nKLH und OVA/OVA vs. OVA/nOVA verglichen.

Die Gruppen PBS/OVA und PBS/KLH wurden hinsichtlich ihrer Lungenfunktion, Lungenhistologie, BAL-Zytologie, Gesamtproteine und Gesamtphospholipide untersucht. Die dabei erhobenen Befunde stimmten mit denen der PBS/nOVA und PBS/nKLH-Gruppen überein. Ebenso verhielt es sich mit den Gruppen OVA/OVA und OVA/nOVA, deren Vergleich in den oben genannten Parametern inklusive der Typ-II-Pneumozyten-Untersuchungen ein recht homogenes Ergebnis lieferte. Aus diesen Beobachtungen wird deutlich, dass die Verwendung einer nitrierten Substanz allein in der Phase der Provokation zu keiner Verstärkung der entzündlichen Reaktion führt.

4) Reagiert ein Individuum bei bestehender Sensibilisierung gegen ein definiertes nitriertes Allergen auch gegen andere nitrierte Allergene?

Dieser Frage liegt die Beobachtung zugrunde, dass Proteine mit allergenen Eigenschaften durch Umweltschadstoffe wie beispielsweise atmosphärisches Stickstoffdioxid (NO₂) nitriert werden können.

Zur Beantwortung der Frage wurde die nOVA/nKLH-Gruppe mit den Gruppen nOVA/KLH und PBS/nKLH verglichen. Dabei zeigte die nOVA/nKLH-Gruppe sowohl in der

Histologie als auch in der Zytologie eine entzündliche Reaktion, die zwar nicht das Ausmaß der OVA/OVA bzw. nOVA/nOVA-Gruppen erreichte, die Präparate aber doch von den Kontrollen unterschied. Weitere Unterschiede gegenüber den Kontrollen wies die nOVA/nKLH-Gruppe hinsichtlich ihres Gesamtproteingehalts in der BAL sowie ihres MnSOD-mRNA-Gehaltes in den Typ-II-Pneumozyten auf. Während die Gesamtproteinspiegel leicht erhöht waren, zeigte sich der MnSOD-mRNA-Gehalt im Vergleich zu den Kontrollen leicht reduziert. Allerdings sind diese Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren, da sie aufgrund einer zum Teil hohen intragruppalen Inhomogenität leicht überschätzt werden können. Abgesehen von diesen nicht signifikanten Veränderungen entsprachen die restlichen Ergebnisse dieser Gruppe weitgehend denen der Kontrollen. Zusammengefasst ergibt dieser Gruppenvergleich ein heterogenes Bild. Auch wenn sich die nOVA/nKLH-Gruppe in vielen Punkten nicht von den Kontrollen unterschied, so erscheint die Verwendung zweier nitrierter Allergene doch eine höhere inflammatorische Potenz zu besitzen als die Verwendung nur eines nitrierten Allergens in der Phase der Sensibilisierung oder Provokation.

Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse scheint ein Individuum bei bestehender Sensibilisierung gegen ein definiertes nitriertes Allergen eine Tendenz zu entwickeln, auch auf ein anderes nitriertes Allergen zu reagieren.

Zukünftige Versuche zu dem Thema dieser Arbeit sollten das Zytokinprofil der verschiedenen Versuchsgruppen mit einbeziehen, um Informationen über eine eventuell vorhandene T-Helferzell-Prädominanz zu erhalten. Beispielsweise könnte durch ELISA-Untersuchungen von IL-4, IL-5, IL-13 und IFN- γ eine T_H1- oder T_H2-Dominanz detektiert werden. In diesem Zusammenhang wäre auch die Bestimmung anderer Allergie-assoziiierter Parameter wie Gesamt-IgE sowie OVA- und KLH-spezifischem IgE, IgG1 und IgG2a in Plasma und BAL sinnvoll. Mit Hilfe dieser Antikörper ließen sich weitere Aussagen hinsichtlich der Allergenität und Immunogenität der unterschiedlich sensibilisierten und provozierten Tiere treffen.

Wenn zukünftige Untersuchungen die Messung der Atemwegsresistance mit einschließen, sollte über die grundsätzliche Verwendung eines anderen Mausstamms wie beispielsweise die Verwendung von BALB/c-Tieren nachgedacht werden.

C57BL/6-Mäuse gelten als *Low Responder* gegenüber einer T_H2-dominierten T-Helferzellantwort (Whitehead et al. 2003, Takeda et al. 2001) und haben sich als nicht optimal zur Erforschung der AHR herausgestellt.

Hinsichtlich der Bestimmung der Gesamt-SOD-Aktivität im Plasma zeigten sich bei unseren Untersuchungen nur geringfügige Schwankungen zwischen den Versuchsgruppen. Zur globalen SOD-Analyse wäre es daher interessant, auch die Aktivitäten jeder einzelnen SOD-Unterform separat zu bestimmen und damit ihren Anteil an der Gesamt-SOD zu ermitteln. Darüber hinaus ist bei Asthmatikern nicht nur die Gesamt-SOD-Aktivität der Zirkulation vermindert. Einige Studien belegen auch eine lokalisierte Abnahme der SOD-Aktivität in Epithelzellen asthmatischer Atemwege, im BALF und in BAL-Zellen, welche proportional zum Grad der Atemflusslimitationen ist (Comhair et al. 2000). Vor dem Hintergrund, dass die einzelnen SOD-Unterformen in den verschiedenen Kompartimenten unterschiedlich reguliert werden, sollten zukünftig auch mit BAL und Typ-II-Zellen entsprechende Aktivität-Assays der Gesamt-SOD- und der einzelnen SOD-Unterformen durchgeführt werden.

Das Ausmaß der allergischen Reaktion könnte vom Nitrierungsgrad der verwendeten Allergene beeinflusst werden. Zur Überprüfung dieser Hypothese könnten in zukünftigen Asthmodellen tyrosinreiche Proteine mit unterschiedlichen Nitrierungsgraden eingesetzt werden. Neben KLH kommen beispielsweise die natürlichen Allergene der Birke Bet v 1-A und des Lieschgrases Phl p 6 in Betracht. Auch könnte sich das synthetisch hergestellte Poly-Tyrosin als Modell eines *Nitro-Allergens* eignen, da aufgrund des hohen Molekulargewichts von ca. 40 kDa ein hoher Nitrierungsgrad erreicht werden kann. Beim Vorliegen einer allergischen Reaktion gegen Poly-Nitrotyrosin könnte dieser Befund für eine generalisierte allergische Reaktion gegen alle Nitro-Proteine sprechen.

Neben der Induktion von akutem allergischen Asthma sollten zukünftige Versuche auch Änderungen der physiologischen Reaktionen nach Sensibilisierung und Provokation mit nitrierten Allergenen beim chronischen allergischen Asthma untersuchen. Der Einsatz kurzer, hoher Konzentrationslevel ist zwar experimentell bequem, da diese eine akute

Entzündung des Lungenparenchyms triggern, kommen beim menschlichen Asthma allerdings eher selten vor. Humanes Asthma umfasst vielmehr Langzeitexpositionen mit niedrigen Allergendosen, welche zu einer chronischen Entzündung der Atemwege mit akuten inflammatorischen Phasen führen (Kumar and Foster 2002). Akute Modelle erzeugen meist keine Läsionen, die typisch für das chronische humane Asthma sind. So fehlt die chronische Entzündung der Atemwegswände sowie Merkmale des Atemwegsremodellings in Form von subepithelialer Fibrose, epithelialer Proliferation, Hypertrophie der glatten Muskulatur und Hyperplasie der mukösen Drüsen und Becherzellen (Sumi and Hamid 2007). Bei gleicher Versuchsauswahl könnte das Protokoll zur Induktion eines chronischen allergischen Asthmas folgendermaßen aussehen: Das Sensibilisierungsverfahren entspricht dem des akuten Modells. Die Allergenprovokation erfolgt 5 Tage nach der letzten Sensibilisierung/Provokation an jeweils zwei aufeinanderfolgenden Tagen und wird über 12 Wochen wiederholt. Die Analysen erfolgen einen Tag nach der letzten Allergenprovokation mit den gleichen Methoden, wie für das akute Asthma beschrieben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben zum Verständnis der biochemischen und molekularen Mechanismen bei der Immunantwort auf native und nitrierte Allergene beigetragen. Die dabei gemachte Beobachtung, dass eine umweltbedingte Nitrierung von Allergenen die entzündliche Reaktion gegen diese verstärkt, könnte eine Erklärung für die allgemein beobachtete Zunahme von Allergien und allergischem Asthma darstellen.

5. Zusammenfassung

Die Prävalenz allergischer Erkrankungen hat in den letzten Jahrzehnten stetig zugenommen und stellt heute eine globale Belastung dar, die Menschen jeglichen Alters und ethnischen Hintergrundes betrifft. Aufgrund wachsender medizinischer, sozialer und wirtschaftlicher Probleme gibt es weltweit einen dringenden Bedarf, die Allergieproblematik intensiver anzugehen. Die Suche nach Erklärungen für die beobachtete Zunahme allergischer Erkrankungen führte zu der Umwelt-Hypothese, nach der Umweltschadstoffe in der Atemluft für die steigenden Prävalenzen verantwortlich gemacht werden. Neben direkt und indirekt schädigender Wirkung auf die Atemwege, können sich Luftschadstoffe gegen die Allergene selbst richten und luftübertragene Proteine modifizieren. In diesem Zusammenhang zeigen Experimente, dass Proteine durch atmosphärisches Stickstoffdioxid nitriert werden können und dass eine solche posttranslationale Proteinmodifikation die Immunogenität der Allergene verstärkt. Da die Lunge aufgrund ihrer großen Oberfläche in besonderem Maße gegenüber diesen Fremdstoffen exponiert wird, sind Veränderungen ihrer Struktur und Funktion zu erwarten. Einen weiteren Angriffspunkt stellt der pulmonale Surfactant dar, welcher essentiell für die normale Lungenfunktion ist. All diese Veränderungen können schließlich den Level an oxidativem Stress erhöhen und das physiologische Antioxidantien-Gleichgewicht beeinflussen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte an einem Mausmodell durch Verwendung zweier Allergene in nativer und nitrierter Form (Ovalbumin und Keyhole Limpet Hemocyanin), der Einfluss der Proteinnitrierung auf verschiedene strukturelle, biochemische und molekularbiologische Parameter des allergischen Asthmas untersucht werden. Dazu wurden C57BL-6-Wildtypiere entsprechend des Protokolls zur Induktion eines akuten allergischen Asthmas behandelt und mit PBS / (n)OVA / (n)KLH intraperitoneal sensibilisiert und inhalativ provoziert. Bei einem Teil der Tiere wurde mit Hilfe des FlexiVent®Systems die Atemwegshyperreaktivität gegenüber Methacholin gemessen und die Lungen anschließend histologisch aufgearbeitet. Bei dem anderen Teil der Tiere wurden Plasma und bronchoalveoläre Lavage (BAL) gewonnen sowie Typ-II-Pneumozyten isoliert. Im Plasma wurde die Gesamt-SOD-Aktivität gemessen, mittels Zytospin die BAL-Zytologie ermittelt und aus dem zellfreien Lavage-Überstand Gesamtprotein und Gesamtphospholipid bestimmt. Die

isolierten Typ-II-Pneumozyten wurden mittels Real-time RT-PCR hinsichtlich ihres mRNA-Gehalts an Phospholipid-synthetisierenden Enzymen (Cholinkinase alpha und beta, CTP:Phosphocholin Cytidylyltransferase alpha) und antioxidativen Enzymen der SOD-Untergruppen (CuZnSOD, MnSOD, ECSOD) untersucht. Darüber hinaus wurde in den Typ-II-Zellen der Proteingehalt der MnSOD mittels Western Blot bestimmt.

Der Vergleich der Gruppen OVA/OVA und nOVA/nOVA diente der Beantwortung der Frage, ob nitrierte Allergene in einem kompletten Individuum eine stärkere Entzündungsreaktion hervorrufen als die entsprechenden nicht nitrierten Allergene. Als Ergebnis zeigte sich einerseits, dass die histologischen und zytologischen Veränderungen - in Form von strukturellen Läsionen und zellulären Infiltraten - in der nOVA/nOVA-Gruppe deutlicher ausgeprägter waren als bei den OVA/OVA-Tieren. Darüber hinaus fand sich bei den nOVA/nOVA-Tieren als Ausdruck einer gestörten Integrität und Permeabilität des Lungenepithels ein höherer Gesamtproteingehalt in der BAL. Auf der anderen Seite zeigte sich in den Untersuchungen von Lungenfunktion, Phospholipiden und Superoxiddismutasen keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Anhand des Vergleichs von nOVA/nKLH mit den Gruppen nOVA/KLH und PBS/nKLH sollte die zweite Hauptfragestellung der Arbeit beantwortet werden, ob ein Individuum bei bestehender Sensibilisierung gegen ein definiertes nitriertes Allergen auch gegen andere nitrierte Allergene reagiert. In den Versuchen zeigte die nOVA/nKLH-Gruppe im Gegensatz zu den Kontrollen sowohl in der Histologie als auch in der Zytologie eine entzündliche Reaktion. Weitere Unterschiede gegenüber den Kontrollen wies die nOVA/nKLH-Gruppe in einem leicht erhöhten Gesamtproteingehalts in der BAL sowie eines leicht reduzierten MnSOD-mRNA-Gehaltes in den Typ-II-Pneumozyten auf. Die restlichen Ergebnisse dieser Gruppe entsprachen weitgehend denen der Kontrollen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben zum Verständnis der biochemischen und molekularen Mechanismen bei der Immunantwort auf native und nitrierte Allergene beigetragen. Die dabei gemachten Beobachtungen, dass eine umweltbedingte Nitrierung von Allergenen die entzündliche Reaktion gegen diese verstärkt und dass ein Individuum bei bestehender Sensibilisierung gegen ein definiertes nitriertes Allergen eine Tendenz entwickelt, auch auf ein anderes nitriertes Allergen zu reagieren, könnten eine Erklärung für die allgemein beobachtete Zunahme von Allergien und allergischem Asthma darstellen.

6. Summary

Allergic diseases have increased in prevalence worldwide during the last few decades and are now a global burden that affects people of all ages and ethnic backgrounds. Due to growing medical, social and economic problems, it is becoming increasingly necessary to gain a better understanding of this subject. The search for explanations for the observed increase in allergic disorders has generated the ‘environmental hypothesis’, which suggests that inhaled air pollutants are responsible for the increase in prevalence. In addition to their inflammatory and sensitizing effects on the airway epithelia, air pollutants are also capable of modifying airborne proteins. Recent investigations have shown that tyrosine residues of various proteins are efficiently nitrated by polluted urban air, and that this post-translational modification can alter their immunogenicity and allergenicity. During respiration, the lung is directly exposed to atmospheric air pollutants that can reach the terminal lung tissue. Therefore, alterations of lung structure and function can be expected. Furthermore, another important target for air pollutants is pulmonary surfactant which plays a vital role in pulmonary physiology. All of these changes contribute to increased levels of oxidative stress and impair the respiratory tract antioxidant capacity.

This study analyzes the influence of protein nitration on different structural, biochemical and biomolecular parameters of asthma and allergic disease using nitrated and unmodified samples of the food allergen ovalbumin (OVA) and the metalloprotein keyhole limpet hemocyanin (KLH). All experiments were done on C57BL/6 mice, which were intra-peritoneally sensitized and inhalatively challenged with either PBS, (n)OVA or (n)KLH. Methacholine responsiveness was measured using the FlexiVent® system to assess AHR, subsequently followed by the histological analysis of the lung *ex situ* (hematoxylin and eosin stain, immunohistochemical analysis of CuZnSOD and MnSOD). Plasma and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were collected and type II pneumocytes isolated. The plasma was used for the detection of total SOD activity. The BALF was centrifuged, the supernatant used for the measurement of total protein and total phospholipid, and the cell pellet re-suspended for differential cell counts on cytopins (May-Grünwald/Giemsa stain). Using real time RT-PCR the isolated type II pneumocytes were analyzed regarding their mRNA levels of phospholipide-synthesizing enzymes (choline kinase alpha and beta, CTP:Phosphocholine

Cytidyltransferase alpha) and antioxidative enzymes of the SOD-subunits (CuZnSOD, MnSOD, ECSOD). In addition, western immunoblots were performed for the detection of MnSOD protein within type II cells.

The comparison of the OVA/OVA and nOVA/nOVA groups have answered the question: “Do nitrated allergens induce a more pronounced inflammatory response in a whole individual than the unmodified proteins?” The results of this study showed that the histological changes in the form of structural lesions and cellular infiltrations were far more distinct in the nitrated group than in the unmodified group. Both demonstrated a significant influx of lymphocytes, eosinophils and neutrophils with higher numbers in the nOVA/nOVA group. Moreover, the latter showed a higher increase in total protein in the BALF, which can be interpreted as impaired integrity and permeability of the bronchial epithelia. No inter-group differences were seen in the investigations concerning pulmonary lung function, the amount of total phospholipid and phospholipid synthesizing enzymes, as well as the expression of superoxide dismutases.

To answer the second main question of this study: “Is an individual, after being sensitized against a well-defined nitrated allergen, also responsive to another nitrated allergen of different origin?” nOVA/nKLH was compared to nOVA/KLH and PBS/nKLH which served as control groups. The investigation of the nOVA/nKLH group revealed inflammatory alterations in both histology and cytology, whereas the lungs of control mice showed no pathological changes. More intergroup differences were seen in the amounts of total protein in the BALF and of MnSOD mRNA in type II pneumocytes. The nOVA/nKLH treated mice showed slightly elevated levels of total protein whereas their MnSOD mRNA was somewhat reduced. Apart from these insignificant differences the remaining results were consistent with the control animals.

This work has contributed to the understanding of some biochemical and molecular mechanisms in the immune response to nitrated and unmodified allergens. Collectively, these observations suggest that the environmental nitration of allergens enhances their allergenic potential and that an individual, after being sensitized against a well-defined nitrated allergen, develops a tendency to respond against another nitrated allergen of different origin. These findings could be an explanation for the increased prevalence of allergies and allergic asthma, especially in polluted urban environments.

7. Anhang

7.1. Weiterführende Tabellen

Tabelle 6: Anzahl an Makrophagen in der BAL

	PBS/OVA (n = 10)	PBS/nOVA (n = 10)	OVA/OVA (n = 8)	OVA/nOVA (n = 9)	nOVA/nOVA (n = 8)	PBS/KLH (n = 4)	PBS/nKLH (n = 3)	nKLH/OVA (n = 6)	nKLH/nKLH (n = 3)	OVA/KLH (n = 6)	nOVA/KLH (n = 6)	nOVA/nKLH (n = 7)
Mittelwert	142,70	103,30	68,88	142,44	141,75	118,50	108,00	260,33	95,33	155,50	193,17	218,43
Stabw	123,55	38,12	37,06	91,81	132,75	49,31	73,63	136,54	87,23	80,11	105,30	87,01
SEM	39,07	12,06	13,10	30,60	46,93	24,65	42,51	55,74	50,36	32,70	42,99	32,89
Median	105,00	107,00	58,50	121,00	103,50	109,00	113,00	234,50	48,00	128,50	186,50	209,00
25. Quantil	53,50	77,50	45,25	95,00	86,75	84,25	72,50	186,00	45,00	91,75	132,50	155,50
75. Quantil	170,75	131,75	75,50	177,00	127,50	143,25	146,00	316,75	122,00	226,75	212,75	273,00
Min	25,00	44,00	31,00	37,00	22,00	73,00	32,00	94,00	42,00	81,00	72,00	110,00
Max	396,00	159,00	138,00	356,00	454,00	183,00	179,00	485,00	196,00	256,00	378,00	353,00

Tabelle 7: Anzahl an Lymphozyten in der BAL

	PBS/OVA (n = 10)	PBS/nOVA (n = 10)	OVA/OVA (n = 8)	OVA/nOVA (n = 9)	nOVA/nOVA (n = 8)	PBS/KLH (n = 4)	PBS/nKLH (n = 3)	nKLH/OVA (n = 6)	nKLH/nKLH (n = 3)	OVA/KLH (n = 6)	nOVA/KLH (n = 6)	nOVA/nKLH (n = 7)
Mittelwert	1,10	1,40	10,25	8,56	20,38	0,25	0,00	1,83	8,00	0,33	1,00	3,43
Stabw	1,60	0,84	7,07	8,03	17,57	0,50	0,00	0,98	9,54	0,52	0,63	5,13
SEM	0,50	0,27	2,50	2,68	6,21	0,25	0,00	0,40	5,51	0,21	0,26	1,94
Median	0,50	1,00	9,00	7,00	18,50	0,00	0,00	1,50	3,00	0,00	1,00	2,00
25. Quantil	0,00	1,00	4,00	3,00	7,00	0,00	0,00	1,00	2,50	0,00	1,00	1,00
75. Quantil	1,00	2,00	14,75	8,00	26,75	0,25	0,00	2,75	11,00	0,75	1,00	2,00
Min	0,00	0,00	3,00	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00	2,00	0,00	0,00	1,00
Max	4,00	3,00	20,00	23,00	52,00	1,00	0,00	3,00	19,00	1,00	2,00	15,00

Tabelle 8: Anzahl an eosinophilen Granulozyten in der BAL

	PBS/OVA (n = 10)	PBS/nOVA (n = 10)	OVA/OVA (n = 8)	OVA/nOVA (n = 9)	nOVA/nOVA (n = 8)	PBS/KLH (n = 4)	PBS/nKLH (n = 3)	nKLH/OVA (n = 6)	nKLH/nKLH (n = 3)	OVA/KLH (n = 6)	nOVA/KLH (n = 6)	nOVA/nKLH (n = 7)
Mittelwert	0,60	0,00	365,50	278,33	861,00	1,75	3,67	29,00	1370,00	5,17	18,67	192,57
Stabw	1,58	0,00	267,34	500,06	651,28	0,50	5,51	30,61	680,55	5,08	29,01	464,50
SEM	0,50	0,00	94,52	166,69	230,26	0,25	3,18	12,50	392,92	2,07	11,84	175,56
Median	0,00	0,00	296,50	85,00	684,50	2,00	1,00	18,00	1106,00	4,50	8,00	7,00
25. Quantil	0,00	0,00	162,75	48,00	383,25	1,75	0,50	10,50	983,50	0,75	3,00	4,50
75. Quantil	0,00	0,00	550,50	137,00	1448,50	2,00	5,50	30,75	1624,50	9,00	13,75	42,50
Min	0,00	0,00	58,00	13,00	96,00	1,00	0,00	7,00	861,00	0,00	2,00	2,00
Max	5,00	0,00	800,00	1567,00	1746,00	2,00	10,00	88,00	2143,00	12,00	77,00	1245,00

Tabelle 9 Anzahl an neutrophilen Granulozyten in der BAL

	PBS/OVA (n = 10)	PBS/nOVA (n = 10)	OVA/OVA (n = 8)	OVA/nOVA (n = 9)	nOVA/nOVA (n = 8)	PBS/KLH (n = 4)	PBS/nKLH (n = 3)	nKLH/OVA (n = 6)	nKLH/nKLH (n = 3)	OVA/KLH (n = 6)	nOVA/KLH (n = 6)	nOVA/nKLH (n = 7)
Mittelwert	0,00	0,00	6,50	5,67	23,25	0,00	0,00	0,33	9,00	0,17	0,00	1,29
Stabw	0,00	0,00	6,35	8,09	24,11	0,00	0,00	0,52	6,93	0,41	0,00	3,40
SEM	0,00	0,00	2,24	2,70	8,52	0,00	0,00	0,21	4,00	0,17	0,00	1,29
Median	0,00	0,00	5,00	2,00	16,00	0,00	0,00	0,00	5,00	0,00	0,00	0,00
25. Quantil	0,00	0,00	3,00	1,00	3,50	0,00	0,00	0,00	5,00	0,00	0,00	0,00
75. Quantil	0,00	0,00	8,25	5,00	38,75	0,00	0,00	0,75	11,00	0,00	0,00	0,00
Min	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	5,00	0,00	0,00	0,00
Max	0,00	0,00	19,00	22,00	66,00	0,00	0,00	1,00	17,00	1,00	0,00	9,00

Tabelle 10: Gesamtzellzahl in der BAL

	PBS/OVA (n = 10)	PBS/nOVA (n = 10)	OVA/OVA (n = 8)	OVA/nOVA (n = 9)	nOVA/nOVA (n = 8)	PBS/KLH (n = 4)	PBS/nKLH (n = 3)	nKLH/OVA (n = 6)	nKLH/nKLH (n = 3)	OVA/KLH (n = 6)	nOVA/KLH (n = 6)	nOVA/nKLH (n = 7)
Mittelwert	144,40	104,70	451,13	435,00	1073,38	120,50	111,67	291,50	1482,33	161,17	212,83	415,71
Stabw	126,14	37,79	262,89	593,62	833,06	49,95	78,53	129,61	783,27	84,81	107,86	516,09
SEM	39,89	11,95	92,95	197,87	294,53	24,97	45,34	52,91	452,22	34,62	44,04	195,06
Median	105,50	108,00	386,50	227,00	808,50	110,50	114,00	243,50	1162,00	133,50	225,00	268,00
25. Quantil	53,50	78,75	257,25	151,00	488,50	85,50	73,00	202,50	1036,00	94,00	148,75	160,00
75. Quantil	171,75	134,25	626,25	285,00	1635,75	145,50	151,50	333,25	1768,50	234,50	239,00	318,50
Min	25,00	46,00	124,00	117,00	211,00	75,00	32,00	186,00	910,00	81,00	74,00	115,00
Max	405,00	159,00	882,00	1968,00	2500,00	186,00	189,00	524,00	2375,00	270,00	386,00	1570,00

Tabelle 11: Prozentuale Verteilung der BAL Zellen in Prozent

	PBS/OVA (n = 10)	PBS/nOVA (n = 10)	OVA/OVA (n = 8)	OVA/nOVA (n = 9)	nOVA/nOVA (n = 8)	PBS/KLH (n = 4)	PBS/nKLH (n = 3)	nKLH/OVA (n = 6)	nKLH/nKLH (n = 3)	OVA/KLH (n = 6)	nOVA/KLH (n = 6)	nOVA/nKLH (n = 7)
Makrophagen	98,82	98,66	15,27	32,75	13,55	98,34	96,72	89,31	6,43	96,48	90,76	52,54
Lymphozyten	0,76	1,34	2,27	1,97	1,95	0,21	0,00	0,63	0,54	0,21	0,47	0,82
Eosinophile	0,42	0,00	81,02	63,98	82,28	1,45	3,28	9,95	92,42	3,21	8,77	46,32
Neutrophile	0,00	0,00	1,44	1,30	2,22	0,00	0,00	0,11	0,61	0,10	0,00	0,31

Tabelle 12: Gesamtprotein in der BAL in µg/ml

	PBS/OVA (n = 11)	PBS/nOVA (n = 12)	OVA/OVA (n = 10)	OVA/nOVA (n = 9)	nOVA/nOVA (n = 9)	PBS/KLH (n = 6)	PBS/nKLH (n = 3)	nKLH/OVA (n = 8)	nKLH/nKLH (n = 3)	OVA/KLH (n = 8)	nOVA/KLH (n = 7)	nOVA/nKLH (n = 6)
Mittelwert	184,01	190,45	401,91	339,82	493,19	186,44	142,45	182,38	377,10	172,72	180,29	246,00
Stabw	39,40	21,07	102,89	132,13	159,97	59,94	19,73	26,67	20,27	26,41	23,56	101,48
SEM	11,88	6,08	32,54	44,04	53,32	24,47	11,39	9,43	11,71	9,34	8,91	41,43

Tabelle 13: Gesamtphospholipid in der BAL in µg/100 µl

	PBS/OVA (n = 9)	PBS/nOVA (n = 11)	OVA/OVA (n = 8)	OVA/nOVA (n = 8)	nOVA/nOVA (n = 8)	PBS/KLH (n = 6)	PBS/nKLH (n = 3)	nKLH/OVA (n = 8)	nKLH/nKLH (n = 3)	OVA/KLH (n = 8)	nOVA/KLH (n = 7)	nOVA/nKLH (n = 7)
Mittelwert	18,28	17,78	10,70	10,39	11,33	18,27	14,59	17,91	13,00	15,81	17,41	15,92
Stabw	4,40	2,58	2,19	2,38	2,08	5,22	1,25	2,07	4,78	2,16	3,08	1,25
SEM	1,47	0,78	0,77	0,84	0,74	2,13	0,72	0,73	2,76	0,76	1,17	0,47

Tabelle 14: mRNA-Expression der CTP: Phosphocholin Cytidyltransferase alpha in Typ-II-Pneumozyten in Prozent

	PBS/nOVA (n = 4)	OVA/OVA (n = 3)	OVA/nOVA (n = 4)	nOVA/nOVA (n = 4)	PBS/nKLH (n = 3)	nKLH/nKLH (n = 3)	nOVA/KLH (n = 3)	nOVA/nKLH (n = 4)
Mittelwert	100,00	47,71	44,96	36,70	81,25	99,50	52,91	86,67
Stabw	36,11	10,40	14,05	13,50	20,94	11,90	17,71	45,39
SEM	18,05	6,00	7,02	6,75	12,09	6,87	10,22	22,70

Tabelle 15: mRNA-Expression der Cholinkinase alpha in Typ-II-Pneumozyten in Prozent

	PBS/nOVA (n = 4)	OVA/OVA (n = 3)	OVA/nOVA (n = 3)	nOVA/nOVA (n = 4)	PBS/nKLH (n = 3)	nKLH/nKLH (n = 3)	nOVA/KLH (n = 3)	nOVA/nKLH (n = 4)
Mittelwert	100,00	23,69	16,96	27,42	117,34	140,39	224,95	225,56
Stabw	24,47	15,75	5,32	22,48	22,81	92,32	66,98	103,04
SEM	12,23	9,09	3,07	11,24	13,17	53,30	38,67	51,52

Tabelle 16: mRNA-Expression der Cholinkinase beta in Typ-II-Pneumozyten in Prozent

	PBS/nOVA	OVA/OVA	OVA/nOVA	nOVA/nOVA	PBS/nKLH	nKLH/nKLH	nOVA/KLH	nOVA/nKLH
	(n = 3)	(n = 3)	(n = 4)	(n = 4)	(n = 3)	(n = 3)	(n = 3)	(n = 3)
Mittelwert	100,00	176,86	147,31	136,89	75,23	122,56	163,25	172,51
Stabw	55,29	40,14	53,01	40,53	13,66	55,89	72,11	63,54
SEM	31,92	23,18	26,50	20,27	7,88	32,27	41,63	36,69

Tabelle 17: Gesamt-SOD-Aktivität im Plasma als Inhibierungsrate von Superoxidanionen in Prozent

	PBS/nOVA	OVA/OVA	OVA/nOVA	nOVA/nOVA	PBS/nKLH	nKLH/nKLH	nOVA/KLH	nOVA/nKLH
	(n = 4)	(n = 4)	(n = 5)	(n = 4)	(n = 3)	(n = 3)	(n = 5)	(n = 3)
Mittelwert	31,29	34,11	30,63	37,07	31,72	29,67	33,38	33,70
Stabw	3,13	5,40	2,54	1,44	1,04	3,38	3,46	3,34
SEM	1,57	2,70	1,13	0,72	0,60	1,95	1,55	1,67

Tabelle 18 : mRNA-Expression der CuZnSOD in Typ-II-Pneumozyten in Prozent

	PBS/nOVA	OVA/OVA	OVA/nOVA	nOVA/nOVA	PBS/nKLH	nKLH/nKLH	nOVA/KLH	nOVA/nKLH
	(n = 4)	(n = 3)	(n = 4)	(n = 4)	(n = 3)	(n = 3)	(n = 3)	(n = 4)
Mittelwert	100,00	48,27	51,50	49,31	123,23	95,29	124,75	125,65
Stabw	9,86	5,56	12,55	3,20	17,96	7,67	54,77	16,78
SEM	4,93	3,21	6,27	1,60	10,37	4,43	31,62	8,39

Tabelle 19: mRNA-Expression der MnSOD in Typ-II-Pneumozyten in Prozent

	PBS/nOVA	OVA/OVA	OVA/nOVA	nOVA/nOVA	PBS/nKLH	nKLH/nKLH	nOVA/KLH	nOVA/nKLH
	(n = 4)	(n = 3)	(n = 3)	(n = 4)	(n = 3)	(n = 3)	(n = 3)	(n = 4)
Mittelwert	1,03	0,56	0,49	0,68	0,91	0,47	1,11	0,74
Stabw	0,29	0,25	0,20	0,26	0,16	0,16	0,07	0,15
SEM	0,14	0,14	0,11	0,13	0,09	0,09	0,04	0,08

Tabelle 20: mRNA-Expression der ECSOD in Typ-II-Pneumozyten in Prozent

	PBS/nOVA	OVA/OVA	OVA/nOVA	nOVA/nOVA	PBS/nKLH	nKLH/nKLH	nOVA/KLH	nOVA/nKLH
	(n = 3)	(n = 3)	(n = 3)	(n = 4)	(n = 3)	(n = 3)	(n = 3)	(n = 4)
Mittelwert	100,00	101,71	57,39	76,44	132,25	154,67	151,39	159,13
Stabw	9,73	60,73	33,05	22,02	47,88	71,86	57,28	50,57
SEM	5,62	35,06	19,08	11,01	27,64	41,49	33,07	25,28

7.2. Abkürzungsverzeichnis

AAG	Alkyl-Acylglycerol
ADP	Adenosindiphosphat
AHR	Atemwegshyperreagibilität
AK	Antikörper
Alum	Aluminiumhydroxid (Al(OH) ₃)
anti-ACTB	anti-Aktin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARDS	Adult respiratory distress syndrome
ASM	glatte Atemwegsmuskulatur
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit
BCA	Bicinchoninic acid
Bet V 1-A	Birken (<i>Betula verrucosa</i>)-Pollenallergen
BMFZ	Biomedizinisches Forschungszentrum
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	Beziehungsweise
C	Celsius
Ca	Kalzium
ca.	Circa
CCT	CTP: Phosphocholin Cytidyltransferase
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDP	Cytidindiphosphat
CK	Cholinkinase
cm	Centimeter
cmH ₂ O	centimer of water
CMP	Cytidin-5'-monophosphat
CTP	Cytidintriphosphat
CT-Wert	Cycle Threshold
CuZnSOD (SOD1)	Kupfer-Zink-SOD

DAG	Diacylglycerol
DALYs	Disability Adjusted Life Years
dest	destillata
dl	Deziliter
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DP	Dissoziationspuffer
ECP	Eosinophiles kationisches Protein
ECSOD (SOD3)	Extrazelluläre SOD
EDTA	Ethylenediaminetetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	und andere
FCS	Fetales Kälberserum
FcεRI	Hochaffiner IgE-Rezeptor
FcεRII	Niedrigaffiner IgE-Rezeptor
for	forward
h	Stunde
H ⁺	Proton
HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxylin Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HKG	Housekeeping Gen
H ₂ O ₂	Hydrogenperoxid
IE	Internationale Einheit
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRDS	Infant respiratory distress syndrome
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
M	molare Masse

mA	Milliampere
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
MnSOD (SOD2)	Mangan-SOD
MPI	Max-Planck-Institut
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Tierzahl
N	Stickstoff
Na	Natrium
NaOH	Natronlauge
NFκB	Nuklearfaktor κB
(n)KLH	(nitriertes) Keyhole Limpet Hemocyanin
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂	Stickstoffdioxid
(n)OVA	(nitriertes) Ovalbumin
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxid
OD	Optische Dichte
OH	Hydroxylradikal
⁻ ONOO ⁻	Peroxynitrit
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
Peak Flow	Strömungsgeschwindigkeit der Atemluft
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PEEP	positiver endexpiratorischer Druck
Pmax	maximaler Druck
ppm	parts per million
PP _i	Pyrophosphat

PRR	Pattern-Recognition Receptor
Real-time RT-PCR	Real-time Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
rev	revers
RKI	Robert Koch Institut
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RpL32	Ribosomales Protein L32
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
s.	Siehe
SDS	Dodecylsulfat Na-Salz
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler des Mittelwerts)
SOD	Superoxiddismutase
SP	Surfactantprotein
Stabw	Standardabweichung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T _H 1-Zellen	Typ1-T-Helferzellen
T _H 2-Zellen	Typ2-T-Helferzellen
TLR	Toll-Like Rezeptoren
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
USA	United States of America
vgl.	vergleiche
vs	versus
V _t	Tidalvolumen
μ	Mikro
%	Prozent
Δ	Delta

7.3. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

Abbildung 1: Zeitschema zur experimentellen Induktion eines akuten allergischen Asthmas	30
Abbildung 2: Messung der Resistance als Maß der Atemwegshyperreaktivität in Prozent	64
Abbildung 3a: Lichtmikroskopische Darstellung von repräsentativen Lungen-Paraffinschnitten der OVA-Gruppen	66
Abbildung 3b: Lichtmikroskopische Darstellung von repräsentativen Lungen-Paraffinschnitten der KLH-Gruppen	67
Abbildung 4a: Lichtmikroskopische Darstellung von repräsentativen Zytospinpräparaten der OVA-Gruppen	69
Abbildung 4b: Lichtmikroskopische Darstellung von repräsentativen Zytospinpräparaten der KLH-Gruppen	70
Abbildung 5: Anzahl an Makrophagen in der BAL	71
Abbildung 6: Anzahl an Lymphozyten in der BAL	71
Abbildung 7: Anzahl an Eosinophilen in der BAL	72
Abbildung 8: Anzahl an Neutrophilen in der BAL	72
Abbildung 9: Gesamtzellzahl der BAL	73
Abbildung 10: Prozentuale Verteilung der in der BAL enthaltenen Zellpopulationen innerhalb einer Gruppe	76
Abbildung 11: Gesamtproteinmenge in der BAL	77
Abbildung 12: Gesamtpospholipidmenge in der BAL	79
Abbildung 13: Real-time RT-PCR der CTP: Phosphocholin Cytidylyltransferase alpha in Typ-II-Pneumozyten	80

Abbildung 14: Real-time RT-PCR der Cholinase alpha in Typ-II-Pneumozyten	81
Abbildung 15: Real-time RT-PCR der Cholinase beta in Typ-II-Pneumozyten	82
Abbildung 16: Gesamt-SOD-Aktivität im Plasma	84
Abbildung 17a: Immunhistochemische Detektion der CuZnSOD in repräsentativen Lungen-Paraffinschnitten der OVA-Gruppen	85
Abbildung 17b: Immunhistochemische Detektion der CuZnSOD in repräsentativen Lungen-Paraffinschnitten der KLH-Gruppen	86
Abbildung 18: Real-time RT-PCR der CuZnSOD in Typ-II-Pneumozyten	87
Abbildung 19a: Immunhistochemische Detektion der MnSOD in repräsentativen Lungen-Paraffinschnitten der OVA-Gruppen	89
Abbildung 19b: Immunhistochemische Detektion der MnSOD in repräsentativen Lungen-Paraffinschnitten der KLH-Gruppen	90
Abbildung 20: Real-time RT-PCR der MnSOD in Typ-II-Pneumozyten	91
Abbildung 21: Western Blot der MnSOD in Typ-II-Pneumozyten. Vergleich der Gruppen PBS/nOVA und nOVA/nOVA.	93
Abbildung 22: Western Blot der MnSOD in Typ-II-Pneumozyten. Vergleich der Gruppen PBS/nKLH und nKLH/nKLH.	94
Abbildung 23: Western Blot der MnSOD in Typ-II-Pneumozyten. Vergleich der Gruppen nOVA/KLH und nOVA/nKLH.	95
Abbildung 24: Western Blot der MnSOD in Typ-II-Pneumozyten. Vergleich der Gruppen nOVA/nKLH und nOVA/nOVA.	96
Abbildung 25: Real-time RT-PCR der ECSOD in Typ-II-Pneumozyten	97

Tabellen:

Tabelle 1: OVA-Versuchsgruppen und Behandlungssubstanzen für Sensibilisierung und Provokation	30
Tabelle 2: KLH-Versuchsgruppen und Behandlungssubstanzen für Sensibilisierung und Provokation	31
Tabelle 3: Zur Immunhistochemie verwendete Primärantikörper sowie deren eingesetzten Konzentrationen	36
Tabelle 4: Zum Western Blot verwendete Primär- und Sekundärantikörper sowie deren eingesetzten Konzentrationen	59
Tabelle 5: Differentialzellzahlen der BAL	74
Tabelle 6: Anzahl an Makrophagen in der BAL	129
Tabelle 7: Anzahl an Lymphozyten in der BAL	131
Tabelle 8: Anzahl an eosinophilen Granulozyten in der BAL	131
Tabelle 9: Anzahl an neutrophilen Granulozyten in der BAL	131
Tabelle 10: Gesamtzellzahl in der BAL	132
Tabelle 11: Prozentuale Verteilung der BAL Zellen in Prozent	132
Tabelle 12: Gesamtprotein in der BAL in $\mu\text{g/ml}$	132
Tabelle 13: Gesamtpospholipid in der BAL in $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$	132
Tabelle 14: mRNA-Expression der CTP: Phosphocholin Cytidyltransferase alpha in Typ-II-Pneumozyten in Prozent	132
Tabelle 15: mRNA-Expression der Cholinkinase alpha in Typ-II-Pneumozyten in Prozent	132

Tabelle 16:	133
mRNA-Expression der Cholinkinase beta in Typ-II-Pneumozyten in Prozent	
Tabelle 17:	133
Gesamt-SOD-Aktivität im Plasma als Inhibierungsrate von Superoxidanionen in Prozent	
Tabelle 18:	133
mRNA-Expression der CuZnSOD in Typ-II-Pneumozyten in Prozent	
Tabelle 19:	133
mRNA-Expression der MnSOD in Typ-II-Pneumozyten in Prozent	
Tabelle 20:	133
mRNA-Expression der ECSOD in Typ-II-Pneumozyten in Prozent	

7.4. Literaturverzeichnis

- Abello, N., H. A. Kerstjens, D. S. Postma & R. Bischoff (2009) Protein tyrosine nitration: selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins. *J Proteome Res*, 8, 3222-38.
- Accordini, S., A. Corsico, I. Cerveri, D. Gislason, A. Gulsvik, C. Janson, D. Jarvis, A. Marcon, I. Pin, P. Vermeire, E. Almar, M. Bugiani, L. Cazzoletti, E. Duran-Tauleria, R. Jögi, A. Marinoni, J. Martínez-Moratalla, B. Leynaert, R. de Marco & T. a. H. E. W. G. o. t. E. C. R. H. S. II (2008) The socio-economic burden of asthma is substantial in Europe. *Allergy*, 63, 116-24.
- Ackerman, K. G., H. Huang, H. Grasemann, C. Puma, J. B. Singer, A. E. Hill, E. Lander, J. H. Nadeau, G. A. Churchill, J. M. Drazen & D. R. Beier (2005) Interacting genetic loci cause airway hyperresponsiveness. *Physiol Genomics*, 21, 105-11.
- Alvarez, B., V. Demicheli, R. Durán, M. Trujillo, C. Cerveñansky, B. A. Freeman & R. Radi (2004) Inactivation of human Cu,Zn superoxide dismutase by peroxynitrite and formation of histidinyl radical. *Free Radic Biol Med*, 37, 813-22.
- Anandan, C., U. Nurmatov, O. C. van Schayck & A. Sheikh (2010) Is the prevalence of asthma declining? Systematic review of epidemiological studies. *Allergy*, 65, 152-67.
- Andreadis, A. A., S. L. Hazen, S. A. Comhair & S. C. Erzurum (2003) Oxidative and nitrosative events in asthma. *Free Radic Biol Med*, 35, 213-25.
- Andreeva, A. V., M. A. Kutuzov & T. A. Voino-Yasenetskaya (2007) Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 293, L259-71.
- Aoyama, C., H. Liao & K. Ishidate (2004) Structure and function of choline kinase isoforms in mammalian cells. *Prog Lipid Res*, 43, 266-81.
- Aoyama, C., N. Yamazaki, H. Terada & K. Ishidate (2000) Structure and characterization of the genes for murine choline/ethanolamine kinase isozymes alpha and beta. *J Lipid Res*, 41, 452-64.

- Arbour, N. C., E. Lorenz, B. C. Schutte, J. Zabner, J. N. Kline, M. Jones, K. Frees, J. L. Watt & D. A. Schwartz (2000) TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet*, 25, 187-91.
- Asher, M. I., S. Montefort, B. Björkstén, C. K. Lai, D. P. Strachan, S. K. Weiland, H. Williams & I. P. T. S. Group (2006) Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*, 368, 733-43.
- Baldini, M., I. C. Lohman, M. Halonen, R. P. Erickson, P. G. Holt & F. D. Martinez (1999) A Polymorphism* in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 20, 976-83.
- Bartlett, G. R. (1959) Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem*, 234, 466-8.
- Bates, J. H., M. Rincon & C. G. Irvin (2009) Animal models of asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 297, L401-10.
- Bernstein, J. A., N. Alexis, C. Barnes, I. L. Bernstein, A. Nel, D. Peden, D. Diaz-Sanchez, S. M. Tarlo & P. B. Williams (2004) Health effects of air pollution. *J Allergy Clin Immunol*, 114, 1116-23.
- Bevelander, M., J. Mayette, L. A. Whittaker, S. A. Paveglio, C. C. Jones, J. Robbins, D. Hemenway, S. Akira, S. Uematsu & M. E. Poynter (2007) Nitrogen dioxide promotes allergic sensitization to inhaled antigen. *J Immunol*, 179, 3680-8.
- Birnboim, H. C., A. M. Lemay, D. K. Lam, R. Goldstein & J. R. Webb (2003) Cutting edge: MHC class II-restricted peptides containing the inflammation-associated marker 3-nitrotyrosine evade central tolerance and elicit a robust cell-mediated immune response. *J Immunol*, 171, 528-32.
- Bossé, Y., E. P. Riesenfeld, P. D. Paré & C. G. Irvin (2010) It's not all smooth muscle: non-smooth-muscle elements in control of resistance to airflow. *Annu Rev Physiol*, 72, 437-62.
- Bradding, P., A. F. Walls & S. T. Holgate (2006) The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 117, 1277-84.

- Braun-Fahrländer, C., J. Riedler, U. Herz, W. Eder, M. Waser, L. Grize, S. Maisch, D. Carr, F. Gerlach, A. Bufe, R. P. Lauener, R. Schierl, H. Renz, D. Nowak, E. von Mutius & A. a. E. S. Team (2002) Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med*, 347, 869-77.
- Brunekreef, B. (2001) NO₂: the gas that won't go away. *Clin Exp Allergy*, 31, 1170-2.
- Bråbäck, L. & B. Forsberg (2009) Does traffic exhaust contribute to the development of asthma and allergic sensitization in children: findings from recent cohort studies. *Environ Health*, 8, 17.
- Bucchieri, F., S. M. Puddicombe, J. L. Lordan, A. Richter, D. Buchanan, S. J. Wilson, J. Ward, G. Zummo, P. H. Howarth, R. Djukanović, S. T. Holgate & D. E. Davies (2002) Asthmatic bronchial epithelium is more susceptible to oxidant-induced apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 27, 179-85.
- Busse, W. W., R. F. Lemanske & J. E. Gern (2010) Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations. *Lancet*, 376, 826-34.
- Bystrom, J., K. Amin & D. Bishop-Bailey (2011) Analysing the eosinophil cationic protein--a clue to the function of the eosinophil granulocyte. *Respir Res*, 12, 10.
- Caucig, P., D. Teschner, S. Dinges, J. H. Maxeiner, S. Reuter, S. Finotto, C. Taube & E. von Stebut (2010) Dual role of interleukin-1alpha in delayed-type hypersensitivity and airway hyperresponsiveness. *Int Arch Allergy Immunol*, 152, 303-12.
- Chang, L. Y., B. H. Kang, J. W. Slot, R. Vincent & J. D. Crapo (1995) Immunocytochemical localization of the sites of superoxide dismutase induction by hyperoxia in rat lungs. *Lab Invest*, 73, 29-39.
- Chomczynski, P. & N. Sacchi (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*, 1, 581-5.
- Chronos, Z. C., Z. Sever-Chronos & V. L. Shepherd (2010) Pulmonary surfactant: an immunological perspective. *Cell Physiol Biochem*, 25, 13-26.
- Ciencewicki, J., S. Trivedi & S. R. Kleeberger (2008) Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 122, 456-68; quiz 469-70.
- Cinci, L., E. Masini, A. Bencini, B. Valtancoli, R. Mastroianni, L. Calosi & D. Bani (2010) Suppression of allergen-induced respiratory dysfunction and airway

- inflammation in sensitized guinea pigs by Mn(II)(Me(2)DO2A), a novel superoxide scavenger compound. *Free Radic Biol Med*, 48, 1525-34.
- Clay, M. M., D. Pavia, S. P. Newman & S. W. Clarke (1983) Factors influencing the size distribution of aerosols from jet nebulisers. *Thorax*, 38, 755-9.
- Comhair, S. A., P. R. Bhathena, R. A. Dweik, M. Kavuru & S. C. Erzurum (2000) Rapid loss of superoxide dismutase activity during antigen-induced asthmatic response. *Lancet*, 355, 624.
- Comhair, S. A. & S. C. Erzurum (2002) Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 283, L246-55.
- Comhair, S. A. & S. C. Erzurum (2010) Redox control of asthma: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 12, 93-124.
- Comhair, S. A., K. S. Ricci, M. Arroliga, A. R. Lara, R. A. Dweik, W. Song, S. L. Hazen, E. R. Bleeker, W. W. Busse, K. F. Chung, B. Gaston, A. Hastie, M. Hew, N. Jarjour, W. Moore, S. Peters, W. G. Teague, S. E. Wenzel & S. C. Erzurum (2005a) Correlation of systemic superoxide dismutase deficiency to airflow obstruction in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 172, 306-13.
- Comhair, S. A., W. Xu, S. Ghosh, F. B. Thunnissen, A. Almasan, W. J. Calhoun, A. J. Janocha, L. Zheng, S. L. Hazen & S. C. Erzurum (2005b) Superoxide dismutase inactivation in pathophysiology of asthmatic airway remodeling and reactivity. *Am J Pathol*, 166, 663-74.
- Committee, E. C. R. H. S. I. S. (2002) The European Community Respiratory Health Survey II. *Eur Respir J*, 20, 1071-9.
- Cookson, W. O. & J. M. Hopkin (1988) Dominant inheritance of atopic immunoglobulin-E responsiveness. *Lancet*, 1, 86-8.
- Corti, M., A. R. Brody & J. H. Harrison (1996) Isolation and primary culture of murine alveolar type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 14, 309-15.
- Crapo, J. D. & J. S. Stamler (1994) Signaling by nonreceptor surface-mediated redox-active biomolecules. *J Clin Invest*, 93, 2304.
- D'Amato, G. (2000) Urban air pollution and plant-derived respiratory allergy. *Clin Exp Allergy*, 30, 628-36.
- Devalia, J. L., C. Rusznak & R. J. Davies (1998) Allergen/irritant interaction--its role in sensitization and allergic disease. *Allergy*, 53, 335-45.

- Di Giampaolo, L., C. Quecchia, C. Schiavone, E. Cavallucci, A. Renzetti, M. Braga & M. Di Gioacchino (2011) Environmental pollution and asthma. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 24, 31S-38S.
- Doyle, H. A. & M. J. Mamula (2005) Posttranslational modifications of self-antigens. *Ann N Y Acad Sci*, 1050, 1-9.
- Duhme, H., S. K. Weiland, P. Rudolph, A. Wienke, A. Kramer & U. Keil (1998) Asthma and allergies among children in West and East Germany: a comparison between Münster and Greifswald using the ISAAC phase I protocol. International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *Eur Respir J*, 11, 840-7.
- Enhorning, G. (2008) Surfactant in airway disease. *Chest*, 133, 975-80.
- Franze, T., M. G. Weller, R. Niessner & U. Poschl (2004) Comparison of nitrotyrosine antibodies and development of immunoassays for the detection of nitrated proteins. *Analyst*, 129, 589-96.
- Franze, T., M. G. Weller, R. Niessner & U. Pöschl (2003) Enzyme immunoassays for the investigation of protein nitration by air pollutants. *Analyst*, 128, 824-31.
- Franze, T., M. G. Weller, R. Niessner & U. Pöschl (2005) Protein nitration by polluted air. *Environ Sci Technol*, 39, 1673-8.
- Furuse, M. (2010) Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a002907.
- Gaffin, J. M. & W. Phipatanakul (2009) The role of indoor allergens in the development of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 9, 128-35.
- Garn, H. & H. Renz (2007) Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis. *Immunobiology*, 212, 441-52.
- Gettins, P. G. (2002) Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev*, 102, 4751-804.
- Gibellini, F. & T. K. Smith (2010) The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life*, 62, 414-28.
- Gould, H. J. & B. J. Sutton (2008) IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol*, 8, 205-17.
- Greenacre, S. A. & H. Ischiropoulos (2001) Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radic Res*, 34, 541-81.

- Griese, M. (1999) Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J*, 13, 1455-76.
- Gruijthuijsen, Y. K., I. Grieshuber, A. Stöcklinger, U. Tischler, T. Fehrenbach, M. G. Weller, L. Vogel, S. Vieths, U. Pöschl & A. Duschl (2006) Nitration enhances the allergenic potential of proteins. *Int Arch Allergy Immunol*, 141, 265-75.
- Gueders, M. M., G. Paulissen, C. Crahay, F. Quesada-Calvo, J. Hacha, C. Van Hove, K. Tournoy, R. Louis, J. M. Foidart, A. Noël & D. D. Cataldo (2009) Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. *Inflamm Res*, 58, 845-54.
- Guilbert, T. W. & L. C. Denlinger (2010) Role of infection in the development and exacerbation of asthma. *Expert Rev Respir Med*, 4, 71-83.
- Guth, D. J. & R. D. Mavis (1985) Biochemical assessment of acute nitrogen dioxide toxicity in rat lung. *Toxicol Appl Pharmacol*, 81, 128-38.
- Halliday, H. L. (2008) Surfactants: past, present and future. *J Perinatol*, 28 Suppl 1, S47-56.
- Hammad, H. & B. N. Lambrecht (2008) Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol*, 8, 193-204.
- Harris, J. R. & J. Markl (1999) Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron*, 30, 597-623.
- Hochscheid, R., S. Heinrichs, S. Kranz, H. Garn & B. Müller (2002) Differences in mRNA expression, protein content, and enzyme activity of superoxide dismutases in type II pneumocytes of acute and chronic lung injury. *Free Radic Res*, 36, 759-67.
- Hohlfeld, J. M. (2002) The role of surfactant in asthma. *Respir Res*, 3, 4.
- Holgate, S. T. (2011) The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis. *Immunol Rev*, 242, 205-19.
- Huntington, J. A. & P. E. Stein (2001) Structure and properties of ovalbumin. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 756, 189-98.
- Ichinose, T. & M. Sagai (1989) Biochemical effects of combined gases of nitrogen dioxide and ozone. III. Synergistic effects on lipid peroxidation and

- antioxidative protective systems in the lungs of rats and guinea pigs. *Toxicology*, 59, 259-70.
- Iijima, H., A. Duguet, S. Y. Eum, Q. Hamid & D. H. Eidelman (2001) Nitric oxide and protein nitration are eosinophil dependent in allergen-challenged mice. *Am J Respir Crit Care Med*, 163, 1233-40.
- Kawakami, T. & S. J. Galli (2002) Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat Rev Immunol*, 2, 773-86.
- KENNEDY, E. P. & S. B. WEISS (1956) The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem*, 222, 193-214.
- Kim, H. Y., R. H. DeKruyff & D. T. Umetsu (2010) The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*, 11, 577-84.
- Kinnula, V. L. & J. D. Crapo (2003) Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med*, 167, 1600-19.
- Kips, J. C., G. P. Anderson, J. J. Fredberg, U. Herz, M. D. Inman, M. Jordana, D. M. Kemeny, J. Lötvall, R. A. Pauwels, C. G. Plopper, D. Schmidt, P. J. Sterk, A. J. Van Oosterhout, B. B. Vargaftig & K. F. Chung (2003) Murine models of asthma. *Eur Respir J*, 22, 374-82.
- Krämer, U., J. Heinrich, M. Wjst & H. E. Wichmann (1999) Age of entry to day nursery and allergy in later childhood. *Lancet*, 353, 450-4.
- Kumar, R. K. & P. S. Foster (2002) Modeling allergic asthma in mice: pitfalls and opportunities. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 27, 267-72.
- Lambrecht, B. N. & H. Hammad (2010) The role of dendritic and epithelial cells as master regulators of allergic airway inflammation. *Lancet*, 376, 835-43.
- Ledford, J. G., A. M. Pastva & J. R. Wright (2010) Review: Collectins link innate and adaptive immunity in allergic airway disease. *Innate Immun*, 16, 183-90.
- Leigh, R., R. Ellis, J. N. Wattie, J. A. Hirota, K. I. Matthaei, P. S. Foster, P. M. O'Byrne & M. D. Inman (2004) Type 2 cytokines in the pathogenesis of sustained airway dysfunction and airway remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med*, 169, 860-7.
- Li, C. & H. M. Zhou (2011) The role of manganese superoxide dismutase in inflammation defense. *Enzyme Res*, 2011, 387176.

- Li, Z. & D. E. Vance (2008) Phosphatidylcholine and choline homeostasis. *J Lipid Res*, 49, 1187-94.
- Liu, M., L. Wang & G. Enhorning (1995) Surfactant dysfunction develops when the immunized guinea-pig is challenged with ovalbumin aerosol. *Clin Exp Allergy*, 25, 1053-60.
- Liu, M., L. Wang, B. A. Holm & G. Enhorning (1997) Dysfunction of guinea-pig pulmonary surfactant and type II pneumocytes after repetitive challenge with aerosolized ovalbumin. *Clin Exp Allergy*, 27, 802-7.
- MacMillan-Crow, L. A., J. P. Crow, J. D. Kerby, J. S. Beckman & J. A. Thompson (1996) Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 11853-8.
- Macmillan-Crow, L. A. & D. L. Cruthirds (2001) Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic Res*, 34, 325-36.
- MacMillan-Crow, L. A. & J. A. Thompson (1999) Tyrosine modifications and inactivation of active site manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys*, 366, 82-8.
- Marklund, S. L. (1982) Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 7634-8.
- Masini, E., D. Bani, A. Vannacci, S. Pierpaoli, P. F. Mannaioni, S. A. Comhair, W. Xu, C. Muscoli, S. C. Erzurum & D. Salvemini (2005) Reduction of antigen-induced respiratory abnormalities and airway inflammation in sensitized guinea pigs by a superoxide dismutase mimetic. *Free Radic Biol Med*, 39, 520-31.
- Mason, R. J. (2006) Biology of alveolar type II cells. *Respirology*, 11 Suppl, S12-5.
- Matricardi, P. M. (2001) Prevalence of atopy and asthma in eastern versus western Europe: why the difference? *Ann Allergy Asthma Immunol*, 87, 24-7.
- Matthay, M. A. & R. L. Zemans (2011) The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Annu Rev Pathol*, 6, 147-63.
- Minai-Fleminger, Y. & F. Levi-Schaffer (2009) Mast cells and eosinophils: the two key effector cells in allergic inflammation. *Inflamm Res*, 58, 631-8.
- Morgenstern, V., A. Zutavern, J. Cyrys, I. Brockow, S. Koletzko, U. Krämer, H. Behrendt, O. Herbarth, A. von Berg, C. P. Bauer, H. E. Wichmann, J. Heinrich, G. S. Group & L. S. Group (2008) Atopic diseases, allergic sensitization, and

- exposure to traffic-related air pollution in children. *Am J Respir Crit Care Med*, 177, 1331-7.
- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin & R. L. Coffman (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 136, 2348-57.
- Muzykantov, V. R. (2001) Delivery of antioxidant enzyme proteins to the lung. *Antioxid Redox Signal*, 3, 39-62.
- Müller, B., H. Garn & R. Hochscheid (2003) Impaired recycling of surfactant-like liposomes in type II pneumocytes from injured lungs. *Thorax*, 58, 127-34.
- Müller, B., H. Schäfer, P. Barth & P. von Wichert (1994) Lung surfactant components in bronchoalveolar lavage after inhalation of NO₂ as markers of altered surfactant metabolism. *Lung*, 172, 61-72.
- Müller, B., C. Seifart & P. J. Barth (1998) Effect of air pollutants on the pulmonary surfactant system. *Eur J Clin Invest*, 28, 762-77.
- Neumann, H., J. L. Hazen, J. Weinstein, R. A. Mehl & J. W. Chin (2008) Genetically encoding protein oxidative damage. *J Am Chem Soc*, 130, 4028-33.
- Nials, A. T. & S. Uddin (2008) Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Dis Model Mech*, 1, 213-20.
- Nordling, E., N. Berglind, E. Melén, G. Emenius, J. Hallberg, F. Nyberg, G. Pershagen, M. Svartengren, M. Wickman & T. Bellander (2008) Traffic-related air pollution and childhood respiratory symptoms, function and allergies. *Epidemiology*, 19, 401-8.
- Nozik-Grayck, E., H. B. Suliman & C. A. Piantadosi (2005) Extracellular superoxide dismutase. *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 2466-71.
- O'Sullivan, M. P., J. W. Tyner & M. J. Holtzman (2003) Apoptosis in the airways: another balancing act in the epithelial program. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 29, 3-7.
- Ober, C. & T. C. Yao (2011) The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective. *Immunol Rev*, 242, 10-30.
- Oftedal, B., W. Nystad, B. Brunekreef & P. Nafstad (2009) Long-term traffic-related exposures and asthma onset in schoolchildren in oslo, norway. *Environ Health Perspect*, 117, 839-44.

- Pearce, N., N. Aït-Khaled, R. Beasley, J. Mallol, U. Keil, E. Mitchell, C. Robertson & a. t. I. P. T. S. Group (2007) Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax*, 62, 758-66.
- Persson, C. G., J. S. Erjefält, L. Greiff, I. Erjefält, M. Korsgren, M. Linden, F. Sundler, M. Andersson & C. Svensson (1998) Contribution of plasma-derived molecules to mucosal immune defence, disease and repair in the airways. *Scand J Immunol*, 47, 302-13.
- Petersen, S. V., T. D. Oury, L. Ostergaard, Z. Valnickova, J. Wegrzyn, I. B. Thøgersen, C. Jacobsen, R. P. Bowler, C. L. Fattman, J. D. Crapo & J. J. Enghild (2004) Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) binds to type I collagen and protects against oxidative fragmentation. *J Biol Chem*, 279, 13705-10.
- Pfaffl, M. 2004. Real-time RT-PCR: neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung, . 92-95. Biospektrum.
- Platts-Mills, T. A. & J. A. Woodfolk (2011) Allergens and their role in the allergic immune response. *Immunol Rev*, 242, 51-68.
- Post, M., J. J. Batenburg, L. M. Van Golde & B. T. Smith (1984) The rate-limiting reaction in phosphatidylcholine synthesis by alveolar type II cells isolated from fetal rat lung. *Biochim Biophys Acta*, 795, 558-63.
- Poynter, M. E., R. L. Persinger, C. G. Irvin, K. J. Butnor, H. van Hirtum, W. Blay, N. H. Heintz, J. Robbins, D. Hemenway, D. J. Taatjes & Y. Janssen-Heininger (2006) Nitrogen dioxide enhances allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in the mouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 290, L144-52.
- Proust, B., G. Lacroix, F. Robidel, M. Marliere, A. Lecomte & B. B. Vargaftig (2002) Interference of a short-term exposure to nitrogen dioxide with allergic airways responses to allergenic challenges in BALB/c mice. *Mediators Inflamm*, 11, 251-60.
- Radi, R. (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 4003-8.

- Radon, K., V. Ehrenstein, G. Praml & D. Nowak (2004) Childhood visits to animal buildings and atopic diseases in adulthood: an age-dependent relationship. *Am J Ind Med*, 46, 349-56.
- Ratnam, D. V., D. D. Ankola, V. Bhardwaj, D. K. Sahana & M. N. Kumar (2006) Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Control Release*, 113, 189-207.
- Reis e Sousa, C. (2006) Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol*, 6, 476-83.
- Renz, H., H. R. Smith, J. E. Henson, B. S. Ray, C. G. Irvin & E. W. Gelfand (1992) Aerosolized antigen exposure without adjuvant causes increased IgE production and increased airway responsiveness in the mouse. *J Allergy Clin Immunol*, 89, 1127-38.
- Riedler, J., C. Braun-Fahrlander, W. Eder, M. Schreuer, M. Waser, S. Maisch, D. Carr, R. Schierl, D. Nowak, E. von Mutius & A. S. Team (2001) Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet*, 358, 1129-33.
- Robert Koch Institut, Stand: Februar 2011
http://www.rki.de/cln_116/nn_204172/DE/Content/GBE/Auswertungsergebnisse/nichtuebertragbareKrankheiten/AsthmaBronchiale/asthma__bronchiale__node.htm.
- Robinson, D. S., Q. Hamid, S. Ying, A. Tsicopoulos, J. Barkans, A. M. Bentley, C. Corrigan, S. R. Durham & A. B. Kay (1992) Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med*, 326, 298-304.
- Rosenlund, M., F. Forastiere, D. Porta, M. De Sario, C. Badaloni & C. A. Perucci (2009) Traffic-related air pollution in relation to respiratory symptoms, allergic sensitisation and lung function in schoolchildren. *Thorax*, 64, 573-80.
- Ruby *Palwankar*, C. E. B.-C., Jean Bousquet, G. Walter Canonica, Alvaro A. Cruz, Michael A. Kaliner, and Bobby Q. Lanier. 2008. State of World Allergy Report 2008 – Allergy and respiratory diseases. World Allergy Organization Journal e-supplement.

- Sandström, J., P. Nilsson, K. Karlsson & S. L. Marklund (1994) 10-fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *J Biol Chem*, 269, 19163-6.
- Saxon, A. & D. Diaz-Sanchez (2005) Air pollution and allergy: you are what you breathe. *Nat Immunol*, 6, 223-6.
- Schaub, B., R. Lauener & E. von Mutius (2006) The many faces of the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol*, 117, 969-77; quiz 978.
- Schwartz, D. A. (2001) Does inhalation of endotoxin cause asthma? *Am J Respir Crit Care Med*, 163, 305-6.
- Seeger, W., C. Grube, A. Günther & R. Schmidt (1993) Surfactant inhibition by plasma proteins: differential sensitivity of various surfactant preparations. *Eur Respir J*, 6, 971-7.
- Simpson, A. & F. D. Martinez (2010) The role of lipopolysaccharide in the development of atopy in humans. *Clin Exp Allergy*, 40, 209-23.
- Southam, D. S., R. Ellis, J. Wattie & M. D. Inman (2007) Components of airway hyperresponsiveness and their associations with inflammation and remodeling in mice. *J Allergy Clin Immunol*, 119, 848-54.
- Spangfort, M. D., O. Mirza, H. Ipsen, R. J. Van Neerven, M. Gajhede & J. N. Larsen (2003) Dominating IgE-binding epitope of Bet v 1, the major allergen of birch pollen, characterized by X-ray crystallography and site-directed mutagenesis. *J Immunol*, 171, 3084-90.
- Strachan, D. P. (1989) Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*, 299, 1259-60.
- Sumi, Y. & Q. Hamid (2007) Airway remodeling in asthma. *Allergol Int*, 56, 341-8.
- Suntres, Z. E. (2011) Liposomal Antioxidants for Protection against Oxidant-Induced Damage. *J Toxicol*, 2011, 152474.
- Swerdlow, R. D., R. F. Ebert, P. Lee, C. Bonaventura & K. I. Miller (1996) Keyhole limpet hemocyanin: structural and functional characterization of two different subunits and multimers. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 113, 537-48.
- Takeda, K., A. Haczku, J. J. Lee, C. G. Irvin & E. W. Gelfand (2001) Strain dependence of airway hyperresponsiveness reflects differences in eosinophil localization in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 281, L394-402.

- Thannickal, V. J. & B. L. Fanburg (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279, L1005-28.
- Thiesse, J., E. Namati, J. C. Sieren, A. R. Smith, J. M. Reinhardt, E. A. Hoffman & G. McLennan (2010) Lung structure phenotype variation in inbred mouse strains revealed through in vivo micro-CT imaging. *J Appl Physiol*, 109, 1960-8.
- Thorn, J. (2001) The inflammatory response in humans after inhalation of bacterial endotoxin: a review. *Inflamm Res*, 50, 254-61.
- Tsan, M. F. (2001) Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity: lessons from transgenic and knockout mice (Review). *Int J Mol Med*, 7, 13-9.
- Tulić, M. K., J. L. Wale, P. G. Holt & P. D. Sly (2000) Modification of the inflammatory response to allergen challenge after exposure to bacterial lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 22, 604-12.
- Van Hove, C. L., T. Maes, D. D. Cataldo, M. M. Guéders, E. Palmans, G. F. Joos & K. G. Tournoy (2009) Comparison of acute inflammatory and chronic structural asthma-like responses between C57BL/6 and BALB/c mice. *Int Arch Allergy Immunol*, 149, 195-207.
- Vance, D. E. & J. E. Vance (2009) Physiological consequences of disruption of mammalian phospholipid biosynthetic genes. *J Lipid Res*, 50 Suppl, S132-7.
- von Mutius, E. (1998) The rising trends in asthma and allergic disease. *Clin Exp Allergy*, 28 Suppl 5, 45-9; discussion 50-1.
- von Mutius, E. (2009) Gene-environment interactions in asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 123, 3-11; quiz 12-3.
- von Mutius, E., F. D. Martinez, C. Fritzsche, T. Nicolai, G. Roell & H. H. Thiemann (1994) Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am J Respir Crit Care Med*, 149, 358-64.
- von Mutius, E., S. K. Weiland, C. Fritzsche, H. Duhme & U. Keil (1998) Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany. *Lancet*, 351, 862-6.
- Walcher, W., T. Franze, M. G. Weller, U. Pöschl & C. G. Huber (2003) Liquid- and gas-phase nitration of bovine serum albumin studied by LC-MS and LC-MS/MS using monolithic columns. *J Proteome Res*, 2, 534-42.

- Watanabe, J., Y. Miyazaki, G. A. Zimmerman, K. H. Albertine & T. M. McIntyre (2003) Endotoxin contamination of ovalbumin suppresses murine immunologic responses and development of airway hyper-reactivity. *J Biol Chem*, 278, 42361-8.
- Whitehead, G. S., J. K. Walker, K. G. Berman, W. M. Foster & D. A. Schwartz (2003) Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 285, L32-42.
- Whitsett, J. A., S. E. Wert & T. E. Weaver (2010) Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease. *Annu Rev Med*, 61, 105-19.
- Wills-Karp, M. & S. L. Ewart (1997) The genetics of allergen-induced airway hyperresponsiveness in mice. *Am J Respir Crit Care Med*, 156, S89-96.
- World Health Organization (2004) The World Health Report 2004: Changing History. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- World Health Organization. Fact Sheet N°307. Stand: Mai 2011
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/index.html>
- Yamakura, F., T. Matsumoto, K. Ikeda, H. Taka, T. Fujimura, K. Murayama, E. Watanabe, M. Tamaki, T. Imai & K. Takamori (2005) Nitrated and oxidized products of a single tryptophan residue in human Cu,Zn-superoxide dismutase treated with either peroxynitrite-carbon dioxide or myeloperoxidase-hydrogen peroxide-nitrite. *J Biochem*, 138, 57-69.
- Yang, G., L. Li, A. Volk, E. Emmell, T. Petley, J. Giles-Komar, P. Rafferty, M. Lakshminarayanan, D. E. Griswold, P. J. Bugelski & A. M. Das (2005) Therapeutic dosing with anti-interleukin-13 monoclonal antibody inhibits asthma progression in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 313, 8-15.
- Yang, I. A., K. M. Fong, P. V. Zimmerman, S. T. Holgate & J. W. Holloway (2008) Genetic susceptibility to the respiratory effects of air pollution. *Thorax*, 63, 555-63.
- Yazdanbakhsh, M., P. G. Kremsner & R. van Ree (2002) Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science*, 296, 490-4.
- Yeung, V. P., R. S. Gieni, D. T. Umetsu & R. H. DeKruyff (1998) Heat-killed *Listeria monocytogenes* as an adjuvant converts established murine Th2-dominated immune responses into Th1-dominated responses. *J Immunol*, 161, 4146-52.

- Young, J. D., C. G. Peterson, P. Venge & Z. A. Cohn (1986) Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature*, 321, 613-6.
- Zhu, W. & M. I. Gilmour (2009) Comparison of allergic lung disease in three mouse strains after systemic or mucosal sensitization with ovalbumin antigen. *Immunogenetics*, 61, 199-207.

7.6. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Aumüller, Barth, Basler, Baum, Czubayko, Daut, Feuser, Gerdes, Görg, Grzeschik, Hasilik, Hertl, Hofmann, Klose, Köhler, Koolmann, Kroll, Lill, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Mandrek, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Oertel, Plant, Renz, Richter, Riße, Röhm, Röper, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schrader, Seitz, Steiniger, Tibesku, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf

7.7. Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. Bernd Müller für die Überlassung des interessanten Themas, die freundliche Beratung sowie die inhaltlichen Anregungen.

Frau Dr. Renate Hochscheid für die hervorragende wissenschaftliche Unterstützung und Betreuung.

Zu großem Dank bin ich auch den weiteren Mitarbeiterinnen des Labors, Frau Elke Kotte, Frau Nicole Schreiber und Frau Petra Weber, verpflichtet, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ein herzlicher Dank richtet sich an Dr. Ayse Kilic für die Unterstützung bei der Lungenfunktionsmessung und an Herrn Werner Cassel für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Von Herzen danke ich Dr. Simon Martin Heinz dafür, dass er immer für mich da ist.

Und ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir mit ihrem Verständnis und ihrer liebevollen Unterstützung ermöglichte, meinen eigenen Weg zu gehen.

7.8. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Auswirkung der Nitrierung von Allergenen auf die Ausprägung des allergischen Asthmas unter Einbeziehung des Antioxidantien-Metabolismus

in der Klinik für Pneumologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. B. Müller 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.

Vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Müller B, Kotte E, Wege C et al. (2010) Allergen nitration potentiates allergic immune responses. Annual Meeting of the American Thoracic Society.

Frankfurt, den 05.03.2012