

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin
des Fachbereichs Humanmedizin der Philipps-Universität in Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. H. Renz

**Analyse der *Acinetobacter lwoffii* F78-induzierten
proinflammatorischen Signale und der epigenetischen
Veränderungen in CD4⁺ T-Zellen anhand eines
in vitro Zellkulturmodells**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizinwissenschaft
Doctor rerum medicinarum (Dr. rer. med.)

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

ESMA KILIÇ-NIEBERGALL

geb. in Lünen

Gießen, 2019

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 01.02.2019

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. H. Renz

Korreferent: Prof. Dr. Ulrich Steinhoff

2. Korreferent: Stefan Bauer

MEINER FAMILIE

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	10
1.1	Allergien und Asthma bronchiale.....	10
1.1.1	Pathogenese.....	11
1.1.2	T-Zell-Immunantwort.....	16
1.1.2.1	T _H 1-Zellen.....	18
1.1.2.2	T _H 2-Zellen.....	19
1.1.2.3	T _H 17-Zellen.....	21
1.2	Epidemiologie.....	24
1.2.1	Risikofaktoren.....	25
1.2.2	Protektive Faktoren - Mikrobielle Stimuli.....	27
1.2.3	Bedeutung der angeborenen Immunantwort bei der Aktivierung und Polarisierung von T-Helferzellen für die Allergieentwicklung.....	29
1.3	Asthma und Epigenetik.....	31
1.3.1	DNA-Methylierung.....	32
1.4	Das Cholera Toxin.....	35
1.5	Hypothesen und Aufgabenstellung der Arbeit.....	37
2	MATERIAL UND METHODEN.....	40
2.1	Versuchstiere.....	40
2.2	Zellen.....	40
2.2.1	Eukaryotische Zellen.....	40
2.2.2	Prokaryotische Zellen.....	40
2.3	Chemikalien und Reagenzien.....	40
2.4	Kits.....	43
2.5	Nukleinsäuren.....	43
2.5.1	qPCR-Primer.....	44
2.5.2	Bisulfit-PCR-Primer.....	44
2.5.3	Pyrosequenzier-Primer.....	44
2.5.4	Nukleinsäure Standards.....	44
2.6	Proteine.....	45
2.6.1	Rekombinante Proteine.....	45
2.6.2	Primärantikörper.....	45

2.6.3	Sekundärantikörper.....	45
2.6.4	Enzyme.....	46
2.7	Lösungen, Nährmedien und Puffer.....	46
2.7.1	Lösungen.....	46
2.7.2	Nährmedien für Säugerzellen.....	46
2.7.3	Nährmedien für Bakterien.....	47
2.7.4	Puffer.....	47
2.8	Verbrauchsmaterialien.....	47
2.9	Geräte.....	49
2.10	Software.....	50
2.11	Versuchstiere und Behandlungsprotokolle.....	51
2.11.1	<i>In vivo</i> Modell zur Induktion der akuten allergischen Atemwegsentzündung.....	51
2.11.2	Immunmodulation der allergischen Atemwegsentzündung durch den Einfluss von <i>Acinetobacter lwoffii</i>	51
2.11.3	Immunmodulation der allergischen Atemwegsentzündung durch den Einfluss von Cholera Toxin.....	52
2.12	Messung der Lungenfunktion mittels Head-Out Body-Plethysmographie.....	53
2.13	Präparation und Probengewinnung.....	54
2.13.1	Blutabnahme und Serumgewinnung.....	54
2.13.2	Bronchoalveoläre Lavage (BAL)	54
2.13.2.1	Zellzählung und Differenzierung von Leukozytensubpopulationen der BAL.....	54
2.13.3	Organpräparation, Einbettung und Herstellung der Lungenschnitte	55
2.13.4	Präparation der Milz und der bronchialen Lymphknoten.....	55
2.13.4.1	Isolierung von mononukleären Zellen.....	55
2.13.4.2	Kurzzeitstimulation der MNCs aus den Lymphknoten.....	56
2.14	Histologie und Immunhistochemie.....	56
2.14.1	Hämatoxylin-Eosin- und Periodic-Acid Schiff-Färbung.....	56
2.14.2	Gram-Färbung.....	57
2.15	Zellkulturen.....	57
2.15.1	Isolierung primärer peritonealer Makrophagen.....	57
2.15.2	Kultivierung und Stimulation der J774-Kulturzellen bzw. der primären Peritonealmakrophagen-Kultur.....	58

2.15.3	Isolierung von naiven CD4 ⁺ /62L ⁺ T-Zellen aus der Milz.....	59
2.15.4	<i>In vitro</i> Subkultivierung und Stimulationsbedingungen der naiven CD4 ⁺ /62L ⁺ T-Zellen aus der Milz.....	60
2.15.5	Analyse der Aufreinigungseffizienz von CD4 ⁺ /62L ⁺ T-Zellen mittels FACS.....	62
2.16	Proteinbiochemie.....	63
2.16.1	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	63
2.16.1.1	Nachweis OVA-spezifischer Immunglobuline.....	63
2.16.1.2	Konzentrationsbestimmung von Zytokinen mittels ELISA.....	64
2.16.2	Cytometric Bead Array (CBA)	66
2.17	Molekularbiologische Methoden.....	66
2.17.1	Nachweis von Genexpression auf mRNA-Ebene.....	66
2.17.1.1	RNA-Isolierung.....	66
2.17.1.2	DNase-Verdau.....	67
2.17.1.3	RNA-Quantifizierung.....	67
2.17.1.4	Reverse Transkription.....	67
2.17.2	Quantitative Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)	68
2.17.3	Analyse der promotorspezifischen Methylierung des IL-17A Promotors... 69	69
2.17.3.1	Bisulfit-Konversion genomischer DNA.....	70
2.17.3.2	Aufreinigung der konvertierten DNA.....	71
2.17.3.3	Amplifikation der Bisulfit-DNA.....	72
2.17.3.4	Pyrosequenzierung.....	73
2.18	Statistische Analysen.....	75
3	ERGEBNISSE.....	76
3.1	Charakterisierung des asthmatischen Phänotyps nach <i>A. lwoffii</i> Exposition im Akutmodell der allergischen Atemwegsentzündung	76
3.1.1	Lebend- und Totkeim-Exposition von <i>A. lwoffii</i> führt zu einer Reduktion der akuten allergischen Atemwegsentzündung im Mausmodell des experimentellen Asthmas.....	76
3.1.2	Zusammenfassung der Phänotypanalysen.....	83
3.2	Stimulation von innatem Immunzellen durch mikrobielle Exposition.....	84
3.2.1	Aktivierung von murinen alveolären Makrophagen durch <i>A. lwoffii</i>	85

3.2.2	Induktion proinflammatorischer Zytokine in Folge einer Behandlung mit <i>A. lwoffii</i> in Makrophagen-Kulturzellen.....	86
3.2.3	Induktion proinflammatorischer Zytokine in Folge einer Behandlung mit <i>A. lwoffii</i> in primären Peritonealmakrophagen.....	89
3.2.4	Induktion proinflammatorischer Zytokine in Folge einer Behandlung mit Cholera Toxin in Makrophagen-Kulturzellen.....	90
3.3	Stimulation von adaptiven Immunzellen durch mikrobiell behandelte Kulturüberstände.....	91
3.3.1	Analyse der Aufreinigungseffizienz von naiven CD4 ⁺ /62L ⁺ T-Zellen....	92
3.3.2	Zytokinproduktion in CD4 ⁺ /62L ⁺ T-Zellen nach Behandlung mit <i>A. lwoffii</i> -stimulierten Kulturüberständen.....	93
3.3.3	Zytokinproduktion in CD4 ⁺ /62L ⁺ T-Zellen nach Behandlung mit <i>A. lwoffii</i> -stimulierten Primärkulturüberständen.....	95
3.3.4	Zytokinproduktion in CD4 ⁺ /62L ⁺ T-Zellen nach Behandlung mit Cholera Toxin stimulierten Kulturüberständen.....	96
3.3.5	Zytokinproduktion von IL-17A, IL-13 und IL-10 in unstimulierten CD4 ⁺ /62L ⁺ T-Zellen.....	97
3.3.6	mRNA-Expression von IL-17A, IL-13 und IL-10 in CD4 ⁺ /62L ⁺ T-Zellen.....	98
3.3.7	Einfluss der rekombinanten Proteine IL-6, TGFβ und TNFα auf die Expression von IL-17, IL-13 und IL-10 in CD4 ⁺ /62L ⁺ T-Zellen.....	101
3.3.8	Inhibition der Zytokinexpression IL-17A, IL-13 und IL-10 mittels spezifischer Antikörper in CD4 ⁺ /62L ⁺ T-Zellen.....	103
3.4	Epigenetische Regulation in CD4 ⁺ /62L ⁺ T-Zellen.....	107
3.4.1	Analyse der Promotor-Methylierung von IL-17A in CD4 ⁺ /62L ⁺ T-Zellen nach Stimulation mit <i>A. lwoffii</i> -behandelten Kulturüberständen.....	107
3.5	Charakterisierung des asthmatischen Phänotyps nach Cholera Toxin Exposition im Akutmodell der allergischen Atemwegsentzündung.....	109
3.5.1	Cholera Toxin Exposition führt zu einer Reduktion der akuten allergischen Atemwegsentzündung im Mausmodell des experimentellen Asthmas.....	109
3.5.2	Zusammenfassung der Phänotypanalysen.....	118
4	DISKUSSION.....	119

4.1	Die Lebend- und Totkeim-Exposition von <i>A. lwoffii</i> führt zu einer Reduktion der akuten allergischen Atemwegsentzündung im Mausmodell des experimentellen Asthmas.....	121
4.2	Induktion eines proinflammatorischen Zytokinprofils in Zellen des innate Immunsystems durch mikrobielle Stimulation mit <i>A. lwoffii</i> und Cholera Toxin...	124
4.3	Stimulation von adaptiven Immunzellen mit <i>A. lwoffii</i> und CT exponierten Makrophagen-Kulturüberständen führt zur Zytokinexpression von IL-17, IL-13 und IL-10.....	128
4.4	Cholera Toxin Exposition führt zu einer Reduktion der akuten allergischen Atemwegsentzündung im Mausmodell des experimentellen Asthmas.....	136
4.5	Mögliche Mechanismen der Allergieprävention durch mikrobielle Stimuli.....	141
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	145
6	SUMMARY.....	149
7	LITERATURVERZEICHNIS (Nach Nummern).....	152
8	LITERATURVERZEICHNIS (Alphabetisch).....	175
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	196
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	200
11	TABELLENVERZEICHNIS.....	203
12	PUBLIKATIONEN.....	204
13	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....	205
14	VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER.....	206
15	DANKSAGUNG.....	207

1 EINLEITUNG

1.1 Allergien und Asthma bronchiale

Die Aufgabe des Immunsystems ist es, den Körper vor potentiell gefährlichen Krankheitserregern und Fremdstoffen zu schützen. Im Falle einer Allergie handelt es sich um eine Dysregulation des Immunsystems. Es entsteht eine überschießende Reaktion des Körpers auf in der Regel ungefährliche Antigene aus der Umwelt (Allergene). Dabei erkennt das Immunsystem Allergene fälschlicherweise als „körperfremd“ und leitet in verstärktem Maß Abwehrreaktionen in die Wege, die zu zahlreichen Erkrankungssymptomen führen. Allergene, wie z.B. Inhalations- oder Nahrungsmittelallergene können zu allergischen Entzündungen und Reaktionen führen, die sowohl lokal an Schleimhäuten, an den Atemwegen und an der Haut als auch systemisch in Form einer Anaphylaxie auftreten [1]. Die allergische Immunantwort unterliegt komplexen Regulationsmechanismen und kann durch vielfältige Faktoren wie genetische Anfälligkeit, Route der Exposition, struktureller Charakteristika und Dosis des Allergens beeinflusst werden [2].

Im direkten Zusammenhang mit allergischen Erkrankungen steht der Begriff der Atopie (griech. „atopos“ = ungewöhnlich). Mit diesem Begriff wird eine genetische Prädisposition bezeichnet, einen bestimmten Typ allergischer Reaktionen, die IgE-vermittelte Hypersensibilitätsreaktion vom Typ I oder Soforttypreaktion, auszuprägen [3]. Diese stellt die häufigste Form der Allergie dar und ist Gegenstand der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit. Unter der Atopie subsummieren sich Erkrankungen wie die allergische Rhinitis (chronische Entzündung der Nasenschleimhaut), das atopische Ekzem (Neurodermitis) sowie das allergische Asthma bronchiale. Häufig weisen die Erkrankten noch weitere atopiebedingte Komorbiditäten wie Sinusitis und Nahrungsmittelallergien auf [4]. Erstaunlicherweise weisen bis zu 40 % der westlichen Bevölkerung erhöhte Gesamt-IgE-Spiegel gegen gewöhnliche Umweltallergene auf, aber nur 7 % Prozent der Atopiker sind an Asthma bronchiale erkrankt [5].

Im Gegensatz zu den atopischen Erkrankungen (extrinsisch) werden allergische Erkrankungen wie die Kontaktdermatitis, die durch IgE-unabhängige Mechanismen entstehen, als non-atopische Allergien (intrinsisch) bezeichnet. Das Asthma bronchiale wird aufgrund seiner multifaktoriellen Ätiologie klassischerweise je nach vorhandener oder nicht vorhandener allergischer Diathese in zwei Formen unterteilt, da neben genetischen Ursachen auch Umwelteinflüsse als mögliche Promoter in der Genese der immunologischen Dysregulation eine Rolle spielen [6, 7]. Dazu zählt einerseits das allergenassoziierte extrinsische Asthma,

das durch die Inhalation von exogenen Aeroallergenen hervorgerufen wird, zu denen Pollen, Hausstaubmilbenkot und Epithelien von Haustieren gehören. Daneben existiert das nicht-atopische intrinsische Asthma, das auf viralen Atemwegsinfekten oder der Inhalation chemischer Noxen (z.B. Tabakrauch) beruht. Der größte Anteil der Betroffenen leiden an einer Mischform, wobei im Kindesalter das rein allergische Asthma und im fortgeschrittenen Alter die intrinsische Form überwiegt. Extrinsisches und intrinsisches Asthma unterscheiden sich vor allem in der Ätiologie und den Auslösemechanismen, die weitere Pathogenese ist letztlich sehr ähnlich. Charakteristisch für die Erkrankung beider Formen sind neurogene Komponenten und ein inflammatorisches Infiltrat der Atemwege, welches durch eosinophile Granulozyten und CD4⁺ T-Lymphozyten dominiert wird. Somit ist eine IgE-vermittelte Soforttypreaktion nicht notwendig, scheint aber förderlich zu sein.

Ferner wird in jüngster Zeit über weitere mögliche Subtypen des Asthmas mit eigenen klinischen und pathophysiologischen Charakteristika diskutiert, die es noch genauer zu definieren gilt [8]. Dabei sind die Bezeichnungen der Erkrankungssubtypen rein deskriptiv und können zum Teil sowohl dem allergischen als auch dem nicht allergischen Asthma zugeordnet werden, wie z.B. das „nokturnale Asthma“, welches eine allergische aber auch eine nicht allergische Komponente beinhalten kann. Die hohe Prävalenz und steigende Inzidenz sowie die enorme Einschränkung der Lebensqualität der Betroffenen haben insbesondere das allergische Asthma zu einer „Volkskrankheit“ und damit zu einem gesundheitsökonomisch hochrelevanten Krankheitsbild werden lassen [9].

1.1.1 Pathogenese

Asthma bronchiale ist definiert als eine heterogene chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege mit unterschiedlichen klinischen Phänotypen und variablen Schweregraden. Die Symptome können individuelle Unterschiede bei Patienten aufweisen, wobei diese auch im klinischen Verlauf entsprechend vorübergehend sein können, periodisch auftreten oder persistieren [10]. Neben typischen klinischen Symptomen, wie thorakales Engegefühl und Atemnot, sind bronchiale Hyperreagibilität, Schleimhautödem und erhöhte Mukusproduktion weitere charakteristische Merkmale des Asthma bronchiale [11]. Im Verlauf des Chronifizierungsprozesses findet ein irreversibler Umbau der Atemwege, das sogenannte „Airway Remodeling“, statt [12]. Unter Therapie, teilweise spontan oder auch medikamentös, sind die Symptome meist reversibel [13]. Die therapeutische Behandlung beinhaltet die Suppression der asthmatischen Entzündung mit Verminderung der bronchialen

Hyperreagibilität und der Reduktion der Atemwegsobstruktion. Zur Medikation wird eine Kombination aus einem Dauermedikament zur Langzeitkontrolle (Controller) und einem Bedarfsmedikament (Reliever) für die Behandlung eines akuten Asthmaanfalls eingesetzt [14]. Trotz intensiver Forschungsarbeit gibt es bis heute jedoch keine Möglichkeit, Asthma zu heilen. Die der Symptomatik des Asthma bronchiale zugrundeliegenden Mechanismen der pathogenetischen Veränderungen sind sehr komplex und umfassen sowohl humorale als auch zelluläre Komponenten, die im Folgenden näher beschrieben werden.

Sensibilisierung

Beim Asthma bronchiale handelt es sich um eine Entzündung des Soforttyps, die als klassische Typ I Reaktion eingestuft wird. Nach gegenwärtigem Kenntnisstand lässt sich die zugrundeliegende Entzündung in eine Früh- und Spätphase einteilen. Hat sich bei einem Individuum durch den ersten Kontakt mit dem jeweiligen Allergen ein Sensibilisierungsprozess bzw. ein atopischer Phänotyp ausgebildet, führt ein erneuter Kontakt mit demselben Allergen zu einer allergischen Reaktion. In dieser Phase aktivieren inhalede Allergene sogenannte Antigenpräsentierende Zellen (APC) eines bestimmten Subtyps, die intraepithelial und submukosal sitzenden dendritischen Zellen (DC) der Atemwegsmukosa (Abb. 1) [15, 16]. Bei atopischen Erkrankungen und Asthma wurden dendritische Zellen (DCs) als wesentliche APCs identifiziert, wohingegen die Beteiligung anderer APCs wie bspw. Alveolarmakrophagen auch wesentlich ist [17]. Die aktivierten DCs und Makrophagen migrieren nun in die drainierenden Lymphknoten (LK) der Lunge [18], fragmentieren unprozessiertes Allergen/Antigen nach ihrer Aufnahme und präsentieren diese dann über Histokompatibilitätsantigene der Klasse II (MHC-II) an ihrer Oberfläche den naiven T-Helferzellen (T_H0) [19, 20]. Bei gleichzeitiger Ko-Stimulation über den CD28/CD86 Weg werden die naiven $CD4^+$ T-Helferzellen aktiviert und differenzieren selektiv zu reifen T_H2 -Zellen [21, 22, 23, 24]. Einen entscheidenden Einfluss zur Polarisierung der T-Zellen trägt vor allem das Zytokinmilieu in dieser Phase. Man geht davon aus, dass geringe Antigendosen und das von Mastzellen, eosinophilen Granulozyten und T_H2 -Zellen selbst ausgeschüttete IL(Interleukin)-4 und IL-13 zu der Ausprägung der T_H2 -Dominanz führen [25, 26]. Durch die verstärkte T_H2 -Immunantwort freigesetzten Interleukine (IL-4 und IL-13) wird ein Isotypenwechsel („isotype-switch“) von IgM zu IgE in B-Zellen induziert, die somit zu einer verstärkten Produktion von IgE-Antikörpern führt (Abb. 1) [28, 29]. Die IgE-Antikörper werden nach kurzer Zirkulation im Blut über hochaffine $Fc\epsilon$ -Rezeptoren auf der

Oberfläche von alveolären Mastzellen gebunden und führen zu einer Aktivierung der Mastzellen in den Atemwegen [30, 31].

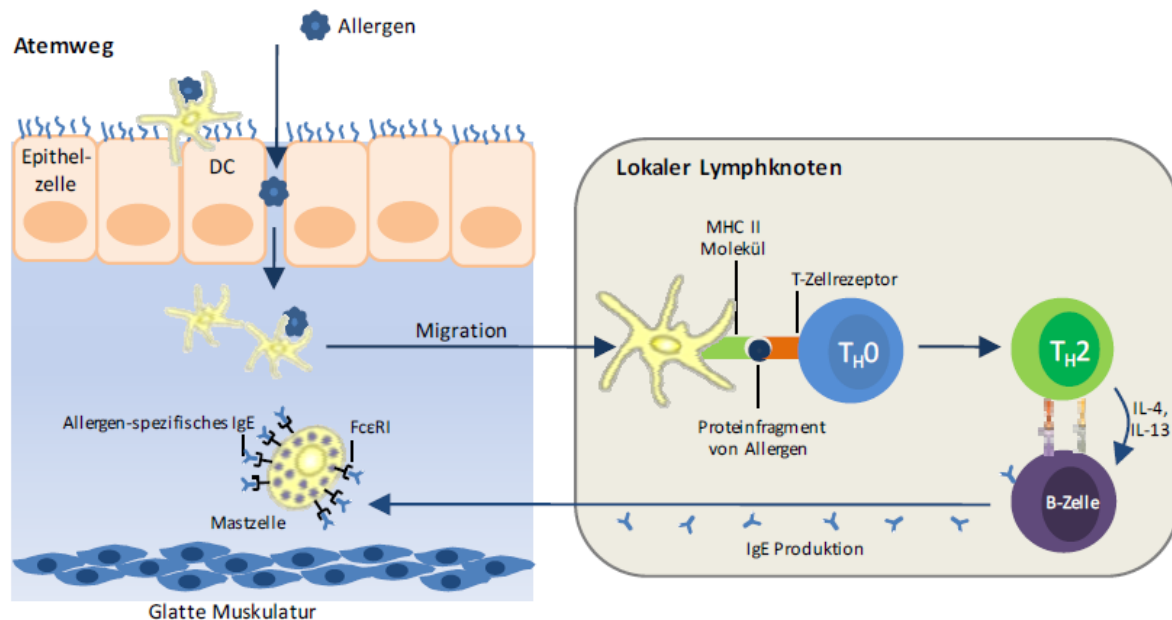


Abb. 1 Allergische Sensibilisierung (modifiziert nach Galli SJ et al., 2008) [16]

Aktivierte DCs migrieren nach Aufnahme und Prozessierung von Allergenen zu den regionalen Lymphknoten, wo sie Allergenpeptide naiven T-Zellen (T_{H0}) präsentieren. Die naiven T-Zellen werden aktiviert und differenzieren in Anwesenheit von IL-4 und IL-13 zu T_{H2}-Zellen, deren Zytokinausschüttung einen Klassenwechsel zu IgE in B-Zellen auslöst. Das IgE wird systemisch über Lymphe und Blut verteilt und bindet an hochaffine IgE-Rezeptoren (FcεRI) auf Mastzellen, welche sensibilisiert werden. Die sensibilisierten Zellen können bei einer späteren Reexposition mit dem Allergen reagieren. Die Sensibilisierung selbst führt zu keinerlei Symptomen.

Sofortreaktion

Die bereits erwähnte erste mastzellabhängige Reaktion wird allergische Frühreaktion genannt und kennzeichnet die allergische Reaktion vom Soforttyp innerhalb weniger Minuten nach Exposition. Nach vorausgegangener Sensibilisierung führt ein wiederholter Kontakt mit dem Allergen zur Kreuzvernetzung der IgE-Rezeptoren und die degranulierten Mastzellen setzen eine Reihe von proinflammatorischen Mediatoren, u.a. Histamine, Prostaglandine, Leukotriene, Chemo- und Zytokine, frei (Abb. 2) [32, 33, 34]. Die freigesetzten Mediatoren vermitteln ihrerseits eine erhöhte Mukussekretion durch Becherzellen und eine schnelle Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur (akute Bronchokonstriktion), die eine Verengung der Atemwege zur Folge hat [33, 34]. Daraus resultiert eine Beeinträchtigung des Widerstandes in den Atemwegen. Darüber hinaus kommt es durch chemotaktische Signale

zu einer verstärkten Vaskularisierung und einer vermehrten Durchlässigkeit der Gefäßwände, wodurch ein Austritt von Flüssigkeit ins Gewebe erfolgt und ein Ödem resultiert, welches einen weiteren obstruierenden Faktor darstellen kann. Des Weiteren folgt die Rekrutierung von Entzündungszellen wie beispielsweise der eosinophilen Granulozyten und eine Entzündungsreaktion, welche die Symptomatik der Spätreaktion zur Folge hat [32, 33].

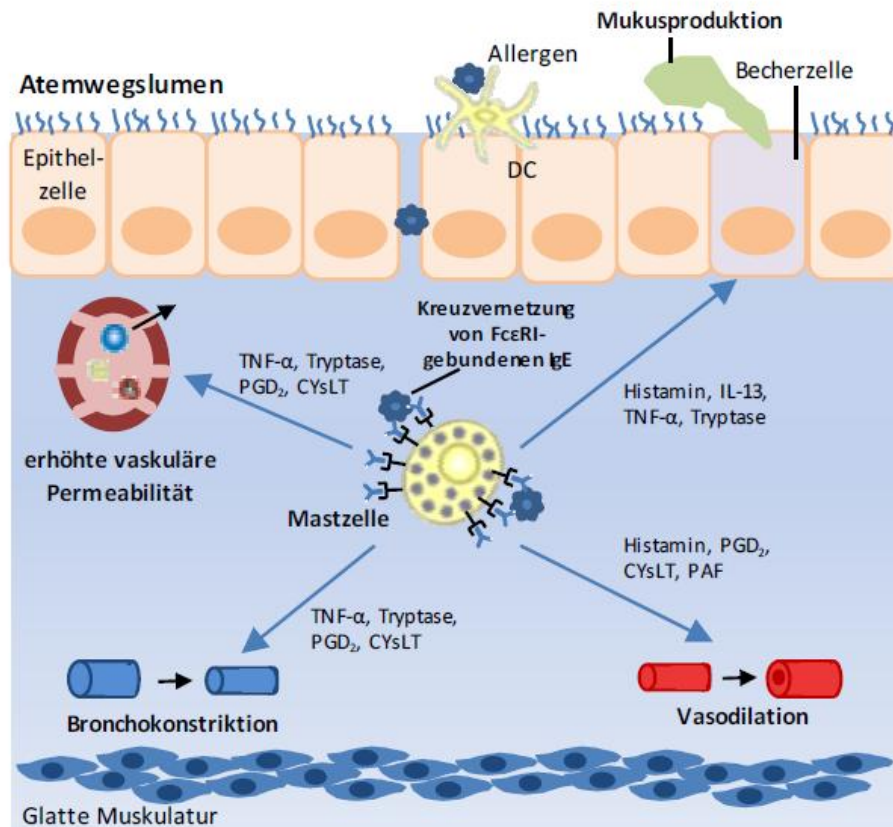


Abb. 2 Sofortreaktion (modifiziert nach Galli SJ et al., 2008) [16]

Während der Sofortreaktion kommt es durch Bindung der Allergene zur Kreuzvernetzung der am FcεRI-gebundenen IgE-Moleküle, die zur Aktivierung der Mastzellen führen und zur Sezernierung vorgebildeter inflammatorischer Mediatoren durch Degranulation. Diese Mediatoren verursachen die Bronchokonstriktion, Vasodilation, erhöhte vaskuläre Permeabilität und eine erhöhte Mukusproduktion. Zugleich wird die Spätreaktion durch Rekrutierung von Leukozyten ins Gewebe eingeleitet.

Spätreaktion

Während der asthmatischen Spätreaktion, die etwa 6 bis 9 Stunden nach Allergenprovokation ihr Maximum erreicht, kommt es zu einer Akkumulation von Entzündungszellen, vor allem von eosinophilen Granulozyten aus dem Blutkreislauf in die Atemwege und zu einer

Infiltration in das entzündete Gewebe (Abb. 3). Darüber hinaus kommt es zur Infiltration der Atemwege durch basophile und neutrophile Granulozyten sowie Makrophagen. Von aktivierten eosinophilen Granulozyten freigesetzte proinflammatorische Mediatoren wie z.B. Zytokine, Wachstumsfaktoren, freie Sauerstoffradikale und Eicosanoide induzieren sowohl die Rekrutierung als auch das Überleben von Leukozyten am Entzündungsherd [35, 36, 37]. Daneben sezernieren eosinophile Granulozyten aber auch noch andere immunologisch bedeutende Faktoren wie Sauerstoffradikale, Leukotriene, Plättchen-aktivierender-Faktor (PAF), Major-Basic-Protein (MBP), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), Eotaxin und eosinophile Peroxidase [10, 38]. Diese Mediatoren und zytotoxischen Metabolite zerstören die Strukturzellen der Atemwege und damit deren Abwehrfunktionen als Barriere sowie die Funktion der mukoziliären Clearance [37, 38]. Beschädigte Strukturzellen schütten als Reaktion auf die Verletzung weitere Mediatoren aus und führen zu einer Exazerbation des allergischen Phänotyps. Als Folge werden Reparaturmechanismen eingeleitet, die zur Ausprägung des asthmatischen Phänotyps mit rekurrerender bis persistierender Atemwegsobstruktion und zu einer bronchialen Hyperreagibilität der glatten Atemwegsmuskulatur führen [38, 39]. Diese strukturellen Veränderungen stellen den Beginn der Chronifizierung und der Atemwegsremodulierung (Umbau der Atemwege) dar, die durch Hypertrophie und Hyperplasie der glatten Muskelzellen, Metaplasie der Becherzellen sowie der Verdickung der epithelialen Basalmembran gekennzeichnet ist [40, 41]. Allerdings sind die genauen Mechanismen der Chronifizierung der allergischen Entzündung bisher nicht geklärt. Es wird angenommen, dass unabhängig von spezifischen Zelltyp-gebundenen Interventionen neben eosinophilen Granulozyten und Mastzellen die T-Lymphozyten im Zentrum der Inflammationsreaktion stehen. Vor allem T_H2-Zellen und T_H2-Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 sind als zentrales Bindeglied zwischen spezifischer und unspezifischer Immunantwort wesentlich an der Regulation des Entzündungsablaufs beteiligt, indem sie neben der Stimulation der IgE-Produktion mit weiteren typischen Merkmalen der Atemwegsentszündung wie Reifung und Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in das Lungengewebe, erhöhte Mukusproduktion und einem strukturellen Umbau des Atemwegsgewebes in Verbindung gebracht werden [42]. Ferner inhibieren diese Zytokine die Entwicklung von T_H1-Zellen und unterstützen damit T_H2-assoziierte allergische Immunantworten [27, 33, 43].

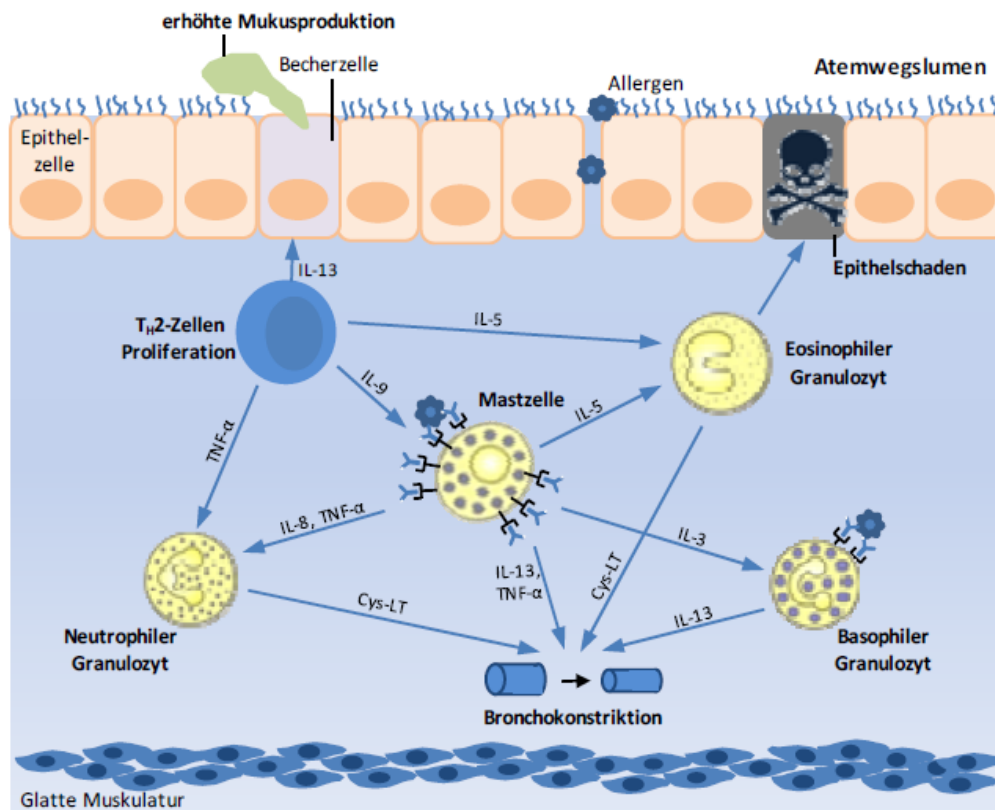


Abb. 3 Spätreaktion (modifiziert nach Galli SJ et al., 2008) [16]

Die Spätreaktion tritt erst 6-9 Stunden nach Allergenkontakt auf. Dabei werden Zellen des angeborenen (neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten) und adaptiven Immunsystems (T_H2-Zellen) in die Atemwege rekrutiert. Diese produzieren wiederum eine Reihe von Mediatoren und Zytokinen, die zu einer Bronchokonstriktion, erhöhten Mukussekretion und Schäden am mukosalen Epithel führen.

1.1.2 T-Zell-Immunantwort

Ein entscheidender Schritt hin zum Verständnis der Pathomechanismen allergischer Erkrankungen war die Identifizierung unterschiedlicher CD4⁺ T-Helferzell-Subpopulationen als Teil des adaptiven Immunsystems. CD4⁺ T-Helferzellen repräsentieren somit eine Lymphozytensubpopulation mit immunregulatorischen Aufgaben, indem sie sowohl direkt über Zell-Zell-Kontakte als auch über lösliche Zytokine die Immunantwort qualitativ unterschiedlich beeinflussen [44]. Ausgehend von einer gemeinsamen naiven Vorläuferzelle (T_H0 Zelle) entwickeln sich die unterschiedlichen T-Helferzell-Subtypen, zu denen T_H1-, T_H2-Lymphozyten und weitere wichtige T-Zell-Klassen wie T_H17-, T_H22-, T_H9-Zellen sowie regulatorische T-Zellen (Treg) zählen [45, 46, 47]. Die Abbildung 4 liefert einen Überblick über die verschiedenen diskutierten T_H-Subpopulationen. Nach Antigen-spezifischer Stimulation über den T-Zellrezeptor (TCR) durch reife APCs, überwiegend Monozyten

(Makrophagen, DCs), produzieren die aktivierten T_H -Zellen den Wachstumsfaktor IL-2 [48]. Dieser Faktor ist maßgeblich für die Proliferation der naiven T_H -Zellen verantwortlich. Neben IL-2 sezernieren T_H0 -Zellen außerdem eine breite Palette von Zytokinen in geringen Mengen (IL-2, IL-4, IL-5, $IFN\gamma$ (Interferon gamma), $TNF\alpha$ (Tumor necrosis factor alpha), IL-10 u.a.), die zum Teil antagonistisch wirken. Die Richtung der Differenzierung (Priming) und Polarisierung zu T-Helferzell-Effektorsubpopulationen ist neben dem Zytokinmilieu von der Intensität der TCR/Antigen-Bindung, der Beschaffenheit und Konzentration des Antigens sowie dessen Eintrittsort, der Art des kostimulatorischen Signals und des APC-Typs abhängig [49, 50, 51].

Die Differenzierung der T-Zell-Effektorpopulationen wird vor allem durch eine wechselseitige Interaktion der Zytokine dieser Zellen beeinflusst. Die von Mosmann et al. (1986) entwickelte Hypothese der T_H1 -/ T_H2 -Balance besagt, dass jede Zellpopulation sich selbst positiv (autokrin) und die jeweils andere negativ (parakrin) stimuliert [52]. So ist das Zytokin $IFN\gamma$ als klassischer Vermittler der T_H1 Immunfunktion auch ein potenter Inhibitor der T_H2 -Zellen und somit in der Lage eine allergische Immunantwort zu verhindern oder aufzulösen [53]. Umgekehrt spielen z.B. IL-4 und IL-10 eine Rolle bei der Unterdrückung der T_H1 Funktion. In diesem Zusammenhang spielen die regulatorischen T-Zellen (Treg) auch eine entscheidende Rolle, da sie sowohl die T_H1 - als auch die T_H2 -Antwort supprimieren können und ebenfalls relevant für die Balance des Immunsystems sind. Ihre Aufgabe ist es, den Organismus vor selbstgefährdender, überschießender Immunreaktion gegenüber exogenen Antigenen und vor Autoimmunreaktionen zu schützen [54].

Ob sich letztendlich ein IgE-vermitteltes allergisches Asthma bronchiale entwickelt, hängt demzufolge davon ab, zu welchem T-Helferzell-Subtyp die naiven T_H0 -Zellen bei erstmaliger Antigenpräsentation hauptsächlich differenzieren. Bei gesunden Personen ist innerhalb der $CD4^+$ Helferzellen ein ausgewogenes Verhältnis der potentiell inflammatorischen Zytokine der T_H1 - und T_H2 -Zellen wichtig für eine suffiziente Immunantwort. Bei atopischen (allergischen) Asthmatikern scheint jedoch das T_H1 / T_H2 -Gleichgewicht massiv in Richtung der T_H2 -Differenzierung verschoben zu sein [32, 39]. Dementsprechend ist eine gesunde Balance zwischen diesen T-Helfer-Subgruppen (T_H1 / T_H2 -Paradigma) von großer Bedeutung für die Entstehung von Allergie und Asthma.

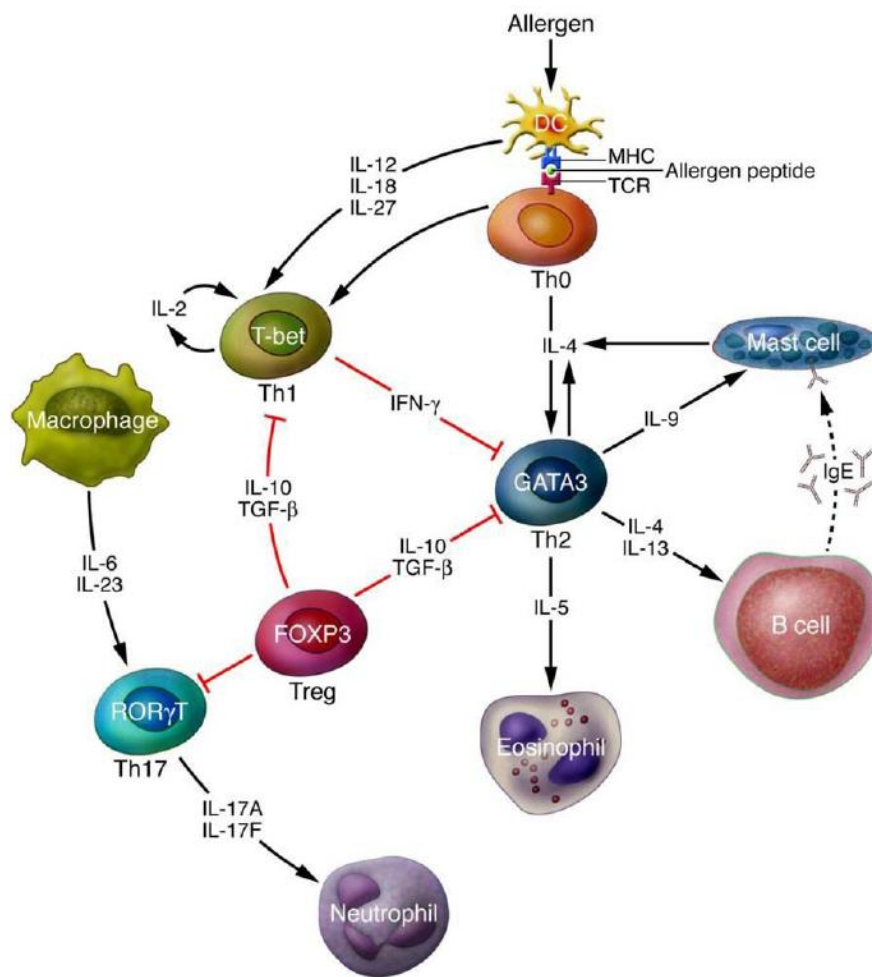


Abb. 4 Differenzierungsweg und Charakteristika der relevanten T-Helferzell-Effektorsubpopulationen bei der Entstehung des allergischen Asthma bronchiale (modifiziert nach Barnes, 2008) [56]

Naive T_H -Zellen können zu Effektor T-Zellpopulationen (T_H1 , T_H2 , T_H17) oder in verschiedene regulatorische Populationen (Treg) differenzieren. Bei der Differenzierung begünstigen verschiedene Zytokine die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren. Die einzelnen Subpopulationen zeichnen sich durch die Produktion bestimmter Zytokine und damit verbundenen spezialisierten Funktionen aus.

1.1.2.1 T_H1 -Zellen

Heute kann man über die reine Definition der T-Helferzelltypen und über das von ihnen sezernierte Zytokinmuster hinausgehen und vielmehr unterschiedliche Immunreaktionen anhand der charakteristischen Effektorfunktionen beschreiben. Von einer T_H1 -Immunantwort spricht man bei der Wirtsabwehr gegen eine Vielzahl von intrazellulären mikrobiellen Antigenen, einschließlich viraler, bakterieller und fungaler Antigene [51, 57]. Über eine

überschießende T_H1 -Antwort werden Autoimmunerkrankungen und chronisch inflammatorische Erkrankungen wie Morbus Crohn, Multiple Sklerose oder Sarkoidose vermittelt [58]. Eine Differenzierung zu T_H1 -Zellen wird unter dem Einfluss von IL-12 während der Antigenpräsentation durch DCs oder Makrophagen gefördert, welches nach Stimulation mit Pathogenen sekretiert wird [59, 60]. Dieser Stimulus induziert den T_H1 -spezifischen Transkriptionsfaktor T-bet (T-box expression factor) und somit die Transkription der proinflammatorischen Zytokine $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ [61, 62].

Die differenzierten T_H1 -Zellen können die Immunabwehr verstärken, indem sie infizierte Makrophagen und zytotoxische T-Zellen aktivieren [63, 64]. T_H1 -Zellen wirken u.a. auch, indem sie die IgG- und IgM-Antikörperproduktion regulieren und den Klassenwechsel nach IgG2a in B-Zellen fördern [51]. T_H1 -Zytokine sind in der Lage neben T_H2 -Zytokinen auch die Produktion von T_H17 -Zytokinen zu hemmen. Somit gelten T_H1 -Zellen nicht nur als wichtige Gegenspieler zu T_H2 -Zellen sondern auch zu T_H17 -Zellen. Studien konnten zeigen, dass in den Atemwegen von Asthmatikern die Expression von T-bet reduziert ist. Man schloss daraus, dass der Verlust dieses Faktors mit der Entstehung des Asthma bronchiale einhergeht. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass eine T-bet Defizienz zu spontanen Asthmasymptomen führt. Demzufolge wurde von vielen Autoren die Vermutung untermauert, dass eine allergische Reaktion durch eine frühe Differenzierung der Immunantwort in Richtung von T_H1 -Zellen vermieden werden kann [65, 66, 67]. Während eine Reihe von Studien zeigen konnte, dass die T_H1 -Zellen eine T_H2 -induzierte Eosinophilie, Atemwegshyperreaktivität (AHR) und Mukussekretion hemmen können [68-72], konnten im Gegensatz dazu andere Studien belegen, dass T_H1 -Zellen die pulmonale Entzündung und die AHR weiter verschlimmern [73, 74, 75].

Die widersprüchlichen Daten in diesen Modellen weisen jedoch darauf hin, dass noch andere Zellen bzw. Faktoren eine entscheidende Rolle spielen und der Zeitpunkt der T_H1 -Zell-Aktivierung im Zusammenhang mit der voranschreitenden T_H2 -Zell-induzierten Entzündungsreaktion einen entscheidenden Einfluss hat [76]. Aus diesen Gründen wird die protektive Rolle der T_H1 -Zellen beim allergischen Asthma inzwischen kontrovers diskutiert und es gibt zahlreiche Untersuchungen, die die Unterdrückung der T_H2 -Zellaktivität und die Reduktion der allergischen Entzündungsreaktion teilweise auf andere Zellen zurückführen.

1.1.2.2 T_H2-Zellen

T_H2-Zellen übernehmen wichtige Aufgaben bei der humoral vermittelten Bekämpfung extrazellulärer Erreger und spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese allergischer Reaktionen [77]. So wird durch Allergene wie Pollen, Hausstaub oder Schimmelpilze die Differenzierung zu T_H2-Zellen bzw. eine dominierende T_H2-Antwort zu Allergien begünstigt [78, 79]. Aus Studien ging hervor, dass die Anzahl an T_H2-Lymphozyten in der BAL (bronchoalveolären Lavage) sowie in Lungenbiopsien von Asthmapatienten erhöht ist. Zusätzlich korreliert die Anzahl an T_H2-Zellen positiv mit dem Schweregrad der Erkrankung. Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass die Hemmung der T_H2-Zellen und deren charakteristischer Zytokine die Symptome des Asthma bronchiale unterdrücken können [80]. Die Wirkung der T_H2-Zellen beruht auf den von ihnen sezernierten Zytokinen IL-4, 5, 6, 9, 10 und 13 über den T_H2-spezifischen Transkriptionsfaktor GATA-3 (GATA binding protein 3) [81, 82, 83].

IL-13 ist der dominierende Faktor für die Pathophysiologie des Asthmas [84, 85, 86]. IL-13 ist entscheidend für die Ausprägung einer AHR und trägt ebenso wie IL-4 zum Immunglobulin-Klassenwechsel aktivierter B-Zellen und damit zur Ausschüttung von IgE, IgG4 beim Menschen bzw. IgG1 bei der Maus bei [87, 88]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass IL-13 für die Induktion einer verstärkten Mukusekretion ein essentieller Faktor ist und bereits in geringen Mengen die Mukusproduktion sehr stark erhöht [89, 90]. IL-4 dagegen hemmt die initiale Differenzierung naiver Vorläuferzellen zu T_H1-Lymphozyten und fördert die Bildung von T_H2-Zellen. Weiterhin begünstigt IL-4 das Wachstum von Mastzellen sowie die Einwanderung von Eosinophilen in das Lungenepithel und stimuliert die Mukusekretion der Becherzellen. Das IL-5 ist wesentlich für Entstehung, Reifung und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten und steuert damit die Entzündungsreaktion nach Allergenexposition. In Abwesenheit von IL-5 ist die Zahl der Eosinophilen in Blut und BAL nach einer T_H2-Zell-Aktivierung nicht erhöht [91, 92].

Erste klinische Studien zeigten allerdings, dass IL-5 spezifische Antikörper (Mepolizumab, Reslizumab) nur in der Lage sind, die Anzahl an eosinophilen Granulozyten im Blut und im Sputum zu senken, jedoch die Lungenfunktion nicht verbessern [138]. Lebrikizumab, ein IL-13 spezifischer Antikörper, konnte nachweislich eine Verbesserung der Lungenfunktion bewirken [139]. Allerdings wurde in Studien auch gezeigt, dass dies hauptsächlich für eine Untergruppe von Patienten gilt, welche die hohe Konzentrationen des Proteins Periostin aufweisen [138]. Wie bereits erwähnt, lässt sich daraus ebenfalls schließen, dass T_H2-Lymphozyten ebenso wie T_H1-Zellen zwar eine wichtige Rolle beim Krankheitsbild

Asthma bronchiale spielen, dass aber auch andere Zelltypen wie z.B. T_H17- und Treg-Zellen von Bedeutung sind und es sich somit um ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlicher Zelltypen handelt. Diese Annahme wird auch dadurch bestätigt, dass nicht alle Asthmatiker einen T_H2-Zell-spezifischen Phänotyp aufweisen [94, 95, 96, 97].

1.1.2.3 T_H17-Zellen

Es ist wahrscheinlich, dass sich unter Evolutionsdruck eine weitere Klasse von T-Helferzellen entwickeln musste, die jene Pathogene bekämpft, die von T_H1- und T_H2-Zellen nicht erfasst werden. Cua et al. konnten 2003 zeigen, dass nicht nur 2 polare T-Helferzellarten existieren, vielmehr, dass T-Zellpopulationen um einiges vielschichtiger aufgebaut sind als ursprünglich angenommen [98]. Diese dritte CD4⁺ Effektorzellpopulation wurde aufgrund ihrer Produktion von IL-17, die weder in T_H1- noch in T_H2-Zellen detektierbar ist, als T_H17 bezeichnet [99]. Die nachfolgende Entdeckung des für T_H17-Zellen spezifischen Transkriptionsfaktors ROR γ t (retinoic acid-related orphan Rezeptor gamma) etablierte diese Subgruppe endgültig als eigenständige Entität [100]. Neben ihrer zentralen Rolle in der Immunabwehr des Wirtsorganismus vor extrazellulären pathogenen stehen Immunantworten durch T_H17-Zellen in direktem Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen und chronisch inflammatorischen Erkrankungen, wie z.B. Morbus Crohn, Multiple Sklerose, Rheumatoide Arthritis und Psoriasis [101, 102, 103, 104].

T_H17-Zellen wirken vorzugsweise auf Zellen außerhalb des Immunsystems ein und fördern Entzündungsprozesse im Gewebe, indem sie Fibroblasten, Endothelzellen oder Epithelzellen der Atemwege zur Synthese proinflammatorischer Zytokine und Chemokine anregen. Eine ausgereifte T_H17-Effektorzelle produziert neben IL-17A und IL-17F, die Interleukine IL-21 und IL-22 (Abb. 5). Zur Bekämpfung extrazellulärer Pathogene (z.B. *Klebsiella pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi*, *Bordetella pertussis*, *Citrobacter rodentium* und Pilze) werden vor allem antimikrobielle Peptide (z.B. human beta defensin-2) sekretiert [131, 132, 133]. Zusätzlich können weitere Zytokine oder Chemokine wie CCL11/Eotaxin (Eosinophilen-chemotaktisch wirkende Chemokin-Ligand 11), CCL17/TARC (thymusaktivitätsreguliertes Chemokin), CCL5/RANTES (reguliertes, Normal-T-Zell-exprimiertes und sekretiertes Chemokin), CCL20, GM-CSF, TNF α , IFN γ , IL-8, IL-26 und IL-10 gebildet werden [105, 106, 107, 108, 130]. Mit Hilfe dieser Zytokine unterstützen T_H17-Zellen die Rekrutierung und Funktion neutrophiler Granulozyten, zytotoxischer T-Zellen und B-Lymphozyten.

Für die Differenzierung von T_H17 -Zellen aus naiven $CD4^+$ Vorläuferzellen sind das immunmodulatorische TGF β (transforming growth factor β) und das proinflammatorische IL-6 essentiell, wobei unter bestimmten Bedingungen auch IL-21 die Funktion von IL-6 übernehmen kann [109, 110]. Dieser Prozess wird durch IL-1 β und TNF α noch verstärkt. Darüber hinaus ist IL-23 weniger für die initiale Differenzierung, sondern vielmehr in der späteren Phase der Differenzierung wichtig, da naive Zellen den IL-23 Rezeptorkomplex noch nicht exprimieren. IL-23 hält die Reifung und dauerhaften Erhalt der Zellen aufrecht, um gleichzeitig die IL-17 Produktion zu verlängern [104, 108]. Die Studienlage zu TGF β in der T_H17 -Differenzierung ist allerdings widersprüchlich, es bestehen jedoch Hinweise darauf, dass geringe Konzentrationen von TGF β die Differenzierung von T_H17 -Zellen begünstigen, wogegen hohe Konzentrationen des Zytokins eher für die Entstehung regulatorischer T-Lymphozyten verantwortlich sind [104, 109].

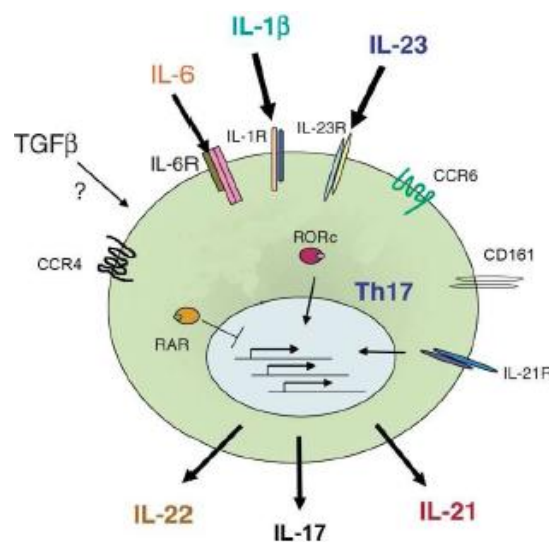


Abb. 5 Darstellung einer T_H17 -Zelle (modifiziert nach Ouyang et al. 2009) [101]

Transkriptionsfaktor, Oberflächenrezeptoren, Zytokine und Effektorzytokine für die Differenzierung von T_H17 -Zellen.

Aufgrund der Bandbreite an produzierten Effektorzytokinen und der Fähigkeit, bestimmte Erkrankungen auszulösen, wurden zwei unterschiedliche Subtypen von T_H17 -Zellen charakterisiert, die sich grundlegend in ihrer Funktion sowie Pathogenität unterscheiden und möglicherweise dichotom zu kategorisieren sind. Für die Pathogenität der T_H17 -Zellen ist nicht das Signalytokin IL-17, sondern die Ko-Expression der Zytokine IFN γ oder IL-10

entscheidend [111, 112, 113, 114]. Die Ko-Expression von $\text{IFN}\gamma$ ($\text{T}_{\text{H}}17/\text{T}_{\text{H}}1$ -Phänotyp) führt dabei zur Ausprägung pathogener Eigenschaften innerhalb der $\text{T}_{\text{H}}17$ -Zellpopulation [115, 116]. Bei Autoimmunerkrankungen oder chronisch inflammatorischen Erkrankungen des Menschen und im Mausmodell, wie z.B. Morbus Crohn, konnte in entzündlich veränderten Geweben der Mukosa neben IL-17 die $\text{IFN}\gamma$ Koproduktion von $\text{T}_{\text{H}}17$ -Zellen (IL-23 oder IL-1 β induziert) über den „alternativen“ TGF β -unabhängigen Differenzierungsweg nachgewiesen werden [117]. Während autoreaktive IL-10 ko-produzierende $\text{T}_{\text{H}}17$ -Zellen (TGF β -abhängiger Differenzierungsweg), welche unter IL-6 und TGF β enthaltenden Bedingungen differenziert wurden, in einem Mausmodell der MS keine Krankheitssymptome oder neuro-inflammatorische Veränderungen des ZNS auslösen [118, 119]. IL-10 produzierende $\text{T}_{\text{H}}17$ -Zellen (IL-6 und TGF β induziert) besitzen daher anti-inflammatorische Eigenschaften und vermitteln einen protektiven, immunsuppressiven Effekt bei entzündungsbedingten Immunantworten [114, 115].

Pathogenitätsfaktoren für Generierung beider $\text{T}_{\text{H}}17$ -Subpopulationen stellen die unterschiedlichen Signal- und Differenzierungswege dar [120, 121]. Analog zum Mausmodell wird für humane $\text{T}_{\text{H}}17$ -Zellen über zwei verschiedene Polarisierungswege diskutiert. Während IL-6 zusammen mit TGF β (IL-10 Induktion) und IL-23 ($\text{IFN}\gamma$ -Induktion) essentiell für die Differenzierung der $\text{T}_{\text{H}}17$ -Subpopulationen sind, fungiert IL-1 β als molekularer Schalter für die Determinierung eines pathogenen oder anti-inflammatorischen Differenzierungswegs. Dabei wird durch die Antigenpezifität der naiven T-Helferzellen festgelegt, ob diese IL-1 β für die Differenzierung benötigen oder nicht [114, 115]. *Candida albicans*-spezifische $\text{T}_{\text{H}}17$ -Zellen produzieren das IL-1 β induzierte proinflammatorische Zytokinprofil (IL-17 und $\text{IFN}\gamma$), aber nicht IL-10, während *Staphylococcus aureus*-spezifische $\text{T}_{\text{H}}17$ -Zellen das anti-inflammatorische Zytokinprofil ohne IL-1 β Induktion (IL-17 ohne $\text{IFN}\gamma$) produzieren, aber die Fähigkeit besitzen IL-10 zu produzieren [114, 115]. Somit bestimmen unterschiedliche Pathogene die Funktion der Effektorzellen, indem sie die IL-1 β Sekretion von APCs induzieren oder nicht, die sich in ihrem Differenzierungsweg (IL-1 β Abhängigkeit) während des „Primings“ ihrer immunregulatorischen Funktion (pro- oder anti-inflammatorisch) sowie ihrer Antigenpezifität unterscheiden.

Die genaue Rolle der $\text{T}_{\text{H}}17$ -Zellen im allergischen Asthma ist allerdings kontrovers. Einerseits konnte gezeigt werden, dass sowohl im murinen Asthmodell als auch im Plasma von Asthmapatienten vermehrt $\text{T}_{\text{H}}17$ -Zytokine vorhanden sind und die Menge mit der Schwere der Erkrankung korreliert, besonders im neutrophilen, steroid-resistenten Asthma [122, 123, 124]. $\text{T}_{\text{H}}17$ -Zellen und IL-23 verschlimmern die Antigen-induzierte

T_H2 -Zell-vermittelte Rekrutierung von Eosinophilen in die Atemwege [125]. Weitere Experimente zeigten ebenfalls, dass T_H17 -Zellantworten nach Sensibilisierung mit Allergenen zu Neutrophilie in den Atemwegen, akuter Atemwegshyperreaktivität und zu einer vermehrten Schleimproduktion der Becherzellen (Hyperplasie) führen [126, 127, 128]. Paradoxerweise wurde im Gegensatz dazu gezeigt, dass IL-17A für die Initiierung von T_H2 -Immunantworten wichtig ist, aber während der Effektorphase des allergischen Asthmas eine Verminderung der Entzündung der Atemwege induziert [129, 130]. In der chronischen Phase bewirkte die Gabe von IL-17A im Maus-Modell, dass die T_H2 -Zytokinproduktion, die Eosinophilie und die bronchiale Hyperreagibilität reduziert wurden. Diese Studie deutete darauf hin, dass IL-17A protektive Effekte bei der Asthma-Reaktion auslöste [130].

Daneben konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass bei einer bestehenden allergischen Atemwegsentszündung IL-17A in der Lage ist, die durch eine virale Infektion hervorgerufene Atemwegshyperreaktivität zu unterdrücken [134]. Weitere Experimente zeigten auch, dass IL-17A, welches von $\gamma\delta$ -T-Zellen freigesetzt wurde, antigenpräsentierende Zellen zur Produktion von IL-23, IL-1 β , IL-6 und TGF β anregt, welche dann wiederum die Differenzierung von pathogenen T_H17 -Zellen fördern [135, 136]. Daraus lässt sich schließen, dass die jeweilige Rolle von IL-17A - pro- bzw. anti-inflammatorisch - auch vom jeweiligen produzierenden Zelltyp abhängig ist.

1.2 Epidemiologie

In den letzten Jahrzehnten hat die Zahl der Asthmaerkrankungen stark zugenommen und stellt derzeit eine der weltweit häufigsten multifaktoriellen chronisch verlaufenden Volkskrankheiten dar. Die „Globale Initiative für Asthma (GINA)“ geht von ca. 300 Millionen betroffenen Menschen auf der ganzen Welt aus [140]. Epidemiologische Studien, wie z.B. die ISAAC-Studie (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) und die ECRHS-Erhebung (European Community Respiratory Health Survey), konnten vor allem einen Anstieg der Inzidenz und Prävalenz von Asthma und Allergien in den westlichen, industrialisierten Staaten der Welt im Vergleich zu weniger entwickelten Ländern belegen [141, 142, 143]. In Deutschland liegt die Prävalenz für das allergische Asthma bei etwa 5 % der erwachsenen und 10 % der kindlichen Bevölkerung [144, 145]. Jährlich sterben 1000-2000 Menschen an den Folgen der Erkrankung [146, 147]. Neben gesundheitlichen Einschränkungen verursacht das Asthma bronchiale auch erhebliche ökonomische Defizite und stellt somit ebenso ein volkswirtschaftliches Problem dar. Die

Bestandsaufnahmen des aktuellen „Weißbuch Lunge 2014“ belegen, dass die jährlichen Kosten zur Prävention und Behandlung des Asthma bronchiale in Deutschland bei 690 bis 980 Millionen Euro liegen [148]. Diese Fakten sorgen für ein großes Interesse an effektiven Vorbeugungsmaßnahmen zur Vermeidung des allergischen Asthma bronchiale.

1.2.1 Risikofaktoren

Die genetische Prädisposition bzw. die angeborene positive Familienanamnese für Atopie stellt den bedeutendsten Risikofaktor für die Entwicklung des allergischen Asthma bronchiale dar [149-151]. So belegen Ergebnisse aus epidemiologischen Familien- und Zwillingsstudien, dass Kinder von Allergikern im Vergleich zu Kindern nicht allergischer Eltern ein um 60 % erhöhtes Risiko haben, ebenfalls Asthma bronchiale zu entwickeln [152-154]. Die genetische Determinante der mütterlichen und väterlichen Anamnese bildet allerdings unterschiedliche Risikofaktoren bei der Entwicklung des kindlichen Asthma bronchiale. So basiert der mütterliche Einfluss einerseits auf genetischen Faktoren, aber auch auf exogenen Faktoren *in utero* und dem Zeitraum kurz nach der Geburt, während der väterliche Effekt ausschließlich genetischen Ursprungs ist [155-156]. Weitere genetische Assoziationsstudien haben eine Reihe von Kandidatengenen identifiziert, die für Faktoren kodieren, die an der Pathogenese der allergischen Immunantwort beteiligt sind [157-160], so z.B. Gene, die auf Chromosom 5 lokalisiert sind und für Zytokine der T_H2-Zellen (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13) kodieren, die wichtige regulatorische Funktionen (Eosinophilen- und Mastzell-Differenzierung, Regulation des IgE-Serumspiegels) innerhalb der damit verbundenen T_H2-Antwort besitzen [161-163]. Darüber hinaus konnten genetische Variationen auf Chromosom 6 (MHC-II Region) und der α -Kette des T-Zellrezeptors identifiziert werden, die eine wesentliche Rolle bei der Antigenpräsentation spielen und mit dem Auftreten des allergischen Asthma bronchiale assoziiert werden [164, 165]. Obwohl die genetische Prädisposition einen bedeutenden Risikofaktor für die Entwicklung allergischer Erkrankungen darstellt, ist es jedoch unwahrscheinlich, dass eine genotypische Veränderung der Immunantwort innerhalb weniger Jahrzehnte für die drastische Zunahme der Prävalenz verantwortlich sein kann [166-168]. Eine solche grundlegende Veränderung auf genomischer Ebene kann sich erst nach mehreren Generationen in einer Population durchsetzen, was zwangsläufig zu der Frage nach den Gründen für die epidemischen Ausmaße der Prävalenz in den letzten Jahrzehnten führt. Durch eine Reihe epidemiologischer Studien konnten einige umweltbedingte Risikofaktoren sowie veränderte Lebensbedingungen identifiziert werden,

die einen erheblichen Einfluss auf die Initiation und Manifestation von allergischen Erkrankungen haben [169]. So konnte gezeigt werden, dass Kinder der ost- bzw. westdeutschen Bevölkerung unmittelbar nach der Wiedervereinigung Deutschlands, die innerhalb einer ethnisch-genetisch weitgehend identischen Bevölkerungsgruppe in vergleichbarer Geographie, jedoch in einem unterschiedlichen sozioökonomischen und ökologischen Umfeld aufwuchsen, eine unterschiedliche Prävalenz für allergische Erkrankungen aufweisen [170]. Heinrich et al. beobachteten einen Anstieg allergischer Erkrankungen bei Kindern in Ostdeutschland, die nach der Wiedervereinigung geboren wurden [185]. Neben Faktoren des sozialen Umfeldes scheinen aber auch Veränderungen des Lebensstils wie z.B. Ernährungsgewohnheiten (mangelnde Bewegung und Fettleibigkeit), der übermäßige Einsatz von Antibiotika, Wohnungsbeschaffenheit und erhöhte häusliche Allergenexposition, Haustierhaltung sowie Luftverschmutzung durch Schadstoffe (Abgase, Ozon, Stickstoffoxid, Tabakrauch) und die Industrialisierung mit der Entwicklung von Allergien im Zusammenhang zu stehen [170-176]. Auf der anderen Seite wurden eine Reihe an Faktoren beschrieben, die das Risiko, an Allergien zu erkranken, mindern. Bei Kindern mit einer hohen Geschwisterzahl oder Kindern, die eine Kinderkrippe besucht haben, zeigte sich eine geringere Inzidenz für Allergien und Asthma [170, 177-180]. Hierbei spielen virale oder bakterielle Infektionen eine besondere Rolle. Man geht davon aus, dass gehäufte virale Infekte der Atemwege im Kleinkindalter gesunde Kinder vor Asthma schützen, wohingegen sie sich bei bereits erkrankten Kindern eher negativ auf das Langzeitrisiko auswirken [176, 181-184]. Allerdings ist die exakte Bedeutung von Pathogenen für die Initiation dieser Erkrankung vielfältig und bislang nicht vollständig geklärt. Eine besondere Stellung nimmt in diesem Zusammenhang die Rolle bakterieller Infektionen ein. In den 80er Jahren wurde erstmals ein möglicher Zusammenhang zwischen Hygiene im allerweitesten Sinne und der Entwicklung von Asthma und Allergien diskutiert. Strachan et al. postulierte die sogenannte „Hygiene-Hypothese“, die besagt, dass die Zunahme der Allergie- und Asthma-Prävalenz in industrialisierten Ländern das Ergebnis verminderter bakterieller Infektionen bzw. der Exposition im Kindesalter ist, bedingt durch den verbesserten Hygienestatus der Lebensbedingungen [177]. Daher wird im Rahmen der Hygiene-Hypothese für die mikrobielle Exposition eine allergoprotektive Rolle angenommen.

1.2.2 Protektive Faktoren – Mikrobielle Stimuli

In den letzten Jahren hat die „Hygiene-Hypothese“ zunehmend an Aufmerksamkeit gewonnen und zahlreiche epidemiologische Studien bestätigten die Annahme, dass die mikrobielle Exposition einen protektiven Effekt auf die Allergieentwicklung hat [186, 187]. Erste Anhaltspunkte zur Allergieprävalenz für diese Hypothese lieferte die in der Schweiz durchgeführte SCARPOL-Studie (Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution, Climate and Pollen). Im Rahmen dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass Kinder, die auf einem Bauernhof aufwachsen, ein geringeres Risiko besitzen, an Atopie zu erkranken [188]. Die Querschnittsstudie ALEX (Allergy and Endotoxin) untersuchte 1999 mehr als 900 Schulkinder aus Bauernhöfen und ländlichen Regionen ohne Bauernhofkontakt (Landkinder) in traditionellen alpinen Regionen (Deutschland, Österreich und Schweiz). Diese Studie deutete darauf hin, dass neben dem Kontakt zu Tierställen bzw. der Aufnahme von mikrobiellen Bestandteilen über die Atemwege (LPS-Aerosolinhalation) der Bauernhofkinder der Konsum von unpasteurisierter Kuhmilch im frühen Kindesalter - insbesondere im ersten Lebensjahr - ebenfalls stark protektiv auf die Entwicklung von Atopie und Asthma wirkt [189-191]. Die darauffolgende PARSIFAL-Studie (Prevention of Allergy-Risk Factors for Sensitization Related to Farming and Anthroposophic lifestyle), die in einer Querschnittsstudie Kinder bzgl. ihrer prä- und postnatalen sozioökonomisch-spezifischen Exposition vergleicht, bestätigte ebenfalls, dass der protektive *in utero*-Effekt durch das Arbeiten der Schwangeren im Tierstall und durch den protektiven Einfluss von Bauernhofmilchkonsum während des ersten Lebensjahres herbeigeführt wird [192, 193]. Wie in der ALEX-Studie wurden hier auch Stallstäube, Stäube von Kindermatratzen und Wohnräumen gesammelt [191]. Der Gehalt an mikrobiellen Komponenten (Endotoxin- und N-Acetylmuraminsäure-Gehalt) in den Matratzen von Bauernhofkindern war deutlich höher als bei Landkindern und korrelierte invers mit dem Vorkommen von Heuschnupfen, atopischem Asthma und atopischer Sensibilisierung [194, 195]. Alle diese Studien zeigen, dass Kinder, die auf einem Bauernhof aufgewachsen und einer größeren Vielfalt an Mikroben ausgesetzt sind, signifikant weniger an atopischen Krankheiten und Asthma leiden [196]. Man spricht zusammenfassend von einem protektiven mikrobiellen „Bauernhof-Effekt“.

Um die Ergebnisse dieser Studien weitergehend zu untersuchen und die protektiven Faktoren näher zu charakterisieren, wurden im Rahmen der ALEX-Studie Bakterienisolate aus Stallstäuben gewonnen. Die apathogenen Keime *Acinetobacter lwoffii* F78 (*A. lwoffii* F78, gram-negativ) und *Lactococcus lactis* G121 (*L. Lactis*, gram-positiv) wurden als dominante

Mikroorganismen in Ställen identifiziert. [197]. *In vivo*-Mausversuche bestätigten tierexperimentell den protektiven Effekt mikrobieller Bauernhofexposition anhand beider Keime nach intranasaler Applikation im Modell der murinen allergischen Atemwegsinflammation bezüglich des asthmatischen Phänotyps [197, 198]. Daneben führte die Behandlung von Mäusen mit bakteriellen Bestandteilen wie LPS und bakterieller CpG (Cytosin-Phosphat-Guanin)-DNA ebenfalls zu einem anti-allergischen immunmodulierenden Effekt [199, 200].

Die oben genannten Studien deuten darauf hin, dass ein gewisses Zeitfenster („Window of Opportunity“) in der Manifestation existiert, nämlich die pränatale und frühkindliche Lebensphase, in welcher die Immunmodulation durch exogene Faktoren wie mikrobielle Stimuli stattfinden muss, um die Etablierung und Ausprägung einer Allergie bzw. die Induktion von Toleranzmechanismen zu beeinflussen [201]. So zeigten Kinder, bei denen der protektive Effekt der „Bauernhof-Exposition“ vor und während des ersten Lebensjahres vermittelt wurde im Vergleich zu Kindern, die nach dem ersten Lebensjahr einer solchen Exposition ausgesetzt waren, eine geringere Frequenz von Asthma (1 % vs. 11 %), Heuschnupfen (3 % vs. 13 %) und atopischer Sensibilisierung (12 % vs. 29 %) [201]. Um die pränatalen Einflüsse der mikrobiellen Exposition genauer zu untersuchen, wurde innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe anhand eines Mausmodells der allergischen Atemwegsentzündung gezeigt, dass die maternale Exposition mit dem Modellkeim *A. lwoffii* F78 zu einer deutlichen Reduktion des asthmatischen Phänotyps in den Nachkommen führt [198].

Als mögliche Erklärung für diese Befunde kann die Tatsache herangezogen werden, dass das unausgereifte Abwehrsystem im Säuglingsalter eine T_H2-dominierte Immunantwort aufweist, um eine mögliche Immunreaktion zwischen Mutter und Kind während der Schwangerschaft und Geburt zu vermeiden [202-205]. Frühkindliche Infektionen und die verstärkte Exposition mit mikrobiellen Komponenten sind dabei wichtige Stimulatoren und entscheidend für die Reifung einer normalen T_H1 Immunantwort und Unterdrückung der allergieassoziierten T_H2-Antwort [206]. Der dabei zu Grunde liegende Mechanismus scheint somit an der mangelhaften oder fehlenden Programmierung des Immunsystems im frühen Kindesalter zu liegen, so dass dieser T_H1 Lernprozess in der postnatalen Periode verzögert bzw. vermindert ist [207-208].

1.2.3 Bedeutung der angeborenen Immunantwort bei der Aktivierung und Polarisierung von T-Helferzellen für die Allergieentwicklung

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel (s. Kapitel 1.2.2) erwähnt, wird die erhöhte mikrobielle Belastung in der Bauernhofumgebung als wesentlicher Faktor der Allergieprävention diskutiert und vermutet, dass Mikroorganismen oder deren Bestandteile das noch nicht vollständig gereifte Immunsystem beeinflussen und prägen [182, 187]. Da die mikrobielle Infektabwehr vorherrschend Aufgabe der sogenannten angeborenen Immunität („innate immunity“) ist, die Immunopathologie der allergischen Erkrankungen sich aber vorwiegend im Zweig der erworbenen Immunität („adaptive immunity“) abspielt, wird für den Effekt mikrobieller Faktoren auf die Entwicklung allergischer Erkrankungen eine Interaktion der Zweige angenommen. In diesem Zusammenhang wird den zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems, den Antigenpräsentierenden Zellen (DC's, Makrophagen), eine zentrale Bedeutung beigemessen, da diese einen wesentlichen Anteil an der Immunaktivierung haben und die nachfolgenden Antworten des erworbenen Immunsystems gerade im Hinblick auf die T-Helfer-Polarisierung beeinflussen bzw. modellieren können [209-211]. So können T-Helferzellen, wie bereits in Kapitel 1.1.2 beschrieben, nicht direkt auf ein Antigen reagieren und benötigen eine effiziente Präsentation der entsprechenden Antigene durch professionelle APC, um diese über den TCR zu erkennen. Eine Schlüsselrolle bei der Erkennung von mikrobiellen Antigenen spielen neben den neutrophilen Granulozyten die phagozytierenden Makrophagen.

Residente Makrophagen sind in nahezu allen Geweben zu finden. So auch in der Lunge, wo sie aufgrund ihrer Lokalisation als Alveolarmakrophagen bezeichnet werden. Sie sind die ersten immunologisch aktiven Zellen, die im Falle einer Infektion mit Krankheitserregern in Kontakt kommen und eine wichtige zelluläre Barriere für invasive Mikroorganismen darstellen. Die Hauptaufgabe der Makrophagen ist die Phagozytose der vorhandenen Keime. Daneben umfasst die angeborene Immunität auch humorale Komponenten, wie z.B. das kaskadenartige Komplementsystem mit seinem Membranangriffskomplex sowie Enzyme (Lysozym), welche ebenfalls in der Lage sind, Mikroorganismen zu eliminieren [213]. Die phagozytierten Krankheitserreger werden mit Hilfe von reaktiven Sauerstoffspezies (RSS), Proteasen und antimikrobiellen Peptiden abgetötet. Die abgetöteten Keime werden anschließend weiter prozessiert und kleine Teile der Keime zusammen mit Haupthistokompatibilitätskomplexen und kostimulatorischer Moleküle (CD80 und CD86) auf der Zelloberfläche präsentiert. Durch den Kontakt mit diesen Komplexen werden naive T-Zellen aktiviert. Im Allgemeinen findet die Antigenpräsentation in den peripheren

lymphatischen Geweben und Organen (beispielsweise Lymphknoten oder Milz) statt. Aktivierte Makrophagen müssen also über die Lymphe in diese Gewebe einwandern, um auf antigenspezifische T-Zellen zu treffen und diese zu aktivieren. Unter regelhaften Bedingungen wird nach Aktivierung der APC über Toll-like Rezeptoren (TLR) ein Zytokinmuster sezerniert, welches wiederum eine T_H-Polarisation zur Folge hat oder aber proinflammatorisch wirken kann. Somit sind Makrophagen ein wichtiges Bindeglied zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort [212].

Die Erkennung der Mikroorganismen auf zellulärer Ebene über Makrophagen erfolgt mit Hilfe von sogenannten keimbahnkodierten Mustererkennungsrezeptoren (PRR, pattern recognition receptors), die konservierte mikrobielle Oberflächenstrukturen (PAMPs, pathogen associated molecular patterns) als körperfremd erkennen [214]. Zu den PAMPs gehören beispielsweise bakterielle Zellwandmoleküle, wie Lipopolysaccharide (LPS) oder Peptidoglycan (PGN), oder aber unmethylierte DNA-Motive (CpG). Eine große Familie der PRRs bilden die TLRs. TLRs sind Typ-I-Transmembranproteine, die unterschiedliche PAMPs erkennen [209]. Wie zuvor beschrieben, ist das Atemwegsepithel ständig einer Vielzahl pathogener Mikroorganismen ausgesetzt. Aus diesem Grund findet man in dieser Situation angepasstes TLR-Profil. So erkennt bspw. TLR2 als Heterodimer mit TLR1 bzw. TLR6 Lipoteichonsäuren und Lipopeptide gram-positiver Bakterien, während TLR4 den Rezeptor für das LPS gram-negativer Bakterien darstellt [215-217]. LPS wird von einem Lipopolysaccharid-Bindungsprotein (LBP) opsonisiert und dieser Komplex vom CD14-Rezeptor auf phagozytierenden Zellen erkannt und gebunden, was letztlich in einer Aktivierung des TLR4 resultiert. Diese führt über verschiedene Signalwege zu einer Aktivierung proinflammatorischer Zytokine aber auch antimikrobiellen Peptiden wie z.B. hBD-2 (humane β -Defensin 2) [218]. Insbesondere Makrophagen reagieren auf eine LPS Stimulation unter anderem mit der Sekretion von IL-6, TNF- α , IL-1 β und IL-12 [219]. Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass die *A. lwoffii* Exposition durch PRRs eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems auslösen kann. Muttertiere, die eine Toll-like Rezeptor (TLR) 2/3/4/7/9^{-/-} Defizienz besaßen, waren nicht in der Lage, den protektiven Effekt der *A. lwoffii* Behandlung auf ihre Nachkommen zu übertragen [198]. Auch die Zytokinanalyse der im Rahmen des Pränatal-Modells mit *A. lwoffii*-behandelten Mütter, zeigte, dass durch die intranasale Applikation von *A. lwoffii* eine Immunantwort ausgelöst wird, die mit einer Erhöhung der Zytokine IL-6, TNF α und IL-12p40 in den Muttertieren einhergeht [198]. Insbesondere IL-6 könnte ein relevanter Mediator in Bezug auf die Übertragung des *A. lwoffii* F78-vermittelten Effekt der Asthmaprotektion von der Mutter auf

deren Nachkommen sein [198]. Hier sind jedoch weitere Studien nötig, um den Mechanismus der transmaternalen Vermittlung der Asthmaprotektion endgültig aufzuklären. Daher ist das Verständnis der Interaktion innerhalb dieses komplexen Zytokinnetzwerkes von entscheidender Bedeutung für die Immunpathogenese allergischer Erkrankungen. Die unterschiedlichen Zytokinprofile determinieren distinktive Effektorfunktionen und könnten möglicherweise eine relevante Interaktion zwischen angeborener und erworbener Immunabwehr in der Pathogenese der allergischen Erkrankungen darstellen.

1.3 Asthma und Epigenetik

Wie bereits erwähnt, wird neben einer genetischen Prädisposition insbesondere Umweltfaktoren ein großes Gewicht in der Asthmapathologie beigemessen. Conrad Waddington definierte die Interaktion der Gene mit ihrer Umwelt, die den Phänotyp hervorbringt, mit dem Begriff „Epigenetik“ [220]. Demzufolge beziehen sich epigenetische Einflüsse auf Variationen des Phänotyps oder des Genexpressionsstatus aus einem Genotyp, die durch eine Änderung der Genexpression auftreten, jedoch ohne Veränderungen an der DNA-Sequenz. Epigenetische Prozesse sind strukturelle Modifikationen des Chromatins, ausgelöst durch DNA-Methylierung und posttranslationale Histon-Modifikationen, um veränderte zelluläre Aktivitätszustände zu registrieren, zu signalisieren oder aufrechtzuerhalten [221]. Diese Modifikationen werden als übergeordnete, mitotisch und meiotisch vererbare Regulationsmechanismen der Genexpression definiert, die jedoch selbst nicht in der DNA-Sequenz kodiert sind, d.h. epigenetische Modifikationen können vererbbar sein ohne ihre Plastizität zu verlieren und das Potential, vorhandene Modifikationen zu löschen und neue zu erstellen, bleibt erhalten [222]. Die am besten untersuchte Modifikation von DNA in Säugern ist die Methylierung von Cytosinen in CpG (Cytosin-phosphatidyl-Guanosin)-Dinukleotiden. Die andere Hauptgruppe epigenetischer Modifikationen bildet die posttranslationale Modifikation von Histonen, zu denen die Acetylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Methylierung zählen. Die verschiedenen Arten epigenetischer Modifikationen sind eng miteinander verbunden und modulieren sich oft gegenseitig bei der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse. Die DNA-Hypermethylierung innerhalb einer Promotorregion löst beispielsweise die Deacetylierung lokaler Histone aus, wogegen geringere Level der Histonacetylierung die DNA-Methylierung unterstützen [223]. Bisher konnte gezeigt werden, dass Umweltbedingungen die epigenetische Reprogrammierung beeinflussen

können. Ergebnisse aus eineigen Zwillingstudien belegen, dass sich die DNA-Methylierungsmuster ihrer Genome in den jungen Jahren zwar noch stark ähneln, aber mit zunehmendem Alter und damit einer zunehmenden Interaktion mit unterschiedlichen Umweltfaktoren traten stärkere Unterschiede im Methylierungsmuster auf [224]. So sind z.B. Methylierungsprozesse stark von der Verfügbarkeit von Methylgruppen und Kofaktoren abhängig. Diese werden wiederum weitgehend durch die Nahrungsaufnahme *in vivo* bzw. durch das Kulturmedium *in vitro* bestimmt. Methylgruppendonoren sind z.B. essentielle Nahrungsbestandteile wie Vitamin B12, Folsäure und die Aminosäure Methionin. Tierexperimente zeigten ebenfalls, dass über die Ernährung die DNA-Methylierung verändert und somit der Phänotyp beeinflusst werden kann. [225]. Im Mausmodell führte eine Nahrungsergänzung mit Methylgruppendonatoren von Muttertieren bei deren Nachwuchs zur Hypermethylierung eines Allels des Agouti-Locus, einhergehend mit einer dunkleren Fellfarbe der Mäuse [226]. Neuere Studien weisen darauf hin, dass der epigenetische Mechanismus der DNA-Methylierung als Form einer Gen-Umwelt-Interaktion auch im Rahmen der Entstehung von Asthma eine Rolle spielen könnte. Es wird postuliert, dass fehlende mikrobielle Exposition in der frühen Kindheit eine Demethylierung bzw. Aktivierung des IFN γ -Gens verhindert. Dadurch entstehe eine T_H1/T_H2-Dysbalance, die das Risiko der Allergieentwicklung erhöhe [227]. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte liefert die Epigenetik eine mögliche Erklärung dafür, wie Umwelteinflüsse Auswirkungen auf genetischer Ebene haben könnten. In der vorliegenden Arbeit konzentrierten wir uns auf die DNA-Methylierung in murinen T-Zellen. Die diesen pathologischen Veränderungen zugrunde liegenden Mechanismen sind sehr komplex und werden im Folgenden näher beschrieben.

1.3.1 DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung umfasst die epigenetische Modifikation, bei der die Anlagerung einer Methylgruppe über eine kovalente Bindung an eine Base der DNA erfolgt. Dieser Prozess findet bei Eukaryonten fast ausschließlich am 5'-Kohlenstoff von Cytosin (C) statt, wenn es 3' direkt von der Base Guanosin (G) gefolgt wird, d.h. das Dinukleotid Cytosin-phosphatidyl-Guanosin (CpG) vorliegt (Abb. 6) [228]. Diese sogenannten "CpG-Islands" stellen typischerweise unmethylierte Sequenzbereiche dar und kommen häufig in Promotorbereichen von Genen vor [228]. Die für die Katalysierung der DNA-Methylierung verantwortlichen Enzyme werden DNA-Methyltransferasen (DNMTs) genannt, zu deren wichtigsten Vertretern die für die Aufrechterhaltung der Methylierung verantwortlichen maintenance Methyl-

transferasen, wie z.B. DNMT1, sowie die für die *de novo*-Methylierung verantwortlichen DNMT3A und DNMT3B zählen [228]. DNMT1 kopiert bereits vorhandene Methylierungsmuster, d.h. sie methyliert DNA im Rahmen der Replikation und braucht als Vorlage einen hemi-methylierten DNA-Strang. Der neu gebildete, unmethylierte Strang wird dann nach diesem Vorbild vervollständigt [228]. Dagegen etablieren *de novo*-Methyltransferasen (DNMT3A und DNMT3B) neue Methylierungsmuster, d.h. unmethylierte CpGs können neu methyliert werden [229]. Für die normale Entwicklung der Zellen ist die DNA-Methylierungsmaschinerie essentiell. Wird diese gestört, z.B. durch das Fehlen einer der Methyltransferasen, kommt es zur fehlerhaften Methylierung bzw. Demethylierung des Genoms. Dies führt zu einer genomweiten Inhibition der Methylierung, die vor allem während der embryonalen Entwicklungsphase zu einem letalen Phänotyp führt [230].

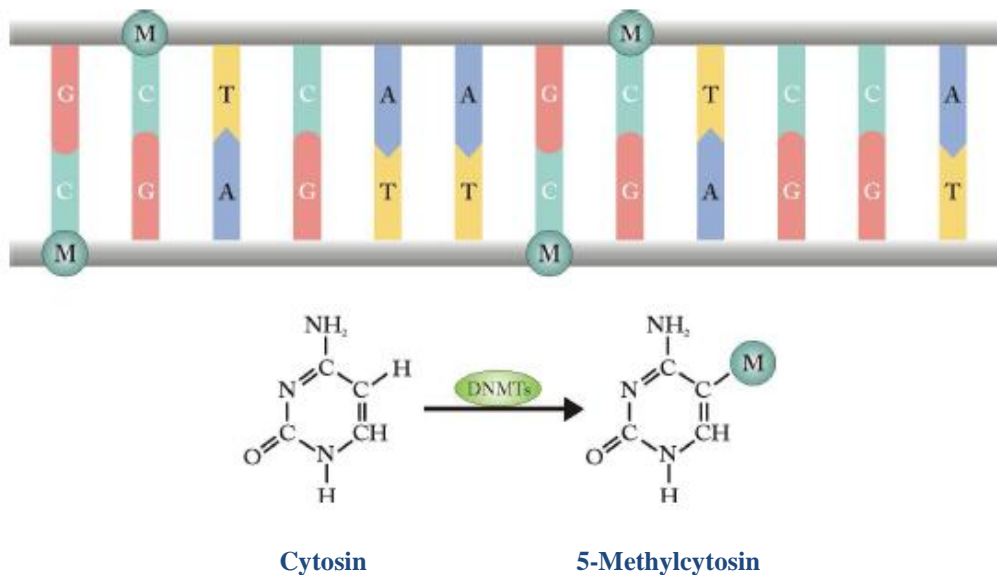


Abb. 6 Mechanismus der DNA-Methylierung (modifiziert nach Feinberg and Tycko, 2004) [231]

DNA-Methyltransferasen lagern bei vorliegender Basenpaarung von Cytosin und Guanin an das 5'-Kohlenstoffatom des Cytosin eine Methylgruppe an. M: Methylierung, DNMTs: DNA-Methyltransferasen.

In vielen biologischen Prozessen spielen DNA-Methylierungen zur Kontrolle der Genexpression eine entscheidende Rolle: im Rahmen der Embryogenese beim „Imprinting“ und der Chromosom-X-Inaktivierung, zum Schutz des Erbgutes vor sich selbst replizierender DNA wie Transposons und retroviraler DNA oder im Bereich der Cancerogenese durch Assoziation mit der Expression von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen [232-234]. Auch während der Differenzierung von naiven T-Zellen in verschiedene Subpopulationen ist das Expressionsmuster zellspezifischer Zytokine von der Bindung der Transkriptionsfaktoren an

die entsprechenden genomischen Loci abhängig, welche wiederum durch epigenetische Modifikationen reguliert werden. Die epigenetische Modifikation der DNA-Methylierung greift bereits prätranskriptionell in die Genregulation ein. Die Konsequenz der Methylierung ist die Repression der Transkription der entsprechenden Gene, welche sowohl direkt als auch indirekt vermittelt werden kann [235]. Die direkte Transkriptionshinhibition durch DNA-Methylierung erfolgt über methylierte Cytosine, die in die große Furche der DNA-Doppelhelix ragen und durch sterische Blockade die Bindung von regulatorischen Proteinen (Transkriptionsfaktoren) verhindern (Abb. 7) [236, 237]. Die indirekte Inhibition der Transkription erfolgt über Proteine, die über eine Methyl-CpG-Binde-Domäne (MBD) spezifisch an methylierte DNA binden. Dabei rekrutieren diese Proteine weitere Ko-Repressoren und verhindern so die Genexpression [229]. Zu den rekrutierten Ko-Repressoren gehört auch die Histondeacetylase, die über eine Modifikation der Histone zu einer deacetylierten repressiven Chromatinstruktur führt und somit zur Transkriptionshinhibition beiträgt (Abb. 7) [228]. Hier zeigt sich die enge Verknüpfung der epigenetischen DNA-Methylierung mit dem Mechanismus der Histonmodifikation. Man geht davon aus, dass Histonmodifikationen für eine rasche und flexible Transkriptionskontrolle verantwortlich sind, während DNA-Methylierungen Gene langfristig aktivieren und deaktivieren können und diesen Zustand auch an Tochterzellen weitergeben [238].

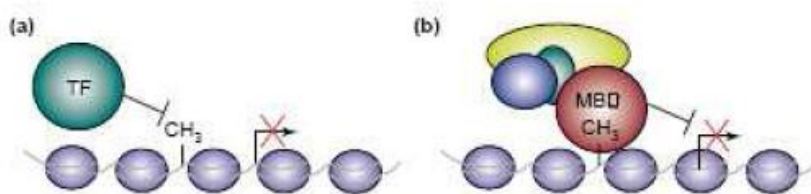


Abb. 7 Mechanismen der Transkriptionshinhibition durch DNA-Methylierung (modifiziert nach Klose et al. 2006) [229]

Die DNA-Methylierung verhindert entweder direkt die Bindung von Transkriptionsfaktoren oder indirekt über die Bindung von MBD-Proteinen zur Rekrutierung weiterer Ko-Repressoren.

1.4 Das Cholera Toxin

Das Cholera Toxin (CT) wird von den stäbchenförmigen gram-negativen Bakterien *Vibrio cholerae* sezerniert. Das toxische Protein besteht aus zwei Untereinheiten (A und B) unterschiedlicher Größe, welche einzeln keine toxischen Eigenschaften besitzen [247]. Die Untereinheit A ist ein Heterodimer und besteht aus den Fragmenten A1 und A2, welche über eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden sind. CTA ist in ein Homopentamer aus fünf identischen B-Untereinheiten (CTB) eingelagert. Das Fragment A2 verbindet die A- und B-Untereinheit miteinander [247]. Die spezifische Bindung und Aufnahme des CT in Epithelzellen erfolgt über die nicht-toxische B-Untereinheit, welche definitionsgemäß Eigenschaften eines Lektins besitzt. Diese Glykoproteine binden an komplementäre Kohlenhydratstrukturen (C-Typ Lektin-Rezeptoren) auf der Oberfläche ihrer Zielzellen (Darmepithelzellen) [278, 279]. Die Aufnahme des Cholera Toxin in die Zelle geschieht durch rezeptorvermittelte Endozytose (englisch *receptor mediated endocytosis*, RME) [280]. Das Eindringen der toxischen A-Untereinheit in die Zelle führt zur Metabolisierung und Entfaltung der toxischen Eigenschaften [248]. Diese bewirkt nach Aufnahme in Darmepithelzellen über Signaltransduktion die Adenylat-Cyclase-abhängige Öffnung von Ionenkanälen, die zu einer verstärkten Sekretion von Wasser und Elektrolyten ins Darmlumen führt [249]. Folglich führt das Cholera Toxin beim Menschen zu schweren Durchfallerkrankungen und Erbrechen [250]. Aufgrund des großen Flüssigkeits- und Elektrolytverlustes kommt es schnell zu einer Exsikkose. Eine Übertragung des Erregers erfolgt hauptsächlich oral über fäkalienverunreinigtes Trinkwasser und stellt eine große Infektionsgefahr dar. Betroffen sind besonders Länder ohne hygienisch getrennte Wasser- und Abwassersysteme, wie z.B. in Afrika und Südamerika. Der Cholera-Impfstoff, ein Gemisch aus abgetöteten Bakterien der *Vibrio cholerae* und der B-Untereinheit, bietet einen lokalen Schutz für ca. 6–9 Monate in der Darmschleimhaut. Induzierte Gedächtniszellen sowie ein stabiler Serumtiter können jedoch über mehrere Jahre bestehen und den Organismus schützen [251].

Dem Cholera Toxin wird eine außergewöhnlich starke Wirkung als oral-mukosales Immunogen bei Mensch und Maus und Adjuvans für viele ko-applizierte Antigene in tierexperimentellen Modellen von Autoimmunerkrankungen und Allergien zugesprochen [252-254]. Dabei beruht die immunstimulatorische Wirkung des Holotoxins vorwiegend auf den immunmodulatorischen Eigenschaften der A-Untereinheit, während die Carrierfunktion der B-Untereinheit, die auf einer erhöhten Aufnahme konjugierter Impfstoffe durch die Affinität des CTB-Fusionspartners zum Mukosaepithel basiert, die Aufnahme konjugierter

CTB-Vakzinantigene über die Darmschleimhaut erleichtert [255, 256]. Das CTB-Insulin Konjugat mit CTB als Adjuvans führte beispielsweise dazu, dass der Effekt der Toleranzinduktion im Vergleich zur alleinigen oralen Gabe von Insulin verzehnfacht wurde [257]. Obwohl die genauen Mechanismen der Adjuvans-Wirkung bisher nicht vollends bekannt sind, werden verschiedene Ansätze, wie z.B. die Erhöhung der Permeabilität des Darmepithels mit höherer Antigen-Aufnahme, Verbesserung der Antigen-Präsentation, Stimulation des Klassenwechsels zu IgA in B-Zellen sowie der Einfluss auf T-Zellen und die Sekretion von Chemokinen diskutiert [259]. Aufgrund dieser besonderen Eigenschaften und besonders wegen der Resistenz bzw. Stabilität gegen proteolytische Enzyme des Verdauungstrakts hat sich der Einsatz des Cholera Toxin als Modellprotein für die Erforschung der dynamischen Prozesse des mukosalen Immunsystems etabliert. CTB stellt jedoch nicht nur einen effektiven mukosalen Carrier und potentiellen Immunmodulator dar sondern auch ein potentes Immunogen, das zudem protektives Potential im Rahmen einer oralen Immunisierung vermittelt. In diesem Zusammenhang konnten Rask et al. zeigen, dass die einmalige orale Applikation des CTB-konjugierten Allergens Ovalbumin (OVA), vor der systemischen Sensibilisierung und Atemwegsprovokation mit OVA, zur Unterdrückung der IgE-vermittelten allergischen Sensibilisierung im murinen Tiermodell führt [260]. Dieser Effekt konnte nur durch die toleranzinduzierende Eigenschaft des CTB erklärt werden. Die diesen möglichen protektiven Eigenschaften zugrundeliegenden Vorgänge sind sehr komplex und bisher kaum erforscht. Dennoch stellen die genannten immunmodulatorischen Eigenschaften des Cholera Toxin interessante Ansätze für weiterführende Analysen des mikrobiellen Produkts dar und könnten von erheblicher Bedeutung für die zukünftige Entwicklung von Impfstrategien oder Vakzinen zur therapeutischen Behandlung von allergischen Erkrankungen sein.

1.5 Hypothesen und Aufgabenstellung der Arbeit

Epidemiologische Studien konnten im Rahmen der Hygiene-Hypothese zeigen, dass die steigende Asthmaprävalenz mit der abnehmenden Häufigkeit mikrobieller Infektionen pränatal und in der frühen Kindheit assoziiert ist und das Aufwachsen auf „traditionellen“ Bauernhöfen mit einer Asthmaprotektion einhergeht [190, 192]. Für den gram-negativen Modellkeim *Acinetobacter lwoffii* F78 konnten bereits innerhalb des SFB/TR22, in Nachahmung einer natürlichen Bauernhofsituation, asthmaprotektive Eigenschaften nach intranasaler Applikation auf die akute Atemwegsentzündung im Tiermodell des experimentellen Asthmas gezeigt werden [197]. Um die pränatalen Einflüsse der mikrobiellen Exposition genauer zu untersuchen, wurde auch innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe anhand eines Mausmodells der allergischen Atemwegsentzündung nachgewiesen, dass die maternale Exposition mit *A. lwoffii* F78 zu einer deutlichen Reduktion des asthmatischen Phänotyps in den Nachkommen führt [198]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die *A. lwoffii* Exposition der Muttertiere eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems zur Folge hat, die mit einer Erhöhung der Zytokine IL-6 und TNF α einhergeht und essentiell für den Asthma-Schutz der Nachkommen ist [198]. Die Ergebnisse dieser Versuche werfen die Frage nach den molekularen Mechanismen hinter der Allergieprotektion nach mikrobieller Exposition auf. Die unterschiedlichen Zytokinprofile determinieren distinktive Effektorfunktionen und könnten möglicherweise eine relevante Interaktion zwischen angeborener und erworbener Immunabwehr in der Pathogenese des Asthma bronchiale darstellen. Diese Interaktionen sind besonders für T-Zellen mit ihren Effektorzytokinen von Bedeutung, da diese eine entscheidende Rolle bei der Etablierung und Orchestrierung der allergischen Immunantwort spielen und bei der Polarisierung zu einem asthmatischen Phänotyp hin oder von einem solchen weg bedeuten können. Daher ist das Verständnis der Interaktion innerhalb dieses komplexen Zytokinnetzwerkes von entscheidender Bedeutung für die Immunpathogenese des Asthma bronchiale.

Um die Mechanismen, die *in vivo* dieser *A. lwoffii* F78 Protektion auf die Allergieentstehung und -entwicklung zugrunde liegen, näher zu analysieren, wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt der Bakterien auf murine innate Zellen und deren Zytokinexpressionsmuster *in vitro* untersucht, die eine wichtige Verbindung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem darstellen und eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung und Polarisierung der Immunantworten einnehmen. Darüber hinaus wurden auch vergleichende Analysen mit weiteren mikrobiellen Stimuli, wie z.B. das Cholera Toxin, welches nicht aus dem Bauernhof-Milieu stammt, durchgeführt, um so mögliche allergoprotektive Eigenschaften bzw.

Unterschiede zu identifizieren und einen tieferen Einblick in die Mechanismen und Wirkungsweisen der Allergieprotektion durch mikrobielle Stimuli zu erhalten.

Daher wurden für die vorliegende Arbeit unter Einbezug aktueller Erkenntnisse aus der Pathophysiologie des Asthma bronchiale folgende **Hypothesen** abgeleitet:

(1) Die Lebend- und Totkeim-Exposition von *A. lwoffii* führt zu einer Reduktion der akuten allergischen Atemwegsentzündung im Mausmodell des experimentellen Asthmas.

(2) Die Exposition von *A. lwoffii* und Cholera Toxin (CT: Wildtyp-Protein, CTB: nicht-toxische B-Untereinheit) führen zur Induktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF α in murinen Makrophagen. Diese Zytokine nehmen Einfluss auf die Expression des IL-17A Zytokingens in naiven CD4⁺ T-Zellen über epigenetische Modifikationen.

(3) Die Exposition von Cholera Toxin (CT und CTB) führt zu einer Reduktion der akuten allergischen Atemwegsentzündung im Mausmodell des experimentellen Asthmas.

Zur experimentellen Validierung der Hypothesen sollten konkret die folgenden Aufgabenstellungen bearbeitet werden:

(1) Analyse der Lebend- und Totkeim-Exposition von *A. lwoffii* in einem „Proof of concept“-Versuch auf Sensibilisierung und Ausprägung des allergischen Phänotyps des experimentellen Asthmas im Mausmodell.

(2) Etablierung eines *in vitro* T-Zellsystems zur Analyse der zellulären und molekularen Mechanismen, die *in vivo* eine Rolle bei der Vermittlung der Asthmaprotektion spielen.

- Stimulation von innatem Immunzellen (murine Makrophagen: Kulturzellen bzw. primäre Peritonealmakrophagen) durch mikrobielle Exposition von *A. lwoffii* bzw. Cholera Toxin (CT und CTB) *in vitro* und Analyse des induzierten proinflammatorischen Zytokinprofils.

- Stimulation von adaptiven Immunzellen (naive CD4⁺ T-Zellen) durch mikrobiell behandelte Kulturüberstände (*A. lwoffii* bzw. Cholera Toxin) der murinen Makrophagen in einem *in vitro* Zellkultursystem und Analyse des CD4⁺ T-Zell-Zytokin- und mRNA-Profiles.
- Inhibition der Zytokinexpression von CD4⁺/62L⁺ T-Zellen mittels spezifischer neutralisierender Antikörper *in vitro*.
- Induktion der Zytokinexpression von CD4⁺/62L⁺ T-Zellen mittels rekombinanter Proteine *in vitro*.
- Analyse der epigenetischen Modifikation der DNA-Methylierung in CD4⁺ T-Zellen innerhalb des IL-17A Promotors, um einen möglichen Mechanismus für die *in vitro* Regulation der Zytokinproduktion zu identifizieren.

(3) Etablierung eines *in vivo* Akutmodells der murinen allergischen Atemwegsentzündung zur Analyse der protektiven, immunmodulatorischen Effekte von Cholera Toxin (CT und CTB) auf Sensibilisierung und Ausprägung des allergischen Phänotyps.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Wildtyp-BALB/c Mäuse

Harlan Winkelmann

2.2 Zellen

2.2.1 Eukaryotische Zellen

J774A.1 (murine Makrophagen-Zelllinie)

DSMZ, Braunschweig

2.2.2 Prokaryotische Zellen

Acinetobacter lwoffii F78

Forschungszentrum Borstel

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Aceton

Acros Organics

Agarose

Merck

ATL-Puffer

Qiagen

BM Blue POD Substrate

Roche

BSA Albumin Fraktion V

Serva

β -Methyl-Acetylcholin (Methacholin, MCh)

Sigma

CASY@Ton

Schärfe Systems

Citratpuffer

Sigma

Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablette

Roche

3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)

Vector

Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline

PAA Laboratories

Eisessig

Merck

EDTA (25mM)

Invitrogen

EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Na₂EDTA)

Roth

Eosin G

Merck

Ethanol	Roth
Ethidiumbromid 1 % (10 mg/ml)	Roth
Färbelösungen (Diff-Quick®)	Dade-Behring
Formaldehydlösung (6 %)	Merck
Fötale Kälberserum (FCS Gold)	PAA Laboratories
Gel-Loading-Solution Typ I	Sigma
Hämatoxin nach Gill	Merck
HEPES	Sigma
Histomount	National Diagnostics, USA
Ketanest (76 mg/kg)	Pfizer
Karbol-Gentianaviolett	Roth
L-Glutamin	PAA Laboratories
Lugol	Roth
Lipopolysaccharid (LPS, <i>E.coli</i>)	Sigma
Mercaptoethanol	Roth
Methanol	Sigma-Aldrich
Natrium-Chlorid (NaCl)	Roth
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merk
Natrium-Pyruvat	PAA Laboratories
Nicht-essentielle Aminosäuren	PAA Laboratories
Normalserum (goat)	Dianova
Nuclear Fast Red	Dako Cytomation
Ovalbumin GradeV	Sigma
Ovalbumin GradeVI	Sigma
Pancoll mouse	Pan-Biotech

Paraformaldehyd	Merck
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories
Perjodsäure	Roth
Pikrinsäure	Fluka
Phospho-Stop Tablette	Roche
ProteinA-Agarose	Roche
Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche
Proteinase K	Sigma
QuantiTect™ Sybr® Green PCR Master Mix	Qiagen
Reagent Diluent	R&D Systems
RNA-Probenpuffer	Sigma
Rompun (9,6 µg/kg)	Bayer
Roti Agarose	Roth
Roti Clear (Xylol)	Roth
Roti Mount	Roth
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	PAA Laboratories
RLT-Puffer	Qiagen
Safranin	Roth
Salzsäure (HCl)	Merck
Schiffs Reagenz	Roth
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck
Sirius Red	Polysciences
Sodiumdodezylsulfat (SDS)	Roth
Streptavidin-Peroxidase-Komplex	Sigma
Streptavidin-Sepharose HP Beads	Healthcare
Thioglykolat Medium (Brewer´s)	BD

Tris-HCL	Roth
Tween 20	Roth
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck

2.4 Kits

CD4 ⁺ /62L ⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec
EpiTect [®] Plus DNA Bisulfite Kit	Qiagen
HotStarTaq Master Mix Kit	Qiagen
Mouse IFN γ Elisa Set	BD
Mouse IL-4 Elisa Set	BD
Mouse IL-5 Elisa Set	BD
Mouse IL-13 Cytoset	Invitrogen
Mouse IL-6 Elisa Set	BD
Mouse TNF α Cytoset	Invitrogen
Mouse IL-17A Elisa Kit	R&D Systems
Mouse IL-1 β Elisa Kit	R&D Systems
Omniscript Reverse Transcription Kit	Qiagen
PCR Purification Kit	Roche
PyroGold SQA Reagent Kit	Biotage
RNeasy Mini-Kit	Qiagen

2.5 Nukleinsäuren

Die Oligonukleotide für den Einsatz in der PCR wurden von der Firma Metabion bezogen.

2.5.1 qPCR-Primer

Gen	Primersequenz	Tm	Produkt
IL-13	for: 5'- GGAGCTGAGCAACATCACAC - 3'	52 °C	172 bp
	rev: 5'- GTGGGCTACTTCGATTTTGG - 3'		
IL-17A	for: 5'- GTCCAAACACTGAGGCCAAG - 3'	56 °C	184 bp
	rev: 5'- TGAGCTTCCCAGATCACAGA - 3'		
IL-10	for: 5'- CAGCCGGGAAGACAATAACT - 3'	60 °C	192 bp
	rev: 5'- TCATTTCCGATAAGGCTTGG - 3'		

2.5.2 Bisulfit-PCR-Primer

Gen	Primersequenz	Tm	Produkt
IL-17A	for : 5'-GAATTTTAAAATAGTAAATATTAATAGGTTTT-3'	58 °C	290 bp
	rev: 5'-Biotin-AATAAACTCTCCCTAAACTCATATTTA-3'		

2.5.3 Pyrosequenzier-Primer

Gen	Primersequenz
IL-17A	5'-GAGTATTATTTTTTATTTATTTTA-3'

2.5.4 Nukleinsäure Standards

GeneRuler DNA Ladder Mix (50-1000 bp)	Peqlab
GeneRuler DNA Ladder Mix (200-10000 bp)	Peqlab

2.6 Proteine

2.6.1 Rekombinante Proteine

Cholera Toxin (Wildtyp, B-Untereinheit)	Forschungszentrum Boston (W. Lencer)
Ovalbumin GradeV	Sigma
Ovalbumin GradeVI	Sigma
rhIL-6	Peprotech
rhTGF β 1	R&D Systems
rhTNF α	R&D Systems
rhIL-2	Miltenyi Biotec

2.6.2 Primärantikörper

APC Rat anti-mouse CD4	eBioscience
PE Rat anti-mouse CD62L	eBioscience
FITC Rat anti-mouse CD45	BD
Fc-Block (anti-mouse CD16/CD32)	BD
APC rat anti-mouse IgG _{2a} , κ , isotype control	eBioscience
PE rat anti-mouse IgG _{2a} , κ , isotype control	eBioscience
FITC rat anti-mouse IgG _{2b} , κ , isotype control	BD
Hamster anti-mouse-CD3/CD28	BD
anti-mouse IL-6 (Klon MP5-20F3)	eBioscience
anti-mouse TGF- β 1	R&D Systems

2.6.3 Sekundärantikörper

Anti-Maus IgE (biotinyliert)	BD
Anti-Maus IgG ₁ (biotinyliert)	BD
Anti-OVA IgE	BD

Anti-OVA I IgG ₁	BD
Anti-Kaninchen IgG (Peroxidase-gekoppelt)	Sigma
Anti-Ziege-IgG (Peroxidase-gekoppelt)	Sigma

2.6.4 Enzyme

DNaseI	Invitrogen
QuantiTect™ SYBR® Green PCR Master Mix	Qiagen
RedTaq Ready-Mix Kit	Sigma
SuperscriptII™ Reverse Transkription	Invitrogen

2.7 Lösungen, Nährmedien und Puffer

2.7.1 Lösungen

Ovalbumin-Lösungen:

Lösung zur Immunisierung (pro Tier):	10 µg OVA GradeVI in 200µl PBS
Aerosol-Lösung:	1 % OVA GradeV in PBS

Narkoselösung (5x):

10 ml Ketamin (50 mg/ml)/3,125 ml Rompun

2.7.2 Nährmedien für Säugerzellen

Primäre Peritonealmakrophagen, J774 (murine Makrophagen-Kulturzellen)	RPMI 1640/10 % FCS/1 % Penicillin- Streptomycin (PenStrep)/Na-Pyruvat/ 1 % L-Glutamin
CD4 ⁺ /62L ⁺ T-Zellen	RPMI 1640/10 % FCS/1 % Penicillin- Streptomycin (PenStrep)/1 % nicht-essentielle Aminosäuren/1 % Na-Pyruvat/1 % L-Glutamin/ 50 µM β-Mercaptoethanol

2.7.3 Nährmedien für Bakterien

LB-Medium	1 % NaCl/0,5 % Hefeextrakt/1 % Pepton in dH ₂ O
LB-Agar	1,5 % Bakterio-Agar in LB-Medium

2.7.4 Puffer

Puffer für ELISA

Phosphatpuffer/Beschichtungspuffer	0,1M NaHCO ₃ ; pH 8,3
Waschpuffer	1M PBS/0,05 % Tween [®] 20 (v/v)
Blockierungspuffer	PBS/1 % BSA

Puffer für DNA-Agarose Gele

DNA-Probenpuffer (6x)	10 % Glycerol/40 % Saccharose/0,25 % Bromphenolblau
TBE (10x)	108 g Tris-Base/55 g Borsäure/40 ml 0,5M EDTA (pH 8,0) ad 1 l dH ₂ O

Puffer für MACS und FACS

MACS-Puffer	PBS/0,5 % FCS/2 ml 0,5M EDTA
FACS-Puffer	PBS /1 % BSA

2.8 Verbrauchsmaterialien

18G Venenverweilkatheter	B. Braun Melsungen AG
Collection Tubes (2 ml)	Qiagen
Collection Tubes (1,5 ml)	Qiagen
Deckgläschen (24x36 mm)	Menzel
Falconröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One
FACS-Röhrchen	BD
Gewebeschalen 6 cm	Greiner Bio-One

Insulinspritze (1 ml)	Braun
Kanüle	BD
Kanüle 20G	Harvardapparat
Kryotubes (1,7 ml)	Sarstaedt
Klemmen	Martin
LS-Columns	Miltenyi Biotec
Magnetrührer	Kobe
MaxiSorp™ Surface, 96 well Platten	Nunc
MS-Columns	Miltenyi Biotec
Multiwellplatten 6-, 12-, 24-, 48-, 96-well	Greiner Bio-One
Objektträger (76x26 mm Mattrand)	Menzel
Pipette	Eppendorf
PSQ 96 Platte	Biotage
Rasierklinge	Wilkinson
Reaktionsgefäße (0,1 ml)	LTF
Reaktionsgefäße (0,5 ml)	KH Zehlendorf
Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (2 ml)	Eppendorf
Scheren	Hamacher
Strip-Tubes (0,1 ml)	Sydney, AUS
Skalpell	Feather
Super-Frost Objektträger	Menzel
Zellkulturflaschen T25, T75	Nunc
Zellsieb (Porengröße 100 µm)	BD
Zytoklip	Shandon

2.9 Geräte

Acrylkammer (20x20x15 cm)	KH Zehlendorf
Accu-Cut [®] SRM [™] 200 Rotary microtome	Sakura
Absorptionsphotometer Magellan	Tecan
Biofuge fresco	Heraeus
Biometra TRIO-Thermoblock	Biometra
Durchflusszytometer BD Accuri [™] C6	BD
Casy [®] -Cell-Counter	Schärfe Systems
Differenzdruckwandler (8 T-2)	Galtec Dunvegan, GB
Elektrophorese System	Peqlab
FACSort	BD
Geldokumentation	Bio-RAD
Gentl MACS [®]	Miltenyi Biotec
Heizblock	Biozym
Inkubator	Heraeus
Kompressor (Pari-Master [®])	Pari-Werke
Lichtmikroskop (BX51)	Olympus
Mikrowelle	Privileg
Mikrotom (Accu-Cut [®] SRM [™] 200 Rotary Microtom)	Sakura
Membran-Vakuumpumpe Vacuubrand	Wertheim
Mikrotiterplattenreader	Tecan
NanoDrop 2000c	Thermo Scientific
Nebulisateur (Pari-Boy [®])	Pari-Werke
Nunc-Immuno Wash 12	Nunc
Potter	Kobe
Pneumotachograph PTM 378/1.2	Hugo Sachs Electronic

Potentiometer CFBA	Hugo Sachs Elektronik
PyroMark ID Pyrosequenzierer	Biotage
Rotor Gene™3000	Corbett, Sydney, AUS
Schüttler Variomag Teleshake	H+P Labortechnik
TRIO-Thermoblock	Biometra
Vacuum Preparation Tool	Qiagen
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Hereaus
Zytozentrifuge (Cytospin 3)	Shandon

2.10 Software

Cell ^F -Imaging Software	Olympus
GraphPadPrism4	GraphPrism
NOTOCORD hem 3.5 Software	Notocord
Photometer Software Magellan2	Tecan
Q-CpG Software	Biotage
RotorGene6 Software	LTF
Software Cell Quest Pro	BD

2.11 Versuchstiere und Behandlungsprotokolle

Für die *in vivo* Versuche wurden weibliche Wildtyp-BALB/c Mäuse (Harlan Winkelmann, Borcheln) im Alter von 6-8 Wochen eingesetzt. Die Tiere wurden unter keimarmen Bedingungen in belüfteten Käfigsystemen bei konstanter Luftfeuchtigkeit und Raumtemperatur (20 °C) gehalten, wobei ein künstlicher 12 h Hell-Dunkel-Zyklus erzeugt wurde. Den Tieren wurde ovalbuminfreies Wasser und Futter ad libitum zur Verfügung gestellt.

2.11.1 *In vivo* Modell zur Induktion der akuten allergischen Atemwegsentzündung

Zur Induktion einer akuten allergischen Atemwegsentzündung in der Lunge wurden die Mäuse durch subkutane (s.c.) Injektionen des Allergens OVA (10 µg OVA GradeVI gelöst in 200 µl PBS) im Abstand von 14 Tagen dreimalig immunisiert. Den Mäusen der jeweiligen Negativ-Kontrollgruppen wurde PBS (200 µl) appliziert. Die systemische Applikation des Ovalbumins führt in den Mäusen zur Bildung eines immunologischen T_H2-Phänotyps. Der Sensibilisierungserfolg wurde anhand der OVA-spezifischen Antikörper der Subklassen IgE und IgG₁ im Serum nachgewiesen. An den Versuchstagen 26-28 wurden die Tiere täglich jeweils für 20 Minuten durch Inhalation eines OVA-Aerosols (GradeV, 1 %) provoziert, wodurch eine lokale Entzündungsreaktion in der Lunge initiiert wurde (s. Abb. 8).

2.11.2 Immunmodulation der allergischen Atemwegsentzündung durch den Einfluss von *Acinetobacter lwoffii*

Zur Untersuchung der Lebend- und Totkeimapplikation des *Acinetobacter lwoffii* F78 auf die Entwicklung des asthmatischen Phänotyps wurden narkotisierte weibliche BALB/c Mäuse intranasal mit dem lebenden oder Ethanol-abgetöteten Keim 5 Wochen lang behandelt (Abb. 8). Die Konzentration der Bakteriensuspension entsprach 1×10^8 CFU/50 µl PBS pro Behandlung. Anschließend wurden die Tiere mit OVA oder PBS subkutan (s.c.) sensibilisiert und an drei weiteren Tagen mit dem OVA-Aerosol provoziert (s. 2.11.1). Nach Durchführung des Protokolls der allergischen Atemwegsentzündung erfolgte an Tag 29 die Lungenfunktionsanalyse und an Tag 30 die endgültige Analyse (Abb. 8).

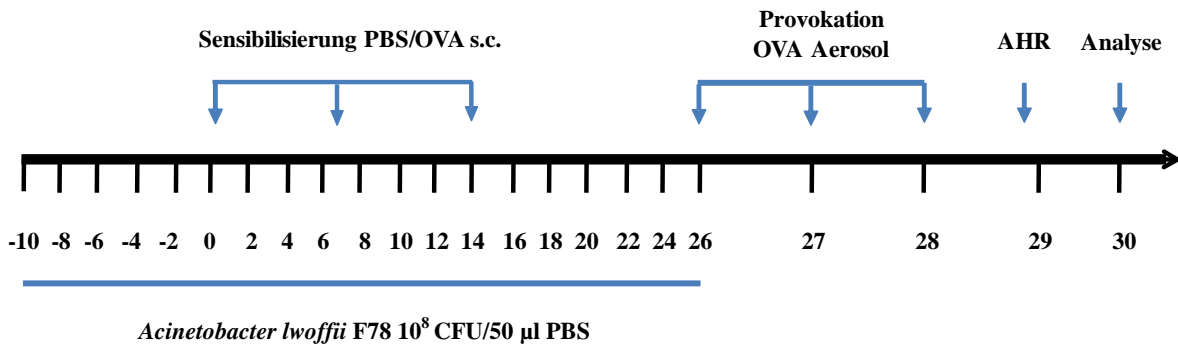


Abb. 8 Protokoll zur akuten Immunmodulation durch *Acinetobacter lwoffii* F78

2.11.3 Immunmodulation der allergischen Atemwegsentzündung durch den Einfluss von Cholera Toxin

Um den Einfluss von Cholera Toxin auf die Entwicklung des asthmatischen Phänotyps zu untersuchen wurde im Rahmen der Arbeit ein weiteres *in vivo* Modell zur Charakterisierung der Cholera Toxin Exposition etabliert. Aufbauend auf dem bereits innerhalb der Arbeitsgruppe entwickelten Modell der akuten Atemwegsentzündung, wurden in diesem Experiment narkotisierte weibliche BALB/c Mäuse intranasal mit dem Wildtyp Cholera Toxin-Protein (CT, 2 μ g/50 μ l PBS) und mit der Cholera Toxin B-Untereinheit (CTB, 2 μ g/50 μ l PBS) insgesamt fünfmal behandelt. Als Kontrolle erfolgte die Behandlung mit PBS. Die Sensibilisierung folgte an den Tagen 0, 7 und 14. Nach einer Ruhephase wurden die Tiere an weiteren drei Tagen jeweils für 20 Minuten einem OVA-Aerosol ausgesetzt. Die Lungenfunktionsanalyse fand an Tag 29, die endgültige Analyse an Tag 30 des Protokolls statt (Abb. 9).

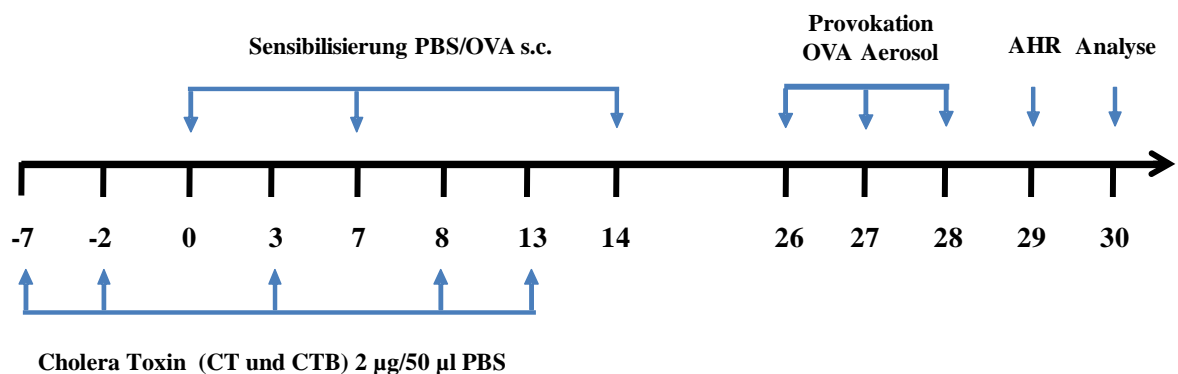


Abb. 9 Protokoll zur akuten Immunmodulation durch Cholera Toxin

2.12 Messung der Lungenfunktion mittels Head-Out Body-Plethysmographie

Die Head-Out Body-Plethysmographie ist ein nicht-invasives Verfahren zur Lungenfunktionsmessung, insbesondere für die Entwicklung der Atemwegshyperreaktivität, an der nicht-anästhesierten und spontan atmenden Maus. Während des Messverfahrens erfolgt die Erfassung der Atemflusskurve und weiterer physiologischer Lungenparameter: die Atemfrequenz (f), das Atemzugvolumen (V_T), die Inspirationszeit (T_I) und die Expirationszeit (T_E). Der „Midexpiratory Flow“ (auch EF50-Wert oder V_D) ist der Atemfluss, der bei halbmaximalem expiratorischen Atemzugvolumen gemessen wird und ein Maß für die Obstruktion der Atemwege zur quantitativen Ermittlung der Atemwegshyperreagibilität. Während der Messung werden die Tiere Methacholin (MCh)-Aerosolen steigender Konzentration ausgesetzt. Methacholin ist ein unspezifischer Bronchiokonstriktor, der zu einer Verminderung des Atemflusses führt. Als Maß für die bronchiale Reagibilität wird die MCh-Konzentration bestimmt, bei der der mittlere expiratorische Atemfluss noch 50 % des Ausgangswertes beträgt (MCh50). Die Messapparatur besteht aus einer großen Expositionskammer mit jeweils zwei Plethysmographen seitlich. Die Mäuse wurden in die Plethysmographen gesetzt und die hintere Öffnung mit einem Gummipfropf luftdicht verschlossen, während die Köpfe in die Mitte der Expositionskammer hinausragten, ohne die Atmung der Mäuse zu behindern. Über einen Vernebler, der an die Expositionskammer angeschlossen ist, wurde das MCh-Aerosol eingeleitet. Während der Atmung der Maus entstehen Thoraxbewegungen, die zu einer Volumenänderung im Plethysmographen führen und von einem Pneumotachographen gemessen werden. Die Messsignale werden an einen PC weitergeleitet und die Auswertung erfolgt mit der Software Notocord hem 3.5. Die Messung beginnt mit der Erfassung des mittleren expiratorischen Atemflusses. Bei einer 15-minütigen Messung von 250 bis 300 Atemzügen pro Minute wurden in einer Viertelstunde ungefähr 4000 Atemzüge erfasst. Die Werte aus Messintervallen von je 14 Sekunden und die Messdaten aller 60 Messintervalle wurden aufgezeichnet. Der Mittelwert dieser Werte bildet die Baseline und wurde als Ausgangswert für die folgenden Messungen gleich 100 % gesetzt. Weitere Parameter der nun folgenden Messung wurden als Prozentwerte relativ zur Baselinemessung ausgedrückt. Zur Ermittlung der Atemwegshyperreaktivität wurden die Tiere nun einem Aerosol des Bronchokonstriktors Metacholin beginnend mit PBS als Kontrolle ausgesetzt. Dabei erfolgt alle fünf Minuten ein 70-sekündiger Einstrom des MCh-Aerosols in die Expositionskammer mit folgenden Konzentrationen: 0 mg/ml, 12,5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml und 100 mg/ml. Dabei wurde der mittlere expiratorische Fluss gemessen und diejenige

Konzentration an Metacholin im Aerosol, bei der der Median der EF50-Werte unter 50 % der Baseline der jeweiligen Maus gefallen war, berechnet.

2.13 Präparation und Probengewinnung

2.13.1 Blutabnahme und Serumgewinnung

Für Zytokin-Analysen im Serum wurde den Mäusen 200 µl Blut interfascial entnommen. Für die Konzentrationsbestimmung von Immunglobulinen wurde 0,5 ml Blut aus der Axillarvene entnommen und in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Zur Serumgewinnung wurde das Blut für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 4000 rpm und 4 °C für 20 Minuten. Der Serumüberstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

2.13.2 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Die bronchoalveoläre Lavage ermöglicht die Gewinnung von Untersuchungsmaterial aus den Atemwegen. In die freipräparierte Trachea der Tiere wurde ein 18G Venenverweilkatheter eingeführt und anschließend die Lunge mit 1 ml eiskaltem PBS (mit 1 % „Bovines Serum Albumin“ (BSA) und einem Proteaseinhibitor) einmal gespült. Das gewonnene Probenmaterial wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C zentrifugiert (300xg, 10 min). Der zellfreie Überstand wurde abgenommen und für Zytokin-Analysen bei -20 °C gelagert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS/1 % BSA resuspendiert und die Leukozytenzahl mit einem Casy®-Cell-Counter bestimmt (s. 2.13.2.1).

2.13.2.1 Zellzählung und Differenzierung von Leukozytensubpopulationen der BAL

Zur Bestimmung der Leukozytenzahl in der BAL wurde die jeweilige Probe 1:100 mit dem Elektrolytpuffer CASY®Ton verdünnt und die Zellzählung am Cell-Counter (CASY®) durchgeführt. Zur Differenzierung der Leukozytensubpopulationen in der BAL wurden 50 µl der BAL Probe mit 150 µl PBS/1 % BSA verdünnt und in eine Probenkammer eines Objektträgers gegeben. Mittels Zytozentrifugation (5 Minuten bei 320xg) wurden die Zellen auf einem Objektträger zentrifugiert. Anschließend wurden die sogenannten Cytospin-Präparate 30 Minuten luftgetrocknet und zur Differenzierung der Zellpopulationen mit einer

Diff-Quick®-Lösung angefärbt. Zur Differenzierung der Zellen wurden die Zytospins nach morphologischen Kriterien lichtmikroskopisch, bei 400-facher Vergrößerung, analysiert.

2.13.3 Organpräparation, Einbettung und Herstellung der Lungenschnitte

Zur morphologischen Analyse der Lunge wurden histologische Untersuchungen vorgenommen. Dazu wurde der rechte Lungenflügel mit einer 6 %-igen Paraformaldehyd-Lösung perfundiert und fixiert. Anschließend wurden die Organe in 2 % Agarose und Paraffin eingebettet und mit einem Mikrotom 3 µm dünne Schnitte angefertigt. Zur Analyse der histologischen Lungenschnitte wurde eine Hämatoxylin-Eosin (HE)- und Perjodsäure-Schiff (PAS)-Färbung durchgeführt (s. 2.14.1).

2.13.4 Präparation der Milz und der bronchialen Lymphknoten

Zur Isolierung von primären Zellen aus der Milz und aus den Lymphknoten wurden die Tiere freipräpariert und die Organe in RPMI-Medium aufgenommen. Zur Weiterverarbeitung wurden die Organe mit Hilfe eines Spitzenstempels durch ein Zellsieb (Porengröße 100 µm) gedrückt und bis zur Weiterverarbeitung die Proben auf Eis gelagert.

2.13.4.1 Isolierung von mononukleären Zellen

Um die mononukleären Zellen (Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen) aus der Milzzellsuspension (s. 2.13.4) zu isolieren, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dazu wurde das Separationsmedium Pancoll vorsichtig mit der Zellsuspension überschichtet (Verhältnis 1:1) und die Proben für 20 min bei Raumtemperatur ungebremst zentrifugiert (1200xg). Nach der Zentrifugation befinden sich Zellen größerer Dichte (Erythrozyten, Granulozyten) pelletiert am Boden des Reaktionsgefäßes und mononukleäre Zellen scheiden sich an der Phasengrenze ab. Die Interphase wurde mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen und durch dreimaliges Waschen der Zellen mit 10 ml PBS (Zentrifugation 10 Minuten bei 350xg) vom Separationsmedium befreit. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml RPMI-Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Die Suspension aus mononukleären Zellen wurde bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Die aus den Lymphknoten hergestellte Zellsuspension wurde aufgrund der geringen Zellzahl

nicht über einen Gradienten aufgereinigt, da sonst ein zu hoher Verlust der Zellmenge entstanden wäre.

2.13.4.2 Kurzzeitstimulation der MNCs aus den Lymphknoten

Für die *in vitro* OVA-Restimulation der MNCs aus den Lymphknoten wurde die Zellzahl durch Zugabe von RPMI-Medium auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt und in eine 96-Well-Platte (200 μ l/Well) ausgesät. Anschließend wurden die Zellen mit anti-CD3 (0,5 μ g/ml)/anti-CD28 (2 μ g/ml) für 24 h bzw. mit OVA (50 μ g/ml) für 72 h bei 37° C stimuliert. Nachfolgend wurden die Platten abzentrifugiert und die Überstände bei -20 °C gelagert.

2.14 Histologie und Immunhistochemie

2.14.1 Hämatoxylin-Eosin- und Periodic-Acid Schiff-Färbung

Für immunhistochemische Untersuchungen wurden entparaffinierte Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (100 % Ethanol - 10 Minuten, 96 % Ethanol - 5 Minuten, 70 % Ethanol - 5 Minuten) rehydriert und mittels Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt, welche einen histologischen Gesamtüberblick ermöglichen. Dabei werden im ersten Schritt die Lungenpräparate mit einer Hämatoxylin II Lösung nach Gill gefärbt und anschließend für 5 Minuten in Wasser gespült. Im nächsten Schritt erfolgte eine Inkubation mit Eosin (2 %). Es folgte ein weiterer Waschschrift in Wasser und die Dehydrierung der Präparate. Dazu wurden die Schnitte erst in 100 % Ethanol und anschließend für 20 Minuten in Xylol inkubiert. Als Eindeck-Medium wurde Histomount verwendet. Um eine erhöhte Mukusproduktion und Mukusbestandteile in den Atemwegen nachweisen zu können, wurde eine Perjodsäure-Schiff (PAS)-Färbung durchgeführt. Hierbei überführt die Perjodsäure 1,2-Glykole in unsubstituierte Polysaccharide sowie Mukopolysaccharide zu Aldehydgruppen, die das Schiffsreagenz leuchtend rot anfärbt. Hierzu wurden entparaffinierte und rehydrierte Schnitte in Wasser gespült und für 10 Minuten in 0,5 %-iger Periodsäure inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift in Wasser wurden die Präparate für 15 Minuten in Schiffs-Reagenz inkubiert und anschließend in Wasser gespült. Die Gegenfärbung dieser Schnitte erfolgte mit Hämatoxylin. Die Beurteilung der Atemwegsentszündung am Lungenepithel erfolgte am Mikroskop nach allgemeinen morphologischen Kriterien.

2.14.2 Gram-Färbung

Für weitere immunhistochemische Untersuchungen wurden Zytospin-Präparate aus BAL-Proben (s. 2.13.2.1) nach Gram (1884) gefärbt, die die Keime durch einen verbesserten Kontrast darstellt. Dazu wurden die Objektträger an der Luft getrocknet und danach 3 x durch die Flamme einer Kerze gezogen. Im Anschluss wurden die abgekühlten Präparate eine Minute mit Karbol-Gentianaviolett beschichtet, mit Aqua dest. gespült und erneut eine Minute mit Lugol überschichtet. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit Aqua dest. und die Entfärbung mit Ethanol (96 %). Im nächsten Schritt erfolgte eine Gegenfärbung der Präparate mit Safranin, ein Waschschrift mit Aqua dest. und die Trocknung der Präparate an der Luft. Die morphologische Beurteilung der Makrophagen mit intrazellulären Bakterien erfolgte am Lichtmikroskop.

2.15 Zellkulturen

2.15.1 Isolierung primärer peritonealer Makrophagen

Zur Isolierung primärer peritonealer Makrophagen wurden weibliche Wildtyp-BALB/c Mäuse im Alter von 6-8 Wochen verwendet. Pro Makrophagen-Kultur wurde vier bis fünf Tieren je 1 ml Thioglykolat Medium (3 %) intraperitoneal verabreicht. Nach 72 Stunden wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und das Abdomen mit 70 % Ethanol desinfiziert. Anschließend wurde die Haut über dem Abdomen mit einem Einschnitt entlang der Mittellinie eröffnet und die Bauchwand freigelegt. Durch einen Einstich in die Bauchwand wurde 5 ml PBS (eiskalt) in die Peritonealhöhle injiziert und die Peritonealflüssigkeit anschließend wieder entnommen. Die aus der Peritoneallavage gewonnenen Zellen wurden pelletiert (300xg, 5 min, 4 °C), in RPMI-Kulturlösung aufgenommen und kultiviert (37 °C). Nach 4h Inkubation wurden nicht-adhärierte Zellen durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt und frisches Medium zu den Zellen gegeben. Die Zellsuspension wurde auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml Kulturlösung eingestellt. Die Kultur wurde über Nacht (37 °C und 5 % CO₂) inkubiert und am folgenden Tag mit der entsprechenden Dosis *A. lwoffii* behandelt (s. 2.15.2).

2.15.2 Kultivierung und Stimulation der J774-Kulturzellen bzw. der primären Peritonealmakrophagen-Kultur

Für *in vitro* Studien wurde die murine Makrophagen-Zelllinie J774A.1 (bezogen von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, D) verwendet. Die Zelllinie wurde aus Aszites von weiblichen BALB/c-Mäusen gewonnen, welche an einem Retikulum-Zell-Sarkom erkrankt waren [239]. Die Subkultivierung der Zellen wurde zweimal pro Woche durchgeführt, dabei wurden die Zellen 1:5 geteilt. Für die *in vitro* Stimulation der J774-Kulturzellen und der primären Peritonealmakrophagen-Kultur (s. 2.15.1) wurde die Zellzahl durch Zugabe von RPMI-Medium auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und in 12-Well-Platten ausgesät. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank (bei 37 °C und 5 % CO₂) wurde das Medium gewechselt und anschließend wie folgt für die entsprechenden Inkubationszeiten mit *A. lwoffii* und Cholera Toxin stimuliert:

Tab. 1 Stimulationsbedingungen für Kinetikversuche mit der J774-Kulturzelllinie

Kinetik J774-Kulturzellen	4 h	24 h	48 h	72 h
<i>A. lwoffii</i>	1×10^6 CFU/ml	1×10^2 CFU/ml 1×10^4 CFU/ml 1×10^5 CFU/ml 1×10^6 CFU/ml 1×10^8 CFU/ml	1×10^6 CFU/ml	1×10^6 CFU/ml
Cholera Toxin (Wildtyp)		0,02 µg/ml 0,2 µg/ml 2 µg/ml		
Cholera Toxin (B-Untereinheit)		0,02 µg/ml 0,2 µg/ml 2 µg/ml		
LPS	10 ng/ml	10 ng/ml	10 ng/ml	10 ng/ml

Tab. 2 Stimulationsbedingungen für Kinetikversuche mit der Peritonealmakrophagen-Kultur

Kinetik Peritonealmakrophagen- Kultur	24 h
<i>A. lwoffii</i>	1 x 10 ⁴ CFU/ml 1 x 10 ⁵ CFU/ml 1 x 10 ⁶ CFU/ml
LPS	10 ng/ml

Als Positivkontrolle für die TLR4-Aktivierung wurde 10 ng/ml LPS eingesetzt. Die Stimulation erfolgte entsprechend über 4 h, 24 h, 48 h, und 72 h im Brutschrank. Im Anschluss wurden die Platten abzentrifugiert, die Überstände steril filtriert und bis zur weiteren Analyse der Zytokinproduktion (s. 2.16.1) bei -20 °C gelagert. Für die *in vitro* Stimulation der CD4⁺/62L⁺ T-Zellen wurden Überstände der J774-Kulturzellen und der Peritonealmakrophagen-Kultur im großen Maßstab generiert. Dazu wurden folgende Konzentrationen der Stimulantien für die 24 h-Behandlung der Zellen eingesetzt:

J774-Kulturzelllinie: *A. lwoffii* 1 x 10⁶ CFU/ml
Cholera Toxin (Wildtyp und B-Untereinheit) 2 µg/ml

Peritonealmakrophagen-Kultur: *A. lwoffii* 1 x 10⁶ CFU/ml

2.15.3 Isolierung von naiven CD4⁺/62L⁺ T-Zellen aus der Milz

Für die Aufreinigung von naiven CD4⁺/62L⁺ T-Zellen wurde die aus MNCs hergestellte Zellsuspension aus der Milz (s. 2.13.4.1) eingesetzt. Dazu wurde das CD4⁺/62L⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit von Miltenyi Biotec mittels eines MACS (Magnetische Zell-Separation) Systems nach Herstelleranleitung verwendet. Das MACS-Verfahren erlaubt die Separation verschiedenster Zellpopulationen anhand magnetisch markierter Antikörper. Die auf diese Weise isolierten Zellen wurden nach der Aufreinigung durch Zentrifugation pelletiert (300xg, 10 min) und in MACS-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Zur Analyse der gesammelten Zellpopulation wurde die Effizienz der Aufreinigung mittels Durchflusszytometrie (s. 2.15.5) bestimmt.

2.15.4 *In vitro* Subkultivierung und Stimulationsbedingungen der naiven CD4⁺/62L⁺ T-Zellen aus der Milz

Wie unter 2.15.3 beschrieben, wurden die aufgereinigten naiven CD4⁺/62L⁺ T-Zellen bis zur *in vitro* Subkultivierung auf Eis gelagert. Im Anschluss wurde die Zellzahl auf 2 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt, in eine 96-Rundboden-Well-Platte (200 µl/Well) ausgesät und mit anti-CD3 (0,5 µg/ml)/anti-CD28 (2 µg/ml) stimuliert. Die Zellen wurden durch Zugabe von folgenden stimulierten Zellkultur-Überständen (s. 2.15.2) mit entsprechenden Konzentrationen inkubiert:

Tab. 3 Stimulationsbedingungen für die *in vitro* Subkultivierung der naiven CD4⁺/62L⁺ T-Zellen

Kulturüberstand	Konzentration
J774-Kulturzellen <i>A. lwoffii</i>	1:10 1:2
J774-Kulturzellen Cholera Toxin (Wildtyp)	1:10 1:2
J774-Kulturzellen Cholera Toxin (B-Untereinheit)	1:10 1:2
Peritonealmakrophagen-Kultur <i>A. lwoffii</i>	1:10 1:2

Die Effekte der stimulierten Zellkultur-Überstände wurden durch das Mitführen einer Kontrollgruppe überprüft und dienten als Negativkontrollen. Diese Zellen wurden ohne Kulturüberstand, d.h. nur mit RPMI-Medium, inkubiert. Ein weiterer Teil der CD4⁺/62L⁺ T-Zellen wurde parallel zu den stimulierten Zellkultur-Überständen durch Zugabe von rekombinanten Proteinen und neutralisierenden Antikörpern mit den entsprechenden Konzentrationen ko-inkubiert (Tab. 4). Zur Neutralisierung von IL-6 und TGFβ im Kulturüberstand der stimulierten J774- und Peritonealmakrophagen-Kultur wurden anti-IL-6 und anti-TGFβ Antikörper eingesetzt, die zuvor in Zellkulturexperimenten eine neutralisierende Wirkung gezeigt hatten. Dazu wurden die Zellkultur-Überstände für 1 h bei 4 °C mit anti-IL-6 und anti-TGFβ vorinkubiert und anschließend für die Kultivierung der CD4⁺/62L⁺ T-Zellen eingesetzt.

Tab. 4 Konzentrationen der eingesetzten Proteine und Antikörper für die *in vitro* Subkultivierung der naiven CD4⁺/62L⁺ T-Zellen

Proteine/Antikörper	Konzentration
rhIL-6	50 ng/ml
rhTGFβ	10 ng/ml
rhTNFα	100 ng/ml
rhIL-2	50 U/ml
αIL-6	5 µg/ml
αTGFβ	100 ng/ml

Die Subkultivierung der CD4⁺/62L⁺ T-Zellen erfolgte nach einem im Rahmen dieser Arbeit etablierten *in vitro* Zellkulturmodell (Abb. 10). Dazu wurden die unterschiedlich stimulierten CD4⁺/62L⁺ T-Zellen, wie bereits beschrieben, ausgesät und für insgesamt 5 Tage im Brutschrank (bei 37 °C und 5 % CO₂) kultiviert. An Tag 3 des Protokolls (Abb. 10) wurden die resuspendierten Zellen 1:2 geteilt und in eine 96-Well-Platte überführt. Die Zellsuspension wurde mit RPMI-Medium aufgefüllt (200 µl/Well) und durch Zugabe von rhIL-2 (50 U/ml) für weitere 48 h kultiviert. Am fünften Tag des Protokolls wurde der Überstand durch Zentrifugation abgenommen und die Zellen mit RPMI-Medium gewaschen. Anschließend wurde die Zellzahl durch Zugabe von RPMI-Medium auf 2 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt, in eine 96-Well-Platte (200 µl/Well) ausgesät und mit anti-CD3 (0,5 µg/ml) stimuliert. Ab hier wurden die CD4⁺/62L⁺ T-Zellen je nach Experiment für 6 h und 18 h kultiviert.

Für mRNA Expressionsanalysen wurden die Zellen nach 6 h geerntet, in RLT-Puffer mit 0,01 % β-Mercaptoethanol aufgenommen und zur späteren Bestimmung der mRNA-Konzentrationen bei -80 °C gelagert. Für Untersuchungen zur Proteinexpression und DNA-Methylierung wurden die Zellen 18 h kultiviert. Anschließend wurden die Platten abzentrifugiert und die Überstände bis zur weiteren Analyse der Zytokinproduktion bei -20 °C gelagert. Das Pellet wurde in ATL-Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

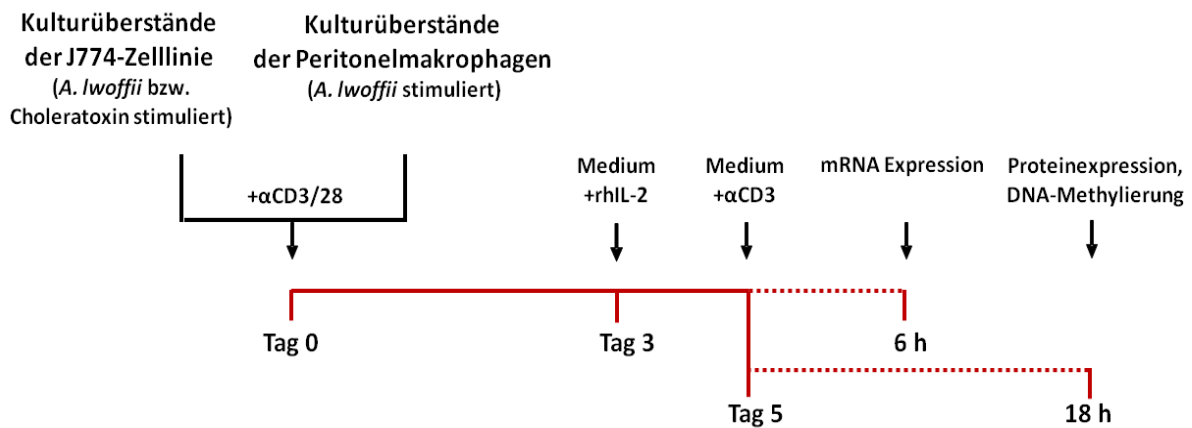


Abb. 10 *In vitro* Zellkulturmodell für die Subkultivierung und Stimulation der CD4⁺/62L⁺ T-Zellen

2.15.5 Analyse der Aufreinigungseffizienz von CD4⁺/62L⁺ T-Zellen mittels FACS

Die FACS (Fluorescence associated cell sorter)-Analyse ermöglicht eine qualitative Bestimmung der Zellsubpopulationen und beruht darauf, dass Zellen anhand ihrer Größe, Struktur und Oberflächeneigenschaften unterschieden werden können. Dabei erfolgt die Differenzierung der Zellen auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Die Detektion erfolgt, indem Licht definierter Wellenlängen auf Fluoreszenzfarbstoffe trifft und diese zur Emission charakteristischer elektromagnetischer Wellen anregt. Diese Fluoreszenzfarbstoffe sind an Antikörper gekoppelt, die an die jeweiligen Antigene bzw. Oberflächenmerkmale der Zellen oder intrazelluläre Proteine spezifisch binden können. Um die Effizienz der MACS Separation (s. 2.15.3) zu überprüfen, wurden für die hergestellte Zellsuspension aus Lymphozyten (s. 2.13.4.1) und für die aufgereinigte Zellpopulation der CD4⁺/62L⁺ T-Zellen folgende Fluorochrom gekoppelte Antikörper-Färbungen zum Nachweis der entsprechenden Oberflächenantigene verwendet:

Fluorescein-isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und Allophycocyanin (APC). Die entsprechenden Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt und zunächst mit 1 ml FACS-Puffer (PBS/1 % BSA) gewaschen (300xg, 5 min, 4 °C). Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 50 µl FACS-Puffer resuspendiert. Es wurde jeweils 0,5 µl Antikörper (αCD45-FITC, αCD4-APC, αCD62-PE) zugegeben. Um die unspezifische Bindung der eingesetzten Antikörper an die auf Makrophagen vorhandenen F_c-Rezeptoren zu unterbinden, wurde zusätzlich 1 µl eines F_c-Block-Antikörpers hinzugegeben. Die Proben wurden für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Als Kontrollen wurden die entsprechenden

Isoantikörper (APC rat anti-mouse IgG_{2a}, κ; PE rat anti-mouse IgG_{2a}, κ; FITC rat anti-mouse IgG_{2b}, κ) eingesetzt, da zusätzlich zu der Färbung der Oberflächenmarker auch eine sogenannte Isotypkontrolle zur Feststellung des fluoreszierenden Hintergrundes durchgeführt werden sollte. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml FACS-Puffer gewaschen und in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Analyse der Zellen wurde am FACSort durchgeführt, wobei jeweils 50.000 Zellen analysiert wurden.

2.16 Proteinbiochemie

2.16.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) Methode dient einem quantitativen Nachweisverfahren, um spezifische Antikörper-Konzentrationen aus einer Probe zu ermitteln. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Sandwich-ELISA durchgeführt, bei der zunächst eine Mikrotiterplatte mit einem Primärantikörper bzw. Antigen beschichtet wird (coating). Anschließend folgt die Blockierung von freien Proteinbindungsstellen, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Im nächsten Schritt folgt die Auftragung der Proben sowie die spezifische Bindung der enthaltenen Antikörper an das gebundene Antigen. Durch Inkubation mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (Detektionsantikörper) findet eine Bindung an noch freie Epitope des Antigens statt. Anschließend wird ein Streptavidin-Peroxidase-Komplex aufgetragen, der an den Detektionsantikörper bindet. Daraufhin erfolgt die Inkubation mit einem Peroxidase-Substrat (BM blue POD Substrate), die zu einer Farbreaktion führt und photometrisch erfasst wird.

2.16.1.1 Nachweis OVA-spezifischer Immunglobuline

Für den Nachweis von OVA-spezifischen Immunglobulinen IgE und IgG₁ im Serum wurden 96-Well-Platten mit einer OVA-Lösung (OVA Grade VI in PBS, 20 mg/ml) in 0,1 M NaHCO₃ (pH=8,3) 50 µl pro Well beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Platten viermal mit Waschpuffer (PBS mit 0,1 % Tween) gewaschen und unspezifische Bindungsstellen durch Zugabe von 100 µl/Well Blocklösung (PBS mit 1 % BSA) geblockt (2 h bei RT). Im nächsten Schritt werden nach viermaligem Waschen (Waschpuffer) die Serumproben entsprechend der zu messenden Ig-Subklassen verdünnt (für OVA_{spec} IgE 1:10, für OVA_{spec} IgG₁ 1:1000) und aufgetragen (50 µl/Well). Für die jeweiligen Ig-Standards wurde, ausgehend von den angegebenen Höchstkonzentrationen

(IgE: 200 ng/ml, IgG₁: 50 ng/ml), eine 10-stufige 1:2-Verdünnungsreihe in Waschpuffer hergestellt. Es folgte eine weitere Inkubation über Nacht bei 4 °C. Nach viermaligem Waschen (Waschpuffer) wurde der biotinylierte Detektionsantikörper (1:200 verdünnt in Waschpuffer, 50 µl/Well) zugegeben und für 2 Stunden auf einem Schüttler inkubiert. Nach vier weiteren Waschsritten wurde die Streptavidinperoxidase (1:1000 in Waschpuffer verdünnt) aufgetragen (50 µl/Well) und für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Daraufhin folgte ein achtmaliger Waschschrift und die Inkubation mit 100 µl/Well Peroxidase-Substratlösung (BM blue POD substrate) bei Raumtemperatur im Dunkeln (5-10 Minuten). Die eintretende Farbreaktion (Blaufärbung) wurde dann mit 50 µl/Well 2 M Schwefelsäure abgestoppt (Farbumschlag von Blau nach Gelb). Im Anschluss wurde die Extinktion photometrisch gemessen (Messfilter 450 nm, Referenzfilter 530 nm) und die Konzentrationen der Zytokine über die Standardkurve mit dem Photometerprogramm Magellan 2 berechnet.

2.16.1.2 Konzentrationsbestimmung von Zytokinen mittels ELISA

Mit den gewonnenen Überständen aus der *in vitro* Kultivierung der J774-Kulturzellen und der primären Peritonealmakrophagen-Kultur (s. 2.15.2), der Kurzzeitstimulation (Lymphknoten, s. 2.13.4.2), der BAL (s. 2.13.2) und den Serumüberständen aus *in vivo* Versuchen (s. 2.13.1) wurde ein Sandwich-ELISA nach dem oben beschriebenen Prinzip durchgeführt. Zur Bestimmung der Konzentrationen der entsprechenden Zytokine wurden hochspezifische ELISA-Kits verwendet. Der Erkennungsbereich der Kits entsprach den Befunden des Herstellers. Die Durchführung der Protokolle und die eingesetzte Konzentration der entsprechenden Antikörper erfolgte ebenfalls nach Herstellerangaben (Tab. 5).

Tab. 5 Antikörper-Konzentrationen für Zytokin-ELISAs

Elisa	Konzentration Beschichtungs-AK	Konzentration Detektions-AK	Konzentration 1. Standard
IFN γ	3 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	10.000 pg/ml
TNF- α	1,25 $\mu\text{g/ml}$	0,05 $\mu\text{g/ml}$	1.000 pg/ml
IL-1 β	2 $\mu\text{g/ml}$	0,075 $\mu\text{g/ml}$	500 pg/ml
IL-4	0,5 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	4.000 pg/ml
IL-5	1 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$	4.000 pg/ml
IL-6	2 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$	1.000 pg/ml
IL-13	4 $\mu\text{g/ml}$	0,1 $\mu\text{g/ml}$	500 pg/ml
IL-17A	2 $\mu\text{g/ml}$	0,1 $\mu\text{g/ml}$	1000 pg/ml

Die Herstellung und Verarbeitung der Proben erfolgte für die oben aufgeführten Zytokine nach folgender Anleitung:

Zunächst wurden die 96-Well-Mikrotiterplatten (Flachboden) mit einer Lösung aus 50 $\mu\text{l/Well}$ Primärantikörper (Beschichtungsantikörper) in 0,1 M NaHCO₃ (pH 8,2) beimpft und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurden die Überstände aus den Platten entfernt und mit Waschpuffer viermal gewaschen. Anschließend folgte durch Zugabe von 100 μl Blockpuffer pro Well eine Inkubation für 2 h bei RT. Für die Herstellung der zu untersuchenden Standard-Proben wurden Verdünnungsreihen angefertigt. Ausgehend von den angegebenen Höchstkonzentrationen (Tab. 5) wurde eine 10-stufige 1:2-Verdünnungsreihe in Waschpuffer pipettiert. Im Anschluss folgte nach viermaligem Waschen der Platten das Auftragen der Standard-Proben (50 $\mu\text{l/Well}$) und der zu untersuchenden Überstände (50 $\mu\text{l/Well}$). Es folgte eine weitere Inkubation über Nacht bei 4 °C. Am folgenden Tag wurde nach viermaligem Waschen der Detektionsantikörper (1:200 verdünnt in Waschpuffer, 50 $\mu\text{l/Well}$) aufgetragen und für zwei Stunden bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Es folgten vier weitere Waschschrte und die Inkubation des Streptavidin-Peroxidase-Komplexes (50 $\mu\text{l/Well}$, 1:1000 verdünnt in Waschpuffer) für 30 Minuten im Dunkeln. Nach acht Waschschrten wurde 100 μl pro Well Substratlösung (BM Blue POD) aufgetragen und im Dunkeln inkubiert (5-10 Minuten). Die eintretende Farbreaktion wurde durch Zugabe von 50 μl 2 M Schwefelsäure gestoppt, welche einen Farbumschlag von blau zu gelb bewirkte.

Die Absorption wurde photometrisch gemessen (Messfilter 450 nm, Referenzfilter 530 nm) und die Auswertung der Messdaten erfolgte unter Zuhilfenahme der Photometersoftware Magellan 2.

2.16.2 Cytometric Bead Array (CBA)

Mit den gewonnenen Überständen aus der *in vitro* Subkultivierung der CD4⁺/62L⁺ T-Zellen (s. 2.15.4) wurden Konzentrationen verschiedener Zytokine mittels CBA-Technik bestimmt. Dabei wurden kommerziell erhältliche Testkits (Flex Sets von BD) für die Zytokine IFN γ , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A verwendet.

Das Prinzip für die Messung mehrerer Zytokine gleichzeitig in einer Probe basiert auf verschiedenen Arten von Latexpartikeln, die eine unterschiedliche Größe aufweisen und mit unterschiedlichen Primärantikörpern beschichtet sind. Diese binden spezifisch an Zytokine und zeigen bei Anregung mit einem Laser (488 nm) unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten, so dass jede Intensität speziell einem der Zytokine zuzuordnen ist. Nach Zugabe der Proben bzw. der Standardlösungen mit bekannten Zytokin-Konzentrationen, wurde ein zweiter PE-konjugierter Antikörper hinzugefügt und die Zytokine aus den Proben konnten nun an diesen Sekundärantikörper binden. Als Zytokinstandards wurden neun Verdünnungen im Bereich von 20-5000 pg/ml benutzt. Die Analyse wurde gemäß Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Probenlösungen wurden im Durchflusszytometer (BD AccuriTM C6) gemessen und mittels der Kit zugehöriger Software ausgewertet.

2.17 Molekularbiologische Methoden

2.17.1 Nachweis von Genexpression auf mRNA-Ebene

2.17.1.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Aufreinigung von Zellen aus der *in vitro* Subkultivierung der CD4⁺/62L⁺ T-Zellen (s. 2.15.4) wurde mittels des RNeasy-Kits (Qiagen) gemäß Protokoll des Herstellers durchgeführt. Durch Zentrifugation pelletierte Zellen wurden in 350 μ l RLT-Puffer mit 0,01 % 2-Mercaptoethanol resuspendiert. Anschließend wurden alle Proben mit 350 μ l 70 %-igen Ethanol gewaschen, auf eine Säule gegeben und für 15 Sekunden bei 8000xg zentrifugiert. Der Durchlauf wurde entfernt und es folgte ein Waschschritt mit 700 μ l RW1-Puffer (Zentrifugation für 15 Sekunden bei 8000xg). Der Durchlauf wurde ebenfalls

verworfen und das RNA-Pellet zweimal mit 550 μ l RPE gewaschen (Zentrifugation für 15 Sekunden bei 8000xg und Zentrifugation für 2 Minuten bei 13000xg). Vorhandene Pufferreste wurden durch nochmaliges zentrifugieren entfernt. Durch Zugabe von 30 μ l RNase-freiem Wasser und Zentrifugation (1 Minute bei 8000xg) wurde die RNA aus der Säule eluiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen.

2.17.1.2 DNase-Verdau

Um die RNA-Proben von kontaminierender DNA zu reinigen, wurde ein DNase-Verdau der Proben durchgeführt. Dazu wurden die aufgereinigten RNA-Proben mit 1 μ l DNaseI und 3 μ l 10 x Reaktionspuffer 15 Minuten bei RT inkubiert. Im Anschluss folgten die Zugabe von 1 μ l EDTA und eine weitere Inkubation für 10 min bei 65 °C, um die enzymatische Aktivität der DNase zu inaktivieren. Die Proben wurden auf Eis gelagert.

2.17.1.3 RNA-Quantifizierung

Die anschließende Bestimmung der RNA-Konzentration in den gewonnenen Proben wurde an einem Spektralphotometer (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific) durchgeführt. Dazu wurde 1 μ l der RNA-haltigen Lösung eingesetzt.

2.17.1.4 Reverse Transkription

Für weiterführende qPCR-Experimente wurde die aufgereinigte mRNA mittels eines Enzyms namens Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Zur Durchführung wurde das Omniscript-Kit verwendet. Es wurden 200 ng der aufgereinigten RNA eingesetzt und die Ansätze auf 10 μ l mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt.

Ansatz	
x μ l	RNA (200 ng)
1 μ l	10 x Reaktionspuffer
1 μ l	dNTPs (5 mM)
0,5 μ l	Oligo-dT Primer
0,5 μ l	Reverse Transkriptase
y μ l	RNase-freies Wasser

Die Reaktionsansätze wurden für 60 Minuten bei 37 °C und anschließend für 5 Minuten bei 93 °C inkubiert. Die entstandene cDNA wurde 1:3 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2.17.2 Quantitative Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Zur Quantifizierung der relativen Expression der Zytokingene IL-17A, IL-13 und IL-10 in CD4⁺/62L⁺ T-Zellen aus der *in vitro* Subkultivierung (s. 2.15.4) wurde die quantitative PCR durchgeführt. Um relative Expressionsunterschiede der mRNA in Zellen aus verschiedenen Behandlungsgruppen treffen zu können, wurde neben dem gesuchten Produkt in jeder Probe eine PCR mit einem Haushaltsgen (GAPDH) durchgeführt, welches konstant exprimiert wurde. Anschließend erfolgte eine PCR mit den Primern (s. 2.5.1) des zu analysierenden Gens, so dass Rückschlüsse auf die Expression des gesuchten Gens erhalten werden konnten. Der qPCR-Ansatz enthielt 5 μ l SYBR-Green (Fluoreszenzfarbstoff, enthält Taq-Polymerase), 0,5 μ l Sense-Primer, 0,5 μ l Antisense-Primer, 3 μ l H₂O und 1 μ l cDNA aus der reversen Transkription (s. 2.17.1.4). Zunächst wurde die Taq-Polymerase durch eine 15-minütige Inkubation bei 95 °C aktiviert. Im Anschluss folgten 50 Zyklen mit einer Denaturierungstemperatur von 95 °C über 15 Sekunden, einer Annealingtemperatur von 52 °C für IL-13 (56 °C für IL-17A, 60 °C für IL-10) über 30 Sekunden und einer Elongationstemperatur von 72 °C über 15 Sekunden. Die Berechnung erfolgte mittels der $\Delta\Delta$ ct-Methode, bei der die Differenz der Δ ct-Werte von Haushaltsgen und gesuchtem Gen gebildet und anschließend mit 2 potenziert wird, so dass nun Rückschlüsse auf die Expression des gesuchten Gens gezogen werden können.

Programm für den RotorGene™3000:

Aktivierungsschritt	95 °C	
Denaturierung	95 °C	
Annealing	52/56/60 °C	50 Zyklen
Extension	72 °C	
Temperaturgradient	65 °C - 95 °C	

2.17.3 Analyse der promotorspezifischen Methylierung des IL-17A Promotors

Für die Untersuchung des promotorspezifischen Methylierungsstatus des IL-17-Gens wurde die Bisulfit-Methode herangezogen [240]. Die Bisulfit-Methode ermöglicht, detaillierte Aussagen über die Methylierung der einzelnen CpG-Inseln innerhalb der untersuchten Promotorsequenz zu treffen. Hierbei konvertieren nur unmethylierte Cytosin-Nukleotide unter Bisulfiteinwirkung zu Uracil, während methylierte Cytosin-Nukleotide (5'-Methylcytosin) gegen jene Reaktion resistent sind (Abb. 11). Mittels strangspezifischer PCR wird nach der Bisulfitkonversion die Bisulfit-DNA amplifiziert und dabei Uracil wieder in Thymin übersetzt. Dabei werden methylierte Cytosin-Nukleotide weiterhin als Cytosin amplifiziert. Nach der Aufreinigung der PCR-Produkte kann nun die Sequenzanalyse der Ziel-DNA erfolgen und der Methylierungsstatus mittels Pyrosequenzierung sequenzspezifisch analysiert werden.

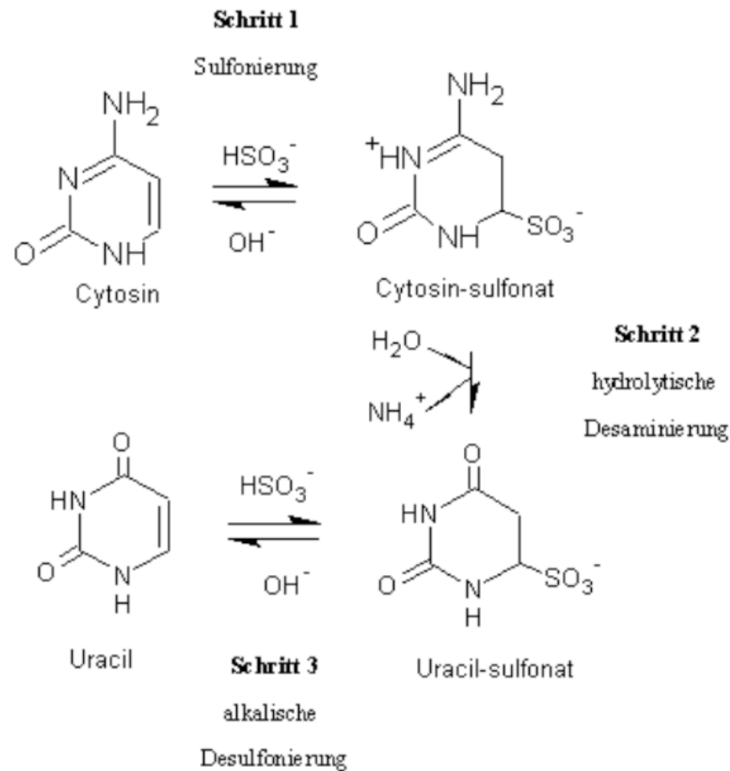


Abb. 11 Chemischer Ablauf der Bisulfitmodifikation von Cytosin zu Uracil (modifiziert nach Clark et al., 1994) [240]

Die Änderungen am Cytosin-Molekül während der Bisulfit-Konvertierung verlaufen in drei Schritten. (1) Sulfonierung: an die 5-6 Doppelbindung von Cytosin erfolgt der Zusatz von Bisulfit (2) Hydrolytische Desaminierung der Cytosin-Bisulfit-Derivate zu Uracil-Bisulfit-Derivaten (3) Alkali Desulfonierung: durch eine Alkalibehandlung erfolgt die Entfernung der Sulfonatgruppe und Uracil entsteht.

2.17.3.1 Bisulfit-Konversion genomischer DNA

Zur Durchführung der Bisulfitkonversionsreaktion wurden die $CD4^+/62L^+$ T-Zellen aus der *in vitro* Subkultivierung (s. 2.15.4) mittels des EpiTect Plus DNA Bisulfite Kits gemäß Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden folgende grundlegende Schritte durchlaufen:

Natriumbisulfit-vermittelte Konversion der unmethylierten Cytosinnukleotide zu Uracil im Thermo-Cycler, Bindung der konvertierten Einzelstrang-DNA an die Membran der EpiTect-Säule, Reinigung der gebundenen DNA und Elution der konvertierten DNA von der Säule. Zunächst wurde die erforderliche Menge an Bisulfit-Mix-Aliquots durch Zugabe von je 800 μ l RNase-freiem Wasser aufgelöst und so lange auf dem Vortex-Schüttelgerät geschüttelt, bis diese komplett gelöst waren. Die Proben-Zellen wurden aufgetaut und für den enzymatischen Zellaufschluss wurden pro Gefäß (200 μ l-Eppendorf-Cups) 20 μ l

gDNA-Probe (100.000 Zellen) in ATL-Puffer und 1 µl Proteinase K für 30 Minuten bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 85 µl Bisulfit-Mix und 15 µl DNA Protect Buffer versetzt. Nach einer gründlichen Mischung der Ansätze konnte ein Farbumschlag des Ansatzes von grün nach blau beobachtet werden, ein Indikator für die korrekte pH-Wert Änderung. Danach schloss sich die fünfstündige Bisulfitkonversionsreaktion der DNA im Thermocycler nach folgendem Protokoll an:

Zyklus	Vorgang	Temperatur	Zeit (min)
1	Denaturierung	95 °C	5
	Inkubation	60 °C	25
	Denaturierung	95 °C	5
	Inkubation	60 °C	85
	Denaturierung	95 °C	5
	Inkubation	60 °C	175
	Halten der Temperatur	20 °C	∞

2.17.3.2 Aufreinigung der konvertierten DNA

Nach Abschluss der Bisulfitkonversionsreaktion wurde die konvertierte DNA aufgereinigt. Dazu wurden 310 µl Puffer BL (mit 10 µg Carrier-RNA versetzt), 250 µl Ethanol (96 %) hinzugefügt und der komplette Ansatz in ein EpiTect spin column überführt. Die Proben wurden bei maximaler Geschwindigkeit für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 500 µl Waschpuffer (Puffer BW) auf die Säule pipettiert. Es folgten ein weiterer Zentrifugationsschritt bei maximaler Geschwindigkeit (1 min) und das Verwerfen des Durchflusses. Anschließend wurde die Säule mit 500 µl Desulfonierungspuffer (Puffer BD) beschickt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei maximaler Geschwindigkeit (1 min) wurde der Durchfluss verworfen, die Säule mit Waschpuffer (Puffer BW) befüllt und erneut 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Um verbleibende Flüssigkeitsreste zu entfernen, wurde die Säule in ein neues 2 ml

Sammelröhrchen gesteckt und bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Danach wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Cup gesteckt und mit 10 µl Elutionspuffer (Buffer EB) beschichtet. Die aufgereinigte DNA wurde durch eine einminütige Zentrifugation bei 15000xg eluiert und bei -20°C gelagert.

2.17.3.3 Amplifikation der Bisulfit-DNA

Die Amplifikations-PCR mit der konvertierten DNA erfolgte mittels des HotStarTaq Master Mix Kits. Dazu wurden die Reaktionsansätze konvertierter Proben-DNA pipettiert und nach dem unten angeführten PCR-Protokoll im Thermocycler amplifiziert.

Ansatz	
1 µl	gDNA
25 µl	HotStarTaq Master Mix
1 µl	Forward Primer (10 pmol/µl)
1 µl	Reverse Primer (10 pmol/µl)
22 µl	RNase-freies Wasser
50 µl	

Aktivierungsschritt	15 Minuten	95 °C	
Denaturierung	40 Sekunden	94 °C	47 Zyklen
Annealing	40 Sekunden	52 °C	
Extension	40 Sekunden	72 °C	
Temperaturgradient	10 Minuten	72 °C	

Zur Kontrolle der PCR-Produkte wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden 5 µl des synthetisierten DNA-Amplifikats mit 1 µl Gel-Loading-Solution versetzt und dieser Ansatz auf ein 1 %-iges Agarosegel (0,2 µg/ml Ethidiumbromid) in TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer) aufgetragen. Die synthetisierten DNA-Amplifikate wurden mithilfe eines Basenstandards auf die korrekte Länge hin überprüft. Die Elektrophorese wurde bei 100 V für eine Stunde durchgeführt und anschließend an der Geldokumentationsstation ausgewertet.

Nur bei Nachweis der erwarteten Amplifikatgröße wurde das PCR-Produkt für die anschließende Pyrosequenzierung eingesetzt. Die restlichen Proben wurden bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.17.3.4 Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung Bisulfit-behandelter DNA ermöglicht die präzise Quantifizierung des Methylierungsgrades eines DNA-Abschnitts. Die Methode basiert auf dem Prinzip der Sequenzierung durch Synthese. Daher müssen die DNA-Proben für die Pyrosequenzierung als Einzelstrang vorliegen, um die Anlagerung der Sequenzierprimer zu ermöglichen. Das zu analysierende DNA-Fragment wird vorerst mit zwei Primern amplifiziert, von denen einer biotinyliert ist. Im folgenden Schritt bindet dieser Biotin-Rest an Streptavidin-gekoppelte Sepharose-Beads. Anschließend wird mithilfe einer NaOH-haltigen Denaturierungslösung der Sense-Strang gelöst und in einem Waschschrift entfernt, während der Biotin-gekoppelte Einzelstrang über die Biotin-Streptavidin-Bindung an den Sepharose-Beads zurückgehalten wird. Die DNA-Einzelstränge, welche nun als Matrize dienen, werden zusammen mit den Enzymen DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luziferase, Apyrase sowie den zugehörigen Substraten Adenosin 5'Phosphosulfat (APS) und Luziferin inkubiert. Beim Sequenziervorgang werden dem Reaktionsgemisch nacheinander dNTPs zugesetzt. Handelt es sich hierbei um ein komplementäres Nukleotid zur jeweiligen Base der template DNA, erfolgt der Einbau in den neu synthetisierten DNA-Strang durch die DNA Polymerase (Abb. 12).

Bei diesem Vorgang wird Pyrophosphat (PPi) freigesetzt, das von der ATP-Sulfurylase in Anwesenheit von APS in ATP umgewandelt wird. Dieses ATP treibt wiederum den durch die Luciferase-vermittelten Umbau von Luziferin zu Oxyluciferin an, welches proportional zur Menge des ATP sichtbares Licht der Wellenlänge $\lambda=560$ nm emittiert. Dieses Lichtsignal wird von einem Messgerät detektiert und schließlich als Peak im Pyrogramm dargestellt, wobei die Höhe eines jeden Peaks (Lichtsignal) proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide ist. Bevor das nächste Nukleotid zugefügt wird, baut das Enzym Apyrase überschüssige dNTPs ab. Im Lauf dieses Vorgangs wird ein komplementärer DNA-Strang aufgebaut, dessen Sequenz an den Peaks im Pyrogramm abgelesen werden kann und der DNA-Methylierungsgrad anhand der Ratio T / C bestimmt werden kann [241].

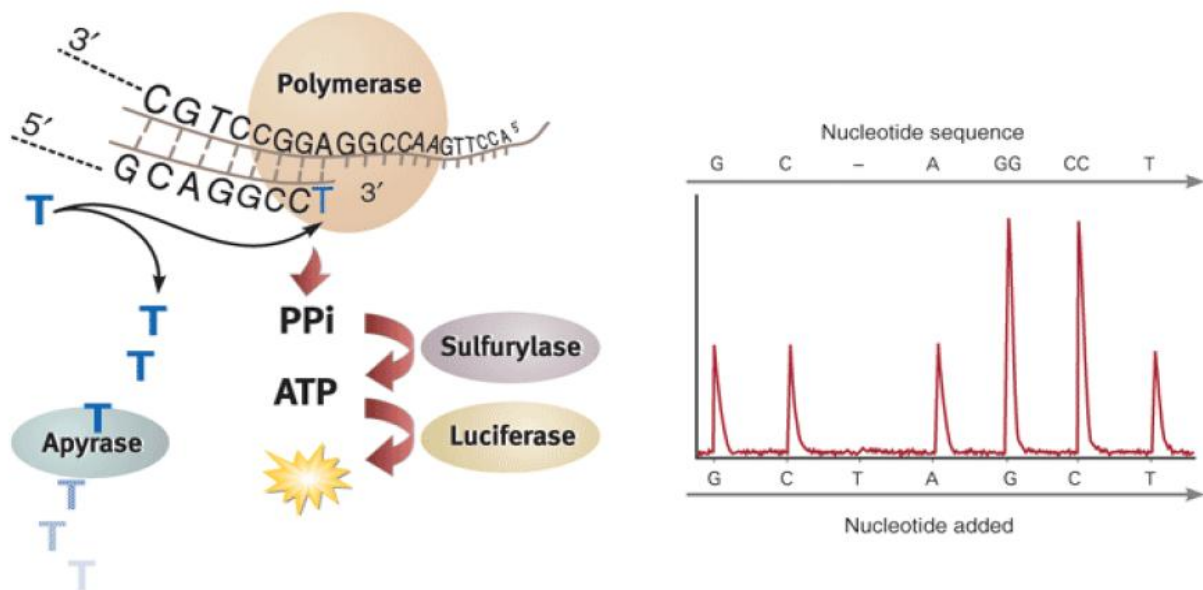


Abb. 12 Prinzip der Pyrosequenzierung [242]

PPi: Pyrophosphat, ATP: Adenosintriphosphat
 (http://www.biospektrum.de/blatt/d_bs_pdf&_id=959858).

Das Vorgehen bei der Pyrosequenzierung erfolgte nach Angaben des Herstellers (PyroMark ID, Biotage). Folgende Schritte wurden nach Protokoll durchgeführt:

Die nach Punkt 2.17.3.3 erhaltenen PCR-Produkte mit der biotinylierten DNA wurden in eine 96-Well-Platte überführt. Die Proben wurden mit 4 µl Sepharose Beads und 36 µl Binding-Puffer versetzt und 10 Minuten auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde ein speziell entwickeltes sogenanntes „Vacuum Preparation Tool“ (VPT) vorbereitet. Der VPT enthält 2 Positionen für eine 96-Well-Platte und eine PSQ96-Platte. Zusätzlich enthält es 4 Becken die mit VE-Wasser (Position 1), mit 70 %-igen Ethanol (Position 2), 0,2 M NaOH-Denaturierungslösung (Position 3) und Waschpuffer (Position 4) befüllt wurden. Die PSQ96-Platte wurde platziert und 1 µl des Sequenzierprimers und 40 µl Annealing Buffer pro Well vorgelegt. Nach 10 minütiger Inkubation auf dem Schüttler hatte die DNA aus der PCR die Sepharose gebunden und konnte nun mit Hilfe des VPT aus den Vertiefungen der PCR-Platte an die einzelnen Saugstifte (Membranen) des VPT gesaugt werden. Anschließend wurde das VPT für ca. 5 Sekunden in jedes der 4 Becken getaucht. Nachdem alle Becken durchlaufen sind, erfolgte ein kurzes Trocknen an der Luft. Durch ein leichtes Schütteln wurden die Sepharose Beads von den Saugstiften des VPT in die einzelnen Wells der PSQ96-Platte transferiert. Es folgte eine Inkubation für 2 Minuten bei

80 °C, um ein Anlagern des Sequenzierprimers an die DNA zu ermöglichen. Anschließend wurde die PSQ96-Platte für 5 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt, sodass währenddessen der Annealingschritt des Sequenzierprimers erfolgte. Für den Sequenziervorgang wurde die PSQ96-Platte mit den vorbereiteten Proben in den Pyrosequenzierer eingesetzt und die Reagenzien (Enzyme, Substrat und Nukleotide) in die PSQ 96 Patrone pipettiert. Die Analyse für den Sequenzierungslauf wurde gestartet und die Bestimmung des Methylierungsgrades des IL-17A Promotors durchgeführt. Das Ergebnis der Sequenzanalyse wurde mithilfe der Q-CpG Software (Biotage) ausgewertet.

2.18 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der Analysen-Daten, die graphische Darstellung und die Berechnung der Signifikanz wurde mit der Software GraphPad Prism® durchgeführt. Zur Überprüfung von Unterschieden zwischen den Vergleichsgruppen auf statistische Signifikanz wurde der „Student t-Test“ (unbehaart) verwendet. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Signifikanzwerte sind wie folgt gekennzeichnet: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3 ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung des asthmatischen Phänotyps nach *A. lwoffii* Exposition im Akutmodell der allergischen Atemwegsentzündung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Einfluss von *A. lwoffii* auf die Ausprägung des asthmatischen Phänotyps *in vivo* nachgewiesen. Als „Proof-of-Concept“-Versuch wurde dazu anhand des akuten Mausmodells der allergischen Atemwegsentzündung untersucht, ob *A. lwoffii* sowohl durch Lebend- als auch durch Totkeimapplikation bei der Entstehung des reduzierten asthmatischen Phänotyps eine Rolle spielt. In den Versuchs- und Kontrollgruppen wurden phänotypische Parameter wie allergenspezifische Antikörper im Serum, Differenzierung der Zellpopulationen in der BAL, Zytokinproduktion, Lungenfunktionsmessung und Lungenhistologie analysiert, um die Entwicklung eines manifesten allergischen Phänotyps zu charakterisieren.

3.1.1 Lebend- und Totkeim-Exposition von *A. lwoffii* führt zu einer Reduktion der akuten allergischen Atemwegsentzündung im Mausmodell des experimentellen Asthmas

Zunächst wurden die Versuchstiere nach dem etablierten Protokoll der akuten allergischen Atemwegsentzündung, mittels der im Methodenteil beschriebenen Analysen, 5 Wochen lang mit *A. lwoffii* (Lebend- und Totkeimapplikation) intranasal behandelt. Parallel zur *A. lwoffii* (ACI) Behandlung wurden die Tiere durch drei subkutane Injektionen mit dem Modellallergen OVA sensibilisiert und einem OVA-Aerosol exponiert. Den Mäusen der Negativ-Kontrollgruppen wurde statt OVA PBS injiziert. Zur Kontrolle des systemischen Sensibilisierungserfolges wurden im Serum die Immunglobulin-Konzentrationen von OVA-spezifischen IgE und IgG₁ mittels Elisa gemessen (Abb. 13). So zeigten OVA-sensibilisierte Mäuse einen signifikanten Anstieg von OVA-spezifischen IgE und IgG₁ um ein Vielfaches über dem Ausgangswert der Kontrollgruppen (PBS). Die intranasale *A. lwoffii* Applikation an OVA-sensibilisierten Tieren führte zu keinem signifikanten Unterschied in der Immunglobulin-Produktion. Bei Nicht-OVA-sensibilisierten Mäusen (PBS) ließen sich erwartungsgemäß keine OVA-spezifischen Immunglobuline messen.

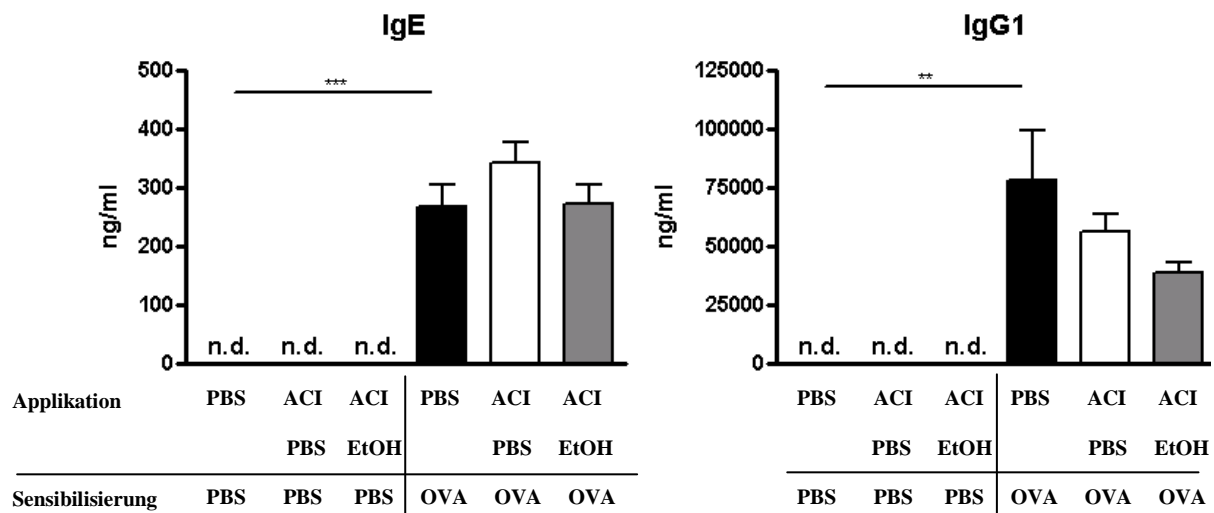


Abb. 13 OVA-spezifische Immunglobulin-Konzentrationen im Serum nach Behandlung mit *A. lwoffii* im akuten Modell der allergischen Atemwegsentzündung

Weiblichen Balb/c-Mäusen (n=8 pro Gruppe) wurde beginnend zehn Tage vor der Sensibilisierung mit OVA (PBS als Kontrolle) *A. lwoffii* (1×10^8 CFU/50 μ l) intranasal appliziert. *A. lwoffii* wurde als Lebendkeim (ACI-PBS) und als abgetöteter Keim (ACI-EtOH) verabreicht. Anschließend erfolgte die dreimalige Provokation mit 1 % OVA-Aerosol. Die Abnahme der Blutproben zur Serumgewinnung fand 48 h nach der letzten OVA-Exposition statt. Die Bestimmung der OVA-spezifischen Immunglobuline IgE und IgG₁ im Serum wurde mittels ELISA durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001). n.d.: nicht detektierbar.

Die Progression der allergischen Atemwegsentzündung führt deutlich zu einer Veränderung der Zusammensetzung des Infiltrats und zur Eosinophilie in der BAL. Durch Differenzierung der Leukozytenpopulationen aus der bronchoalveolären Lavage lässt sich die Entzündung qualitativ beschreiben. So dominieren in der akuten Entzündung sowohl in der BAL wie auch im Gewebe die eosinophilen Granulozyten als Effektorzellen der allergischen Immunantwort, die den größten Anteil des Infiltrats ausmachen. Daneben kommen in viel geringerem Maße Lymphozyten und Makrophagen vor. Während in der BAL der Negativ-Kontrollgruppen (PBS) die niedrigsten Leukozytenzahlen zu identifizieren waren, zeigten sensibilisierte Kontrolltiere (OVA) einen massiven Influx der Leukozyten, die einen mehrfachen signifikanten Anstieg der Leukozyten-Konzentration aufweisen (Abb. 14). Die alleinige *A. lwoffii* Applikation (OVA) hatte dagegen keinen Einfluss auf die erhöhte Leukozyten-Konzentration im Vergleich zu der OVA-Kontrollgruppe. Die weitere Differenzierung der Leukozyten zeigte, dass der Anstieg der BAL-Gesamtzellzahl in *A. lwoffii*-behandelten Tieren durch einen signifikanten mehrfachen Anstieg der neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen gekennzeichnet war. Weiterhin kam es zu einer Entzündungsreaktion in den Atemwegen, hauptsächlich begleitet durch den Einstrom von eosinophilen Granulozyten.

Die Tiere der *A. lwoffii*-behandelten sensibilisierten Gruppen wiesen im Vergleich zur OVA-Gruppe eine signifikante Verringerung der Entzündung durch Infiltration der eosinophilen Granulozyten auf. In der weiteren Differenzierung der Leukozytensubpopulationen zeigten sich in nicht-sensibilisierten Tieren (PBS) Makrophagen als dominante Zellsubpopulation. In OVA-sensibilisierten Tieren konnte die Induktion der Entzündungsreaktionen ebenfalls durch den Anstieg der Lymphozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten beobachtet werden. Die Behandlung mit *A. lwoffii* führte dabei zu einem signifikanten Anstieg dieser Leukozytensubpopulationen, die als Reaktion auf die mikrobielle Stimulation charakteristisch ist. In keiner der Leukozytensubpopulationen zeigten sich Unterschiede im Vergleich der beiden *A. lwoffii*-behandelten Gruppen. Sowohl die Lebend- als auch die Totkeimapplikation von *A. lwoffii* führten zu einer verringerten Eosinophilie.

Im Mausmodell für das akute allergische Asthma ist die Atemwegsentzündung mit der Entwicklung einer Atemwegsüberempfindlichkeit assoziiert. Da nach der Allergenexposition die Entzündung des Atemwegsgewebes zu beobachten war, wurde weiterhin untersucht, ob die Entzündungssituation mit einer Veränderung der Atemwegsreagibilität einhergeht und ob diese eventuell mit der Veränderung der Lungenfunktion assoziiert ist. Zum Nachweis der bronchialen Hyperreagibilität wurde die Lungenfunktionsmessung mittels der im Methodenteil beschriebenen Head-out Body-Plethysmographie durchgeführt, wobei sich folgendes Bild zeigte (Abb. 15):

Nach OVA-Sensibilisierung und -Provokation entwickelten die Tiere eine Atemwegshyperreagibilität gegenüber Methacholin, welche sich in einer signifikanten Verringerung der Lungenfunktion darstellte. Während PBS-Tiere durchschnittlich mit einer 50 %-igen Reduktion des EF50 reagierten, zeigten Tiere mit akuter allergischer Atemwegsentzündung (OVA sensibilisiert) eine signifikant erhöhte Atemwegsreagibilität und damit die Entwicklung einer Atemwegshyperreagibilität. Im Vergleich dazu war in der allergenprovozierten Gruppe (OVA) der *A. lwoffii*-behandelten Tiere eine signifikant verringerte Atemwegsreaktivität zu erkennen, während die Atemwegsreaktivität der Lebend- und Totkeimapplikation von *A. lwoffii* sich nicht wesentlich gegenüber der OVA-Gruppe unterschied.

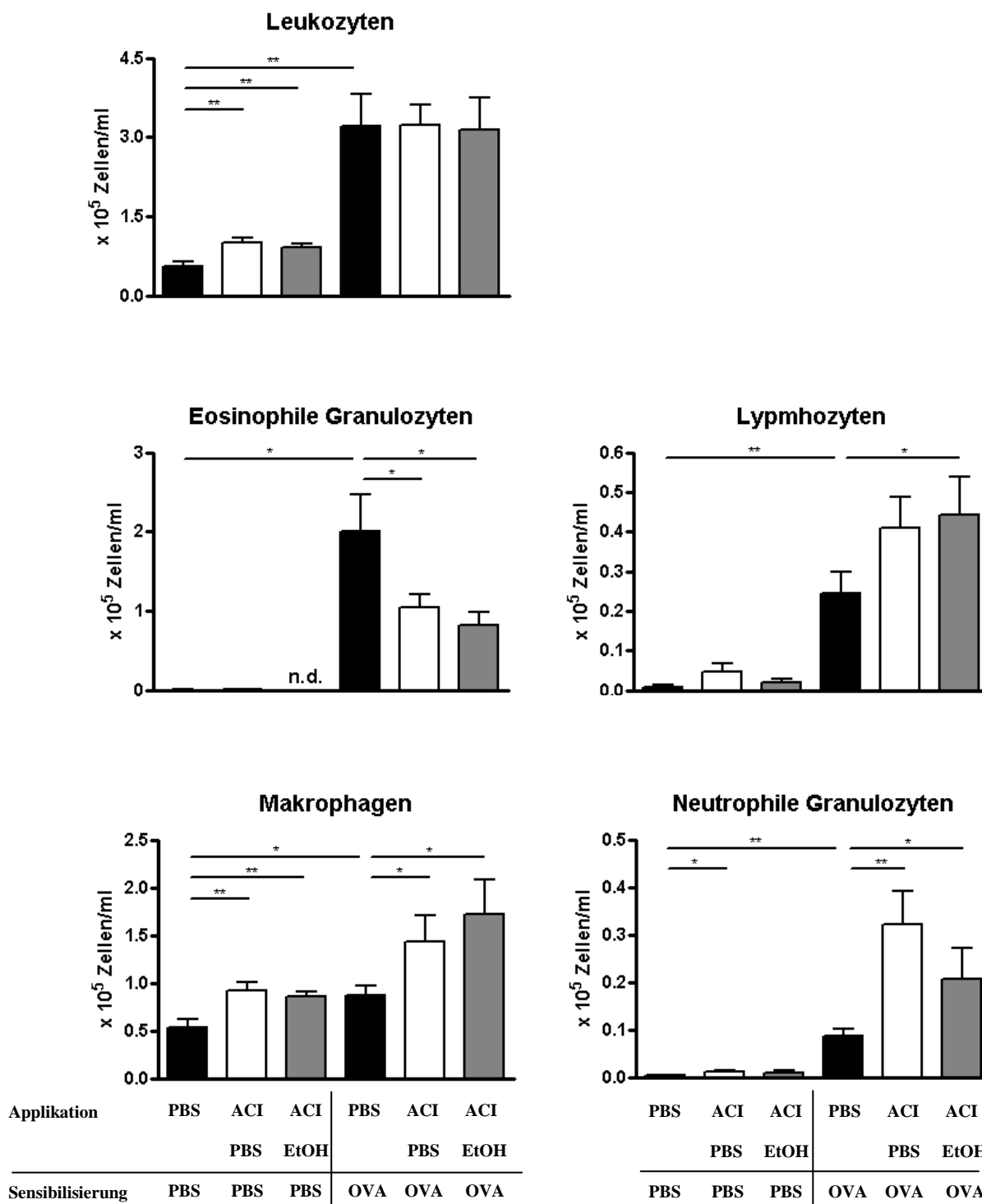


Abb. 14 Differenzierung der Leukozyten in der BAL nach Behandlung mit *A. lwoffii* im akuten Modell der allergischen Atemwegsentzündung

Weiblichen Balb/c-Mäusen (n=8 pro Gruppe) wurde beginnend zehn Tage vor der Sensibilisierung mit OVA (PBS als Kontrolle) *A. lwoffii* (1×10^8 CFU/50 μ l) intranasal appliziert. *A. lwoffii* wurde als Lebendkeim (ACI-PBS) und als abgetöteter Keim (ACI-EtOH) verabreicht. Anschließend erfolgte die dreimalige Provokation mit 1 % OVA-Aerosol. Die bronchoalveoläre Lavage fand 48 h nach der letzten OVA-Exposition statt. Die Quantifizierung der Zellen wurde lichtmikroskopisch anhand zytologischer Kriterien durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001). n.d.: nicht detektierbar.

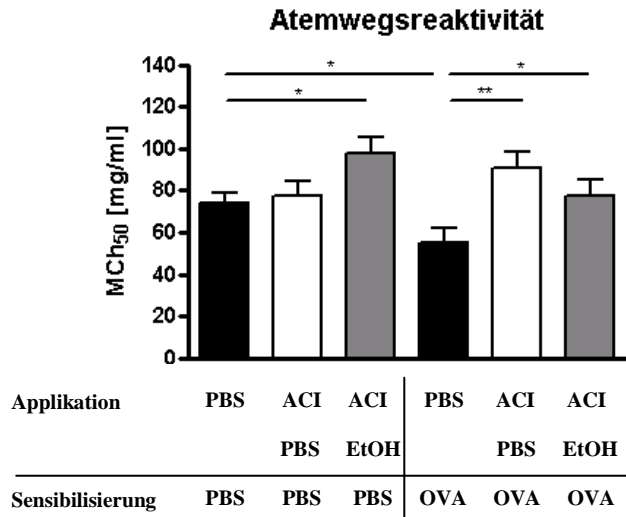


Abb. 15 Atemwegsreaktivität nach Behandlung mit *A. lwoffii* im akuten Modell der allergischen Atemwegsentszündung

Weiblichen Balb/c-Mäusen (n=8 pro Gruppe) wurde beginnend zehn Tage vor der Sensibilisierung mit OVA (PBS als Kontrolle) *A. lwoffii* (1×10^8 CFU/50 μ l) intranasal appliziert. *A. lwoffii* wurde als Lebendkeim (ACI-PBS) und als abgetöteter Keim (ACI-EtOH) verabreicht. Anschließend erfolgte die dreimalige Provokation mit 1 % OVA-Aerosol. 24 h nach der letzten OVA-Exposition erfolgte die Analyse der Atemwegsreaktivität mittels Head-Out Body-Plethysmographie und wird als die Konzentration an β -Methyl-Acetylcholin (MCh_{50}) ausgedrückt, die eine 50 %-ige Reduktion des Ausgangswerts des halbmaximalen expiratorischen Atemflusses bewirkt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001). n.d.: nicht detektierbar.

T_H2 -Zellen mit ihren Effektorzytokinen spielen eine zentrale Rolle im asthmatischen Entzündungsgeschehen, wie z.B. IL-5 für die Eosinophilendifferenzierung bzw. IL-13 für die bronchiale Hyperreagibilität. Daher wurde zur weiteren Charakterisierung der Atemwegsentszündung das Zytokinprofil in der BAL bestimmt. Dabei ließ sich bei der akuten allergischen Atemwegsentszündung, die ebenfalls durch das Vorkommen der T_H2 -Zytokine IL-5 und IL-13 gekennzeichnet ist, deutlich höhere Konzentrationen an IL-5 und IL-13 nach Allergenprovokation feststellen (Abb. 16). Damit bestätigte sich auch hier die erfolgreiche Entwicklung des allergischen Phänotyps. Die *A. lwoffii* Behandlung (Lebend- und Totkeimapplikation) an OVA-sensibilisierte Tiere führte zu einer signifikanten Reduktion der T_H2 -Zytokine IL-5 und IL-13 verglichen mit der Positiv-Kontrollgruppe. Auch hier zeigte eine alleinige *A. lwoffii* Behandlung keinerlei Einfluss auf die Zytokinproduktion, da die Werte der T_H2 -Zytokine in den PBS-Gruppen stark supprimiert waren.

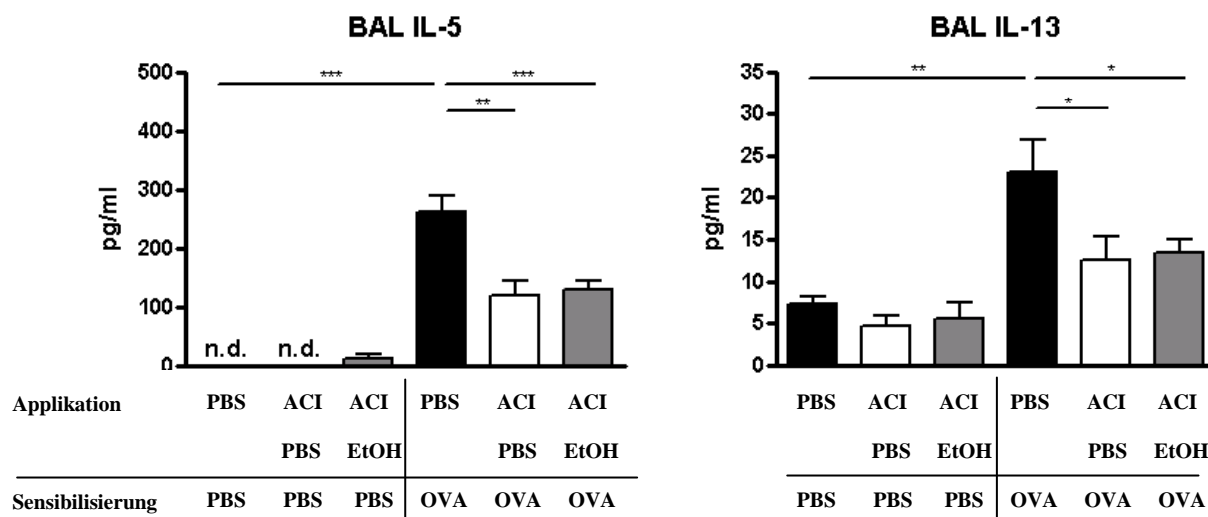


Abb. 16 Zytokin-Konzentrationen in der BAL nach Behandlung mit *A. lwoffii* im akuten Modell der allergischen Atemwegsentzündung

Weiblichen Balb/c-Mäusen (n=8 pro Gruppe) wurde beginnend zehn Tage vor der Sensibilisierung mit OVA (PBS als Kontrolle) *A. lwoffii* (1×10^8 CFU/50 μ l) intranasal appliziert. *A. lwoffii* wurde als Lebendkeim (ACI-PBS) und als abgetöteter Keim (ACI-EtOH) verabreicht. Anschließend erfolgte die dreimalige Provokation mit 1 % OVA-Aerosol. Die bronchoalveoläre Lavage fand 48 h nach der letzten OVA-Exposition statt. Zytokin-Konzentrationen im zellfreien Überstand der BAL wurden mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). n.d.: nicht detektierbar.

Um zu untersuchen wie sich die *A. lwoffii* Behandlung OVA-sensibilisierter Mäuse auf die pulmonale Entzündung im Gewebe auswirkt, wurde das Lungengewebe analysiert. Auch nach histologischer Untersuchung konnte festgestellt werden, dass die akute allergische Entzündung der Atemwege typischerweise zu einer Infiltration inflammatorischer Zellen im Lungengewebe, insbesondere zur Akkumulation eosinophiler Granulozyten und mukusproduzierender Becherzellen, führte. In der PAS-Färbung zeigte sich in Präparaten der OVA-Gruppen ein massives leukozytäres Infiltrat in der Atemwegs- wie auch in der Gefäßwand, das vor allem durch eosinophile Granulozyten charakterisiert ist und somit dem bronchoalveolären Infiltrat entspricht (Abb. 17). Im Gegensatz dazu resultierte die Applikation von *A. lwoffii* (Lebend- und Totkeimapplikation) an OVA-sensibilisierten Tieren, in einer deutlichen Reduktion der Anzahl infiltrierender eosinophiler Granulozyten, während die Anzahl der in das Atemwegsgewebe infiltrierten Lymphozyten unverändert blieb. Ein ähnliches Bild zeigte auch die Analyse der Leukozytensubpopulationen der BAL (Abb. 14). Die Entzündung der Atemwege ist, wie in der PAS-Färbung zu sehen, jeweils mit einer für das allergische Asthma typischen Becherzellhyperplasie assoziiert. Erwartungsgemäß ist in der Histologie der nicht-sensibilisierten Kontrolltiere keine Entzündung und Zellrekrutierung in das Atemwegsgewebe zu erkennen, wie es in der BAL zu beobachten war.

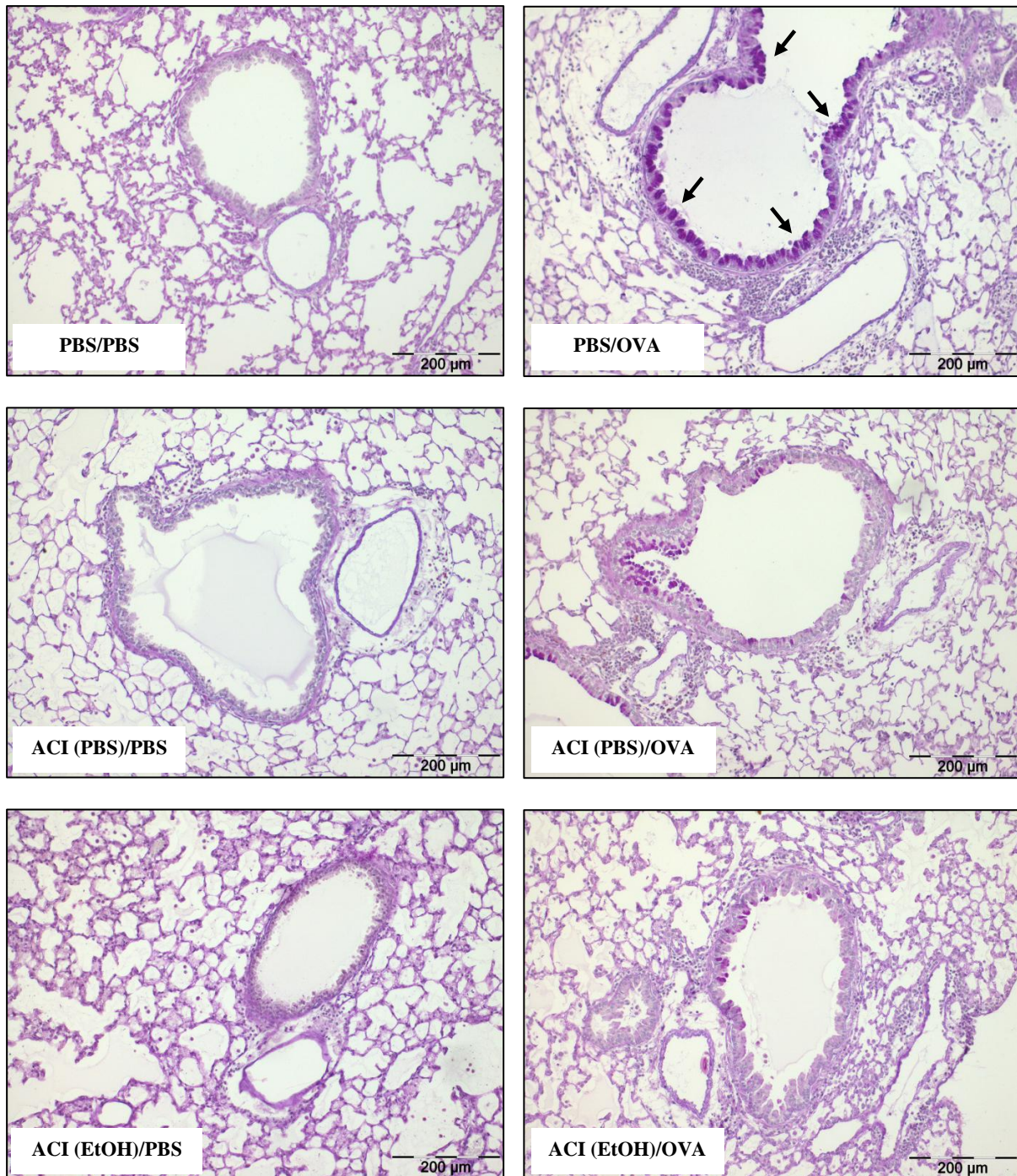


Abb. 17 Lungenhistologie nach Behandlung mit *A. lwoffii* im akuten Modell der allergischen Atemwegsentzündung

Weiblichen Balb/c-Mäusen (n=8 pro Gruppe) wurde beginnend zehn Tage vor der Sensibilisierung mit OVA (PBS als Kontrolle) *A. lwoffii* (1×10^8 CFU/50 µl) intranasal appliziert. *A. lwoffii* wurde als Lebendkeim (ACI-PBS) und als abgetöteter Keim (ACI-EtOH) verabreicht. Anschließend erfolgte die dreimalige Provokation mit 1 % OVA-Aerosol. 48 h Stunden nach der letzten OVA-Exposition erfolgte die Lungenentnahme. Zu sehen ist die Histologische Darstellung der Infiltration inflammatorischer Zellen in das Lungengewebe, sowie der Anteil mukosproduzierender Becherzellen (lila) in den Atemwegen mittels PAS-Färbung. Pfeile kennzeichnen eosinophile Granulozyten. Balken = 200 µm.

3.1.2 Zusammenfassung der Phänotypenanalysen

Zusammenfassend resultierte die Allergenprovokation in der Positiv-Kontrollgruppe (OVA) in einer akuten Atemwegsentzündung, sichtbar an einer erhöhten bronchialen Hyperreagibilität, einem peribronchialen entzündlichen Infiltrat sowie einer Becherzellhyperplasie in der Lungenhistologie, einer erhöhten Konzentration eosinophiler Granulozyten in der BAL und der Induktion OVA-spezifischer Immunglobuline. In der Negativ-Kontrollgruppe (PBS) zeigten sich keine für experimentelles Asthma charakteristischen Effekte. Die alleinige *A. lwoffii* Behandlung ohne OVA-Sensibilisierung als Kontrolle führte zu keinen signifikanten Veränderungen gegenüber der nicht-sensibilisierten Gruppe (PBS), sowohl bezüglich der Parameter des asthmatischen Phänotyps als auch hinsichtlich der Zytokin- und Antikörperproduktion, und war vergleichbar mit der PBS-Kontrollgruppe. Die Lebendkeim- und Totkeim-Exposition von *A. lwoffii* in OVA-sensibilisierten Mäusen führte zu einer nahezu kompletten Aufhebung des asthmatischen Phänotyps. So war die Entwicklung der Atemwegshyperreaktivität, die mit der PBS-schein-sensibilisierten Kontrollgruppe vergleichbar war, nahezu komplett wiederhergestellt. Auch die histologische Auswertung der Lungen ließ einen stark verminderten pulmonalen Entzündungsgrad und eine deutlich reduzierte Anzahl an mukusproduzierenden Becherzellen sowie eosinophilen Granulozyten in den Atemwegen aufweisen. Die reduzierte Anzahl der eosinophilen Granulozyten konnte ebenfalls mit signifikanten Effekten in der BAL festgestellt werden. Weiterhin bestätigte auch das Zytokinmuster eine stark verringerte Produktion der T_H2 -Zytokine IL-5 und IL-13 auf Proteinebene nach *A. lwoffii* Exposition in OVA-sensibilisierten Mäusen. Die erfolgreiche Reproduktion der Phänotypen führte in erwünschter Weise zur Entstehung eines protektiven immunmodulatorischen Effekts von *A. lwoffii*, sowohl mit der Lebendkeim- als auch mit der Totkeim-Behandlung bezüglich des asthmatischen Phänotyps und liefert interessante therapeutische Ansätze, die es auf molekularer Ebene weiter zu untersuchen gilt.

3.2 Stimulation von innatem Immunzellen durch mikrobielle Exposition

Die phagozytierenden Makrophagen als Bestandteil der zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems stellen die relevanten Zellen für eine Immunantwort als Reaktion auf mikrobielle Stimulation dar und spielen daher eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung und Polarisierung der Immunantworten. Wie andere Bakterien auch ist *A. lwoffii* in der Lage durch „Pattern Recognition Receptors“ (PRRs), wie z.B. Toll-like Receptors (TLR), eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems auszulösen und als Reaktion die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine zu induzieren [243]. Nach Erkenntnissen unserer Arbeitsgruppe konnten Muttertiere, die eine Toll-like Rezeptor (TLR) 2/3/4/7/9^{-/-} Defizienz besaßen, den protektiven Effekt der *A. lwoffii* Behandlung auf ihre Nachkommen nicht übertragen [198]. Diese Untersuchungen zeigten, dass die *A. lwoffii*-vermittelte Asthmaprotektion von TLRs seitens der Muttertiere abhängig ist und deren Stimulation gefolgt ist von erhöhten IL-6 Titern in BAL und Serum [198]. Demnach spielt das proinflammatorische Zytokin IL-6 möglicherweise eine wichtige Rolle als Mediator der transmaternalen Asthmaprotektion. Um den Mechanismus der proinflammatorischen Wirkungsweise von *A. lwoffii* aufzuklären und genauere Daten über involvierte proinflammatorische Zytokine zu erhalten, wird in diesem Kapitel der Effekt von *A. lwoffii* auf murine Makrophagenzellen und deren Zytokinexpressionsmuster *in vitro* untersucht. Aufgrund bisher publizierter Daten und im Hinblick auf mögliche orale Substitution von allergoprotektiven und toleranzinduzierenden Immunmodulatoren *in vivo* lag es nahe, weitere mikrobielle Substanzen zu untersuchen, die keine zellschädigende sondern stimulierende Wirkung auf Makrophagen aufweisen. Daher wurde parallel zu *A. lwoffii* bei diesen Versuchsreihen die immunstimulatorische Wirkung des Wildtyp-Proteins (CT) und des CTB auf murine Makrophagenzellen und deren Zytokinexpression *in vitro* untersucht. Zur Erfassung der zeit- und dosisabhängigen Induktion proinflammatorischer Zytokine nach *A. lwoffii* und Cholera Toxin Stimulation in murinen Makrophagen wurden die Ergebnisse dieser Versuche qualitativ und quantitativ in einer Kinetik analysiert.

3.2.1 Aktivierung von murinen alveolären Makrophagen durch *A. lwoffii*

Voraussetzung für unsere nachfolgenden Untersuchungen zur *A. lwoffii* F78 induzierten Zytokinexpression in Makrophagen ist die Aktivierung dieser Zellen zunächst durch Aufnahme der Bakterien oder Bestandteile der Bakterien. Bei der Aufnahme des gram-negativen *A. lwoffii* handelt es sich um einen klassischen Phagozytoseprozess. Dabei lösen gram-negative Bakterien durch ihre Oberflächenstrukturen bzw. durch das innerhalb ihrer Mureinschicht liegende LPS eine Aktivierung von APCs aus. Das LPS wird von einem Lipopolysaccharid-Bindungsprotein (LBP) opsonisiert und dieser Komplex vom CD14-Rezeptor auf phagozytierenden Zellen erkannt und gebunden, was schließlich in einer Aktivierung des TLR4 resultiert. Über verschiedene Signalwege kommt es nun zu einer Aktivierung und Sekretion proinflammatorischer Zytokingene in Monozyten und Makrophagen [244].

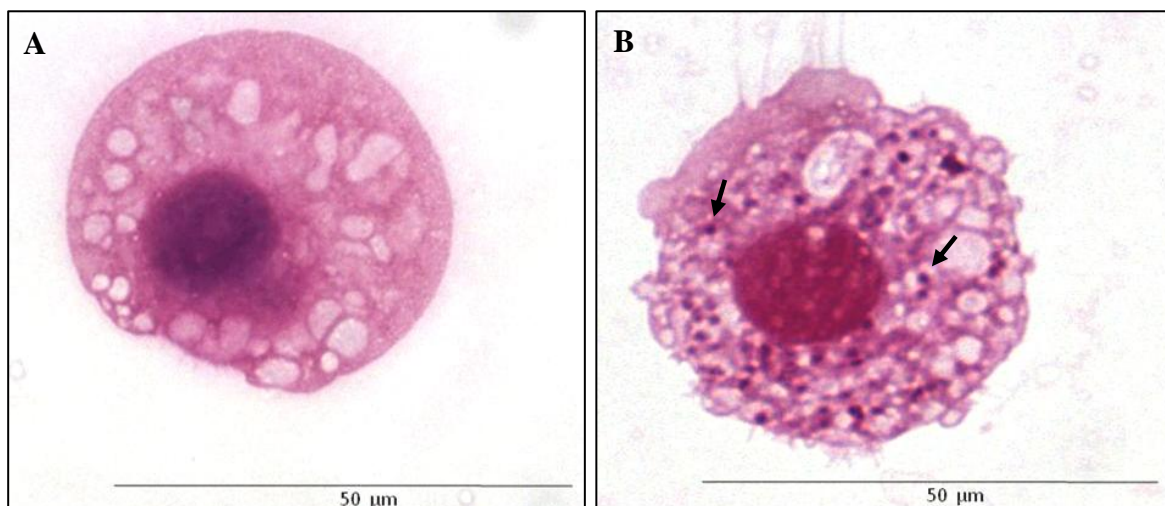


Abb. 18 Histologische Darstellung der primären alveolären Makrophagen mit intrazellulären Bakterien
 Weiblichen Balb/c-Mäusen (n=4 pro Gruppe) wurde PBS (Kontrolle, A) und *A. lwoffii* (1×10^8 CFU/50 µl, B) intranasal appliziert. Die bronchoalveoläre Lavage fand 4 h nach der Behandlung statt. Anschließend wurden Zytospin-Präparate aus BAL-Proben hergestellt und nach Gram, wie in Kapitel 2.14.2 beschrieben, gefärbt. Die morphologische Beurteilung der Makrophagen von Ausschnitten der Zytospinpräparationen wurde lichtmikroskopisch anhand zytologischer Kriterien durchgeführt. Pfeile kennzeichnen phagozytierte intrazelluläre Bakterien (lila). Balken = 50 µm.

Wie in Abb. 18 exemplarisch dargestellt, waren die primären Makrophagen in der Lage *A. lwoffii* F78 zu phagozytieren (B). Dabei wiesen die gram-negativ gefärbten Bakterien eine zytoplasmatische Lokalisation auf. Darüber hinaus lassen die Ergebnisse der Färbung erkennen, dass die intrazelluläre Partikelaufnahme eine frühe und schnelle Reaktion der Makrophagen auf die Keimexposition ist. Bereits nach einer 4 h Belastung mit *A. lwoffii* lassen sich Granularitätserhöhungen beobachten. Die mikroskopischen Aufnahmen der PBS behandelten Tiere (A) zeigten allerdings im Vergleich dazu keine phagozytotische Aktivität. Dieses Ergebnis spricht für eine mögliche funktionelle Bedeutung der Phagozytose und war damit Voraussetzung für unsere nachfolgenden Untersuchungen zur Zytokininduktion in Makrophagen.

3.2.2 Induktion proinflammatorischer Zytokine infolge einer Behandlung mit *A. lwoffii* in Makrophagen-Kulturzellen

Als Reaktion auf die mikrobielle Stimulation der murinen Makrophagen-Kulturzellen J774 *in vitro* war mit der Produktion typischer Zytokine des angeborenen Immunsystems zu rechnen. Um ein Bild über das Expressionsmuster der proinflammatorischen Zytokine IL-6, TNF α , IL-1 β , IL-17A und IFN γ zu erlangen wurde zunächst die Zeitabhängigkeit der Zytokininduktion nach *A. lwoffii* Exposition, wie in Kapitel 2.15.2 beschrieben, untersucht. Hierfür wurden die Zellen über einen Zeitraum von 4, 24, 48 und 72 Stunden mit einer festgelegten Konzentration von *A. lwoffii* (1×10^6 CFU/ml) stimuliert. Danach wurden die Kulturüberstände gewonnen und die Expression auf Protein-Ebene mittels ELISA analysiert. In den *in vitro* Versuchen wurde das aus gram-negativen Bakterien gewonnene LPS als Stimulans für die Positivkontrolle verwendet, welche die Zellen über den TLR4 aktiviert.

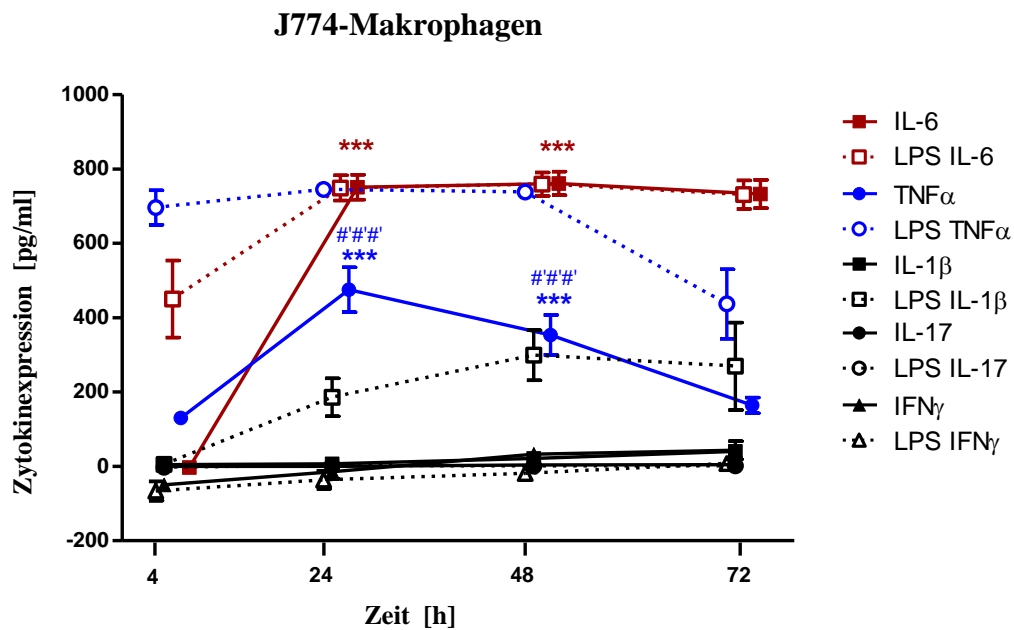


Abb. 19 Zeitabhängige Zytokinproduktion von J774-Zellen nach Stimulation mit *A. lwoffii*

Die murine Makrophagen-Zelllinie J774 wurde 4-72 h mit *A. lwoffii* (1×10^6 CFU/ml) stimuliert. Die IL-6 und TNF α Konzentrationen im Zellkultur-Überstand wurden mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die relative Konzentration gegenüber der mit 10 ng/ml LPS stimulierten Probe (#) und signifikante Unterschiede gegenüber der nicht-stimulierten Probe (*). Gezeigt sind Mittelwerte aus sechs unabhängigen Versuchen. Mittelwerte \pm S.E.M. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Abbildung 19 zeigt die Veränderungen des proinflammatorischen Zytokinprofils nach unterschiedlichen Stimulationszeitpunkten. Die IL-6 und TNF α Expression war in *A. lwoffii*-exponierten Zellen bereits nach 4 Stunden deutlich erhöht, wobei die maximale Expression erst nach 24 Stunden erreicht war und sich über den gesamten Zeitraum von 72 Stunden nur geringfügig veränderte. Das LPS bewirkte ebenfalls eine starke Induktion von IL-6 und TNF α bereits nach 4 Stunden. Die Messung von IL-1 β , IL-17A und IFN γ im Kulturüberstand ergab, dass *A. lwoffii* keinen Einfluss auf die Produktion dieser Zytokine hat, weder nach 4 Stunden noch nach 72 Stunden. Auch hier war kein Einfluss von LPS für IL-17A und IFN γ festzustellen, während IL-1 β nach LPS Stimulation verstärkt exprimiert wurde. Aus diesen Versuchen konnte geschlossen werden, dass die 24 Stunden Exposition von *A. lwoffii* einen Einfluss auf die Expression von IL-6 und TNF α bei Makrophagen hat. Da das Expressionslevel der Zytokine IL-1 β , IL-17A und IFN γ unterhalb der Nachweisgrenze lag, wurden diese für weitere Versuche vernachlässigt und bei folgenden Ergebnissen nur die Daten für IL-6 und TNF α gezeigt.

Zur Bestimmung der dosisabhängigen Zytokinexpression wurden die Makrophagen im nächsten Schritt mit aufsteigenden Konzentrationen von *A. lwoffii* ($1 \times 10^2 - 1 \times 10^8$ CFU/ml) stimuliert und nach 24 Stunden die Zytokin-Konzentration gemessen. Beide Zytokine (IL-6 und $\text{TNF}\alpha$) zeigten einen konzentrationsabhängigen Anstieg ihrer Expression nach *A. lwoffii* Stimulation, wobei Maximalwerte bei der Inkubationsdosis von 1×10^8 CFU/ml (Abb. 20) erreicht waren.

Zusammenfassend zeigten die Kinetikdaten der Zytokine, dass *A. lwoffii* in der Lage ist, bei optimalen Stimulationsbedingungen (Expositionsdauer- und Dosis), eine proinflammatorische Immunreaktion in Makrophagen (J774-Kulturzellen) auszulösen. Beide Zytokine, sowohl IL-6 als auch $\text{TNF}\alpha$, verhielten sich in ihrer Reaktivität sehr ähnlich und das Expressionslevel bei der Konzentration von 1×10^6 CFU/ml *A. lwoffii* für die Expositionsdauer von 24 Stunden stellte repräsentative Stimulationsbedingungen für die Induktion dar. Folglich wurden diese Stimulationsbedingungen für die Herstellung von Überständen im großen Maßstab genutzt, die in weiteren Untersuchungen (s. Kapitel 3.3) eingesetzt wurden.

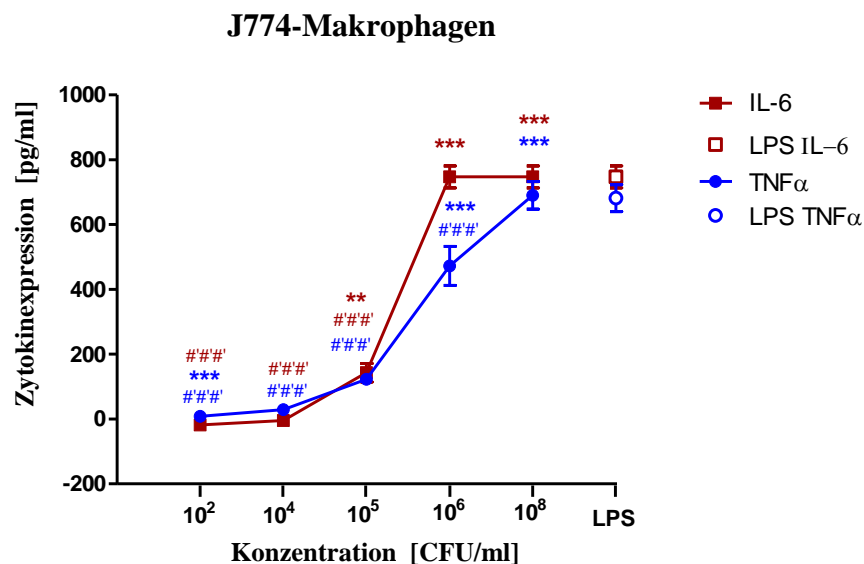


Abb. 20 Konzentrationsabhängige Zytokinproduktion von J774-Zellen nach Stimulation mit *A. lwoffii*

Die murine Makrophagen-Zelllinie J774 wurde 24 h mit aufsteigenden Konzentrationen an *A. lwoffii* ($1 \times 10^2 - 1 \times 10^8$ CFU/ml) stimuliert. Die IL-6 und $\text{TNF}\alpha$ Konzentrationen im Zellkultur-Überstand wurden mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die relative Konzentration gegenüber der mit 10 ng/ml LPS stimulierten Probe (#) und signifikante Unterschiede gegenüber der nicht-stimulierten Probe (*). Gezeigt sind Mittelwerte aus sechs unabhängigen Versuchen. Mittelwerte \pm S.E.M. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3.2.3 Induktion proinflammatorischer Zytokine infolge einer Behandlung mit *A. lwoffii* in primären Peritonealmakrophagen

Da es sich bei der murinen J774 Makrophagen-Zelllinie um eine Tumorzelllinie handelt, die nicht unbedingt vergleichbare Reaktionen auf mikrobielle Stimuli zeigen wie primäre Zellen, wurden im folgenden Versuch primäre Makrophagen aus der Peritonealhöhle unbehandelter Mäuse isoliert und mit *A. lwoffii* stimuliert. Wie bei den oben aufgeführten Kinetikversuchen wurden die primären Zellen ebenfalls mit aufsteigenden Konzentrationen von *A. lwoffii* ($1 \times 10^4 - 1 \times 10^6$ CFU/ml) für 24 Stunden stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Überstände abgenommen und die Konzentration der Zytokine IL-6 und TNF α mittels ELISA bestimmt. Auch hier zeigte sich, dass *A. lwoffii* in der Lage ist, primäre Makrophagen unter Kulturbedingungen direkt zu stimulieren. Beide Zytokine weisen einen vergleichbaren dosisabhängigen Anstieg der Zytokinproduktion nach Stimulation mit *A. lwoffii* auf, wobei Maximalwerte bei der Höchstkonzentration (1×10^6 CFU/ml) erreicht wurden (Abb. 21). Die Ergebnisse der Expression von IL-6 und TNF α decken sich mit den Proteindaten aus den Kulturüberständen der J774 Makrophagen-Zelllinie (s. 3.2.2).

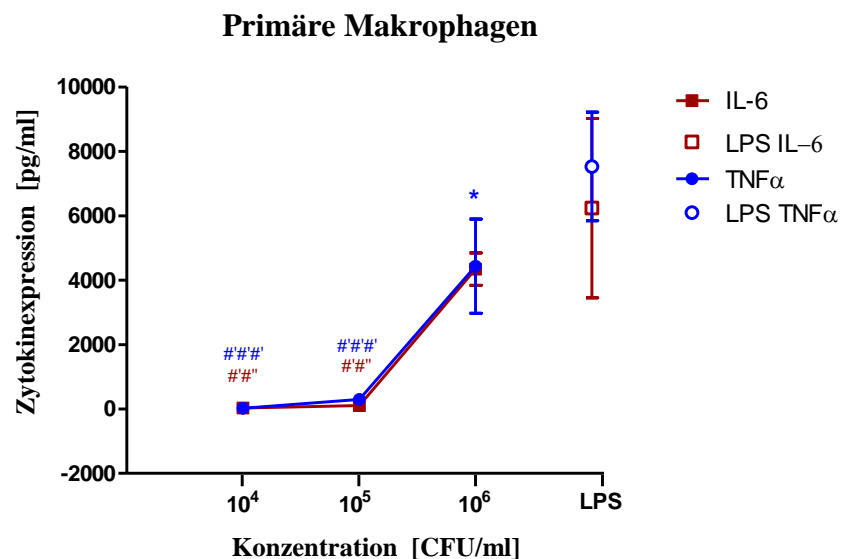


Abb. 21 Konzentrationsabhängige Zytokinproduktion von primären Peritonealmakrophagen nach Stimulation mit *A. lwoffii*

Primäre Peritonealmakrophagen aus weiblichen Balb/c-Mäusen wurden 24 h mit aufsteigenden Konzentrationen an *A. lwoffii* ($1 \times 10^4 - 1 \times 10^6$ CFU/ml) stimuliert. Die IL-6 und TNF α Konzentrationen im Zellkultur-Überstand wurden mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die relative Konzentration gegenüber der mit 10 ng/ml LPS stimulierten Probe (#) und signifikante Unterschiede gegenüber der nicht-stimulierten Probe (*). Gezeigt sind Mittelwerte aus sechs unabhängigen Versuchen. Mittelwerte \pm S.E.M. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3.2.4 Induktion proinflammatorischer Zytokine infolge einer Behandlung mit Cholera Toxin in Makrophagen-Kulturzellen

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Etablierung eines *in vitro* Assays, mit dem der direkte Einfluss der Cholera Toxin Exposition auf Zellen des innate Immunsystems untersucht und die inflammatorische Reaktion erfasst werden sollte. Aufgrund der zytotoxischen Eigenschaften des Wildtyp-Proteins (CT) und um dem Einfluss von Cholera Toxin auf Makrophagen nachzugehen, wurden zwei Aspekte in diesem Versuch untersucht. Zum einen wurde analysiert, ob Cholera Toxin alleine die Expression der untersuchten Zytokine in Makrophagen-Kulturzellen induzieren kann, zum anderen sollte analysiert werden, ob Cholera Toxin einen zellschädigenden Einfluss auf die entsprechenden Zellen hat. Die Makrophagen-Zelllinie J774 wurde dafür für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen des CT sowie des CTB stimuliert und die Ergebnisse in einer Zytokin-Kinetik analysiert. Die Stimulation wurde durch zusätzliche Gabe von LPS (Positivkontrolle) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der J774 Makrophagen-Kulturzellen mit CTB dosisabhängig ist und zur Induktion proinflammatorischer Zytokine führt. Ein deutlicher Anstieg der IL-6 und TNF α Expression konnte bei 2 μ g/ml festgestellt werden (Abb. 22). Im Gegensatz zu CTB hat die Behandlung mit CT keine stimulierende Wirkung in Makrophagen, die zur Freisetzung der proinflammatorischer Mediatoren IL-6 und TNF α führt. Ferner weisen beide Cholera Toxin Subtypen (CT und CTB) *in vitro* keine zellschädigende Wirkung in Makrophagen-Kulturzellen auf.

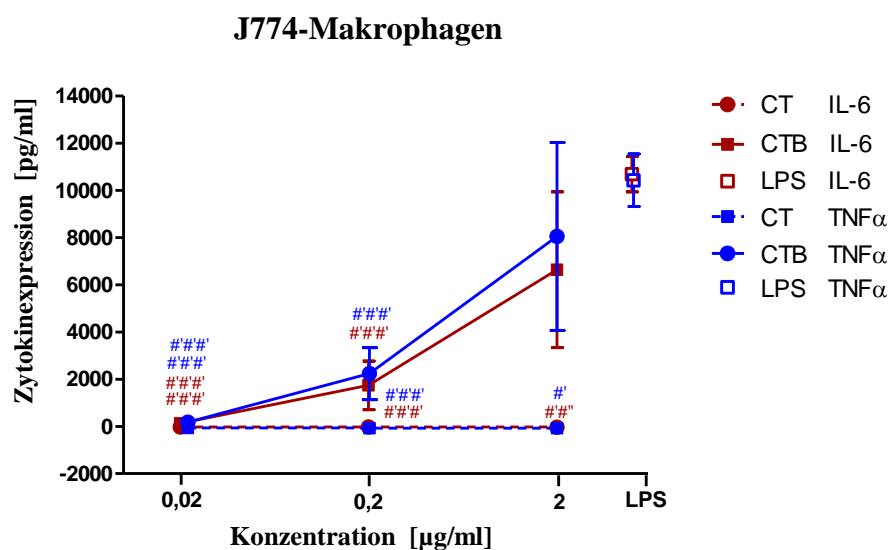


Abb. 22 Konzentrationsabhängige Zytokinproduktion von J774-Zellen nach Stimulation mit Cholera Toxin

Die murine Makrophagen-Zelllinie J774 wurde 24 h mit aufsteigenden Konzentrationen (0,02 - 2 µg/ml) an Cholera Toxin (CT) und Cholera Toxin B-Untereinheit (CTB) stimuliert. Die IL-6 und TNFα Konzentrationen im Zellkultur-Überstand wurden mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die relative Konzentration gegenüber der mit 10 ng/ml LPS stimulierten Probe (#) und signifikante Unterschiede gegenüber der nicht-stimulierten Probe (*). Gezeigt sind Mittelwerte aus sechs unabhängigen Versuchen. Mittelwerte ± S.E.M. (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

3.3 Stimulation von adaptiven Immunzellen durch mikrobiell behandelte Kulturüberstände

Die Ergebnisse der vorhergehenden Versuche der *A. lwoffii* Stimulation von Makrophagen zeigten die Induktion eines proinflammatorischen Zytokinprofils. Im Rahmen dieser Versuche wurde belegt, dass *A. lwoffii* auch *in vitro* eine inflammatorische Reaktion auslöst. Diese Ergebnisse waren entscheidend und dienten als Grundlage für die nächsten Experimente, in denen deren eventuelle molekulare Ursachen untersucht werden sollten. Um genauere Daten über die proinflammatorische Wirkungsweise der *A. lwoffii*-induzierten Makrophagenzytokine IL-6 und TNFα zu erhalten und um die Bedeutung der CD4⁺ T-Zellen, die Mittelpunkt allergischer Erkrankungen sind, auf molekularer Ebene isoliert zu betrachten, haben wir folgende weiterführende Untersuchungen durchgeführt, welche die Erkenntnisse aus dem Tiermodell in ein *in vitro* Modell übertragen und die Faktoren für die Differenzierung von naiven T-Zellen *in vitro* beeinflussen. Dazu wurde ein *in vitro* Zellkultursystem etabliert, das ausschließlich CD4⁺ T-Zellen anhand des Zytokinprofils

charakterisiert. Naive $CD4^+$ T-Zellen aus der Milz unbehandelter Mäuse wurden dazu mit *A. lwoffii*-behandelten Makrophagen-Kulturüberständen (s. Kapitel 3.2) kultiviert und die Expression charakteristischer inflammatorischer Zytokine quantifiziert. Da dem Cholera Toxin ebenfalls ein proinflammatorischer Einfluss auf murine Makrophagen zugeschrieben werden konnte (s. Kapitel 3.2.4), wurde auch untersucht, ob Cholera Toxin behandelte Makrophagen-Kulturüberstände einen Einfluss auf die Expression der entsprechenden Zytokine in naiven $CD4^+$ T-Zellen haben.

3.3.1 Analyse der Aufreinigungseffizienz von naiven $CD4^+/62L^+$ T-Zellen

Die Analysen des untersuchten *in vitro* T-Zellsystems wurden an Primärzellen vorgenommen. Aus den Milzen unbehandelter BALB/c-Mäuse wurden mononukleäre Zellen gewonnen aus denen hochrein $CD4^+/62L^+$ T-Zellen mittels MACS isoliert wurden. Die Effizienz der Aufreinigung wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dafür wurden die Zellen mit den entsprechenden Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD45, CD4 und CD62L angefärbt (Abb. 23).

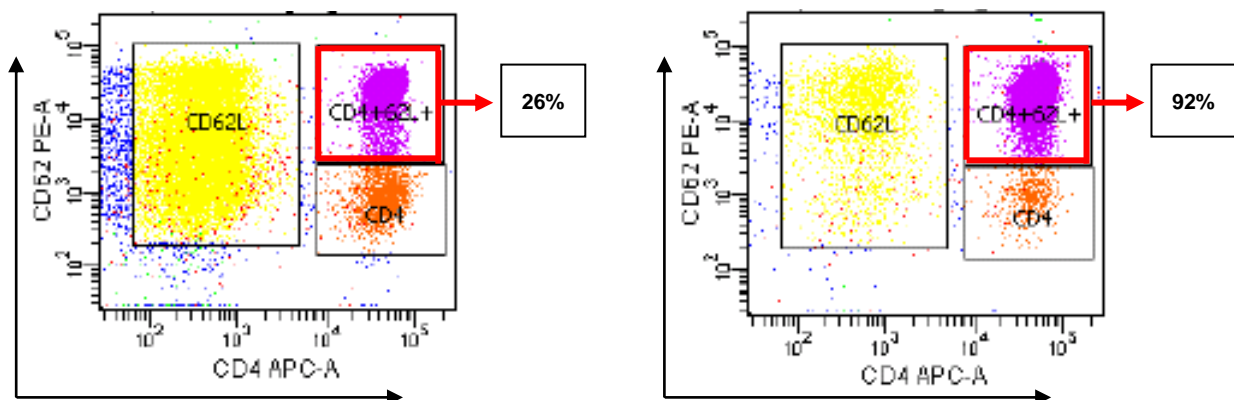


Abb. 23 Analyse der Aufreinigungseffizienz von $CD4^+/62L^+$ T-Zellen mittels FACS

Die aufgereinigten Zellen wurden mit $\alpha CD45$ -FITC, $\alpha CD4$ -APC, $\alpha CD62$ -PE gefärbt und die Reinheit mittels FACS bestimmt.

Der Anteil der CD4⁺/62L⁺ T-Zellen betrug vor der MACS Aufreinigung 26 %. Nach der Aufreinigung ließ sich im Durchflusszytometer eine Reinheit von 92 % CD4⁺/62L⁺ T-Zellen nachweisen. Die Zellen konnten nun zur weiteren Analyse für die *in vitro* Kultivierung (s. 3.3.2) verwendet werden.

3.3.2 Zytokinproduktion in CD4⁺/62L⁺ T-Zellen nach Behandlung mit *A. lwoffii*-stimulierten Kulturüberständen

Zur Untersuchung des Einflusses der *A. lwoffii*-induzierten Makrophagenzytokine auf naive CD4⁺/62L⁺ T-Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *in vitro* Zellkulturmodell, wie unter Kapitel 2.15.4 beschrieben, für die Subkultivierung der Zellen etabliert. Dazu wurden die aufgereinigten CD4⁺/62L⁺ T-Zellen aus der Milz mit dem Überstand der J774 Makrophagen-Kultur, die für 24 h mit *A. lwoffii* (1 x 10⁶ CFU/ml) stimuliert wurde, für 5 Tage kultiviert. Die J774 Makrophagen-Überstände wurden dabei im Verhältnis 1:10 und 1:2 eingesetzt. Parallel dazu wurde ein Teil der Zellen mit Medium als Kontrolle inkubiert. Durch Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 wurde in diesem Experiment eine gleichzeitige Aktivierung der T-Zellen durch Rezeptorstimulation simuliert. Im Anschluss wurden die Zellen gewaschen, in eine frische 96-Well-Platte ausgesät und erneut anti-CD3 stimuliert. Zur Untersuchung der Zytokinproduktion wurden die Überstände der CD4⁺ T-Zellen nach 18 h abgenommen und die Konzentration der inflammatorischen Zytokine IFN γ , IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A und IL-1 β mittels CBA bestimmt (Abb. 24).

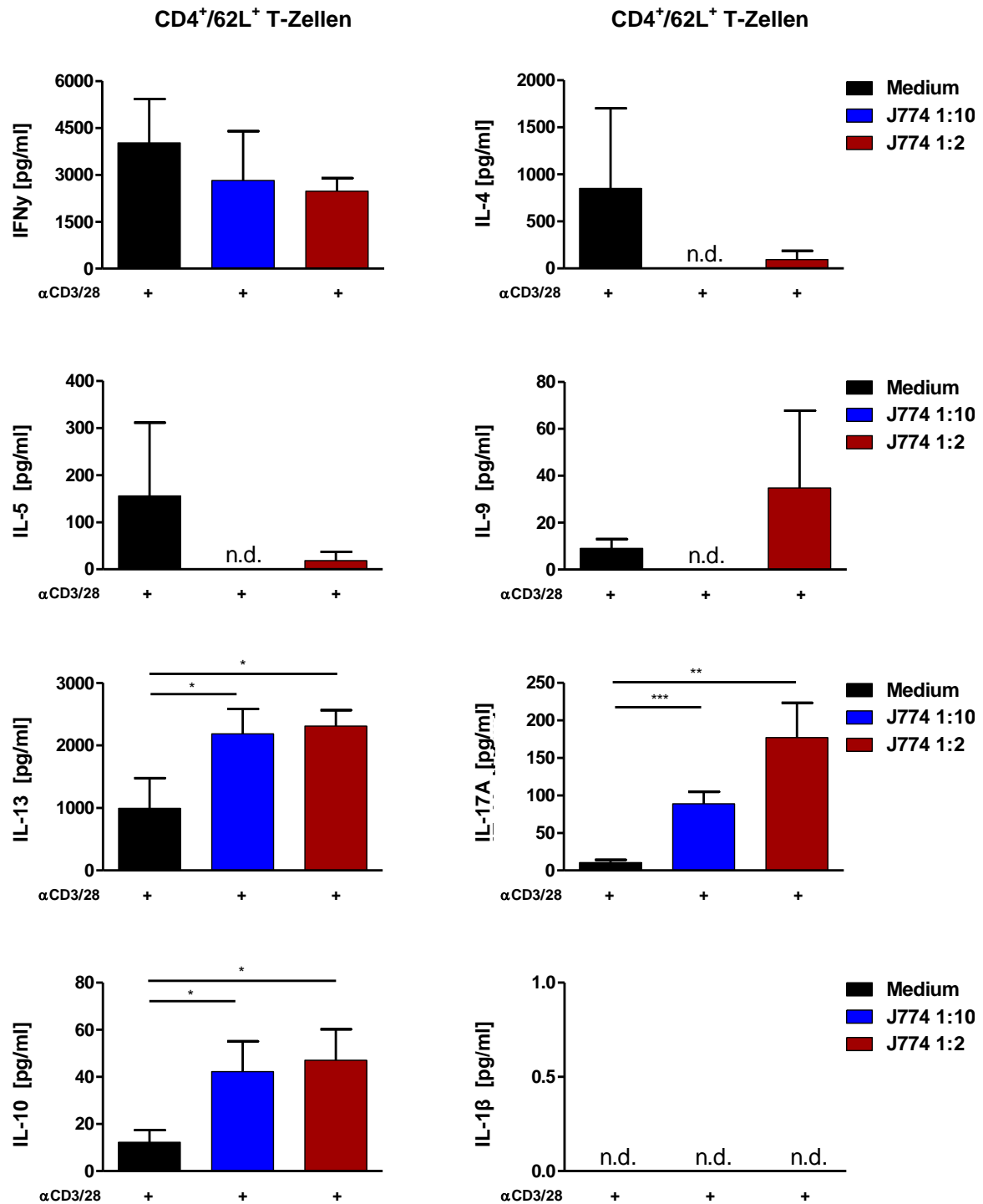


Abb. 24 Zytokinprofil von naiven CD4⁺/CD62L⁺ T-Zellen nach *in vitro* Kultivierung mit *A. Iwoffii*-behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen

Naive CD4⁺/CD62L⁺ T-Zellen wurden aus MNCs der Milz von weiblichen Balb/c-Mäusen aufgereinigt und mit αCD3/28 stimuliert. Anschließend erfolgte die *in vitro* Kultivierung für 5 Tage mit *A. Iwoffii*-behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen [1×10^6 CFU/ml] im Verhältnis 1:10 und 1:2. Am Tag 5 wurden die Zellen gewaschen, erneut in Kultur genommen und mit αCD3 stimuliert. Nach weiteren 18 h wurde der Überstand gewonnen und die Freisetzung der Zytokine mittels CBA bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte aus fünf unabhängigen Versuchen (n=5). Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001). n.d.: nicht detektierbar.

Wie in Abbildung 24 gezeigt, konnte mit dem *A. lwoffii*-behandelten Makrophagen-Überstand ein signifikanter Konzentrationsanstieg der Expression von IL-17A, IL-13 und IL-10 in naiven CD4⁺ T-Zellen erreicht werden. Für IL-17A und IL-10 wurde sogar ein konzentrationsabhängiger Anstieg in der Freisetzung beobachtet. Im Vergleich dazu wurden in den Mediumkontrollen nur geringe Konzentrationen der entsprechenden Zytokine induziert. Für IL-9 konnte ebenfalls ein Konzentrationsanstieg detektiert werden, jedoch nur bei Behandlung der höheren Konzentration des Makrophagen-Überstands (1:2) mit nicht-signifikantem Unterschied zur Mediumkontrolle. Im Fall von IFN γ , IL-4 und IL-5 war lediglich ein geringer Rückgang der Konzentration nachweisbar und für IL-1 β dagegen gar keine Expression im Zellkultur-Überstand messbar. Aus den Ergebnissen dieses Versuchsansatzes kann daher geschlussfolgert werden, dass die Kultivierung der naiven CD4⁺ T-Zellen mit Überständen der *A. lwoffii*-stimulierten Makrophagen, die Expression der Zytokine IL-17A, IL-13 und IL-10 signifikant induzieren. Daher lag der Fokus bei folgenden Versuchen im Rahmen dieser Versuchsreihe vorrangig auf der Expression der Zytokine IL-17A, IL-13 und IL-10 sowohl auf Protein als auch auf mRNA Ebene.

3.3.3 Zytokinproduktion in CD4⁺/62L⁺ T-Zellen nach Behandlung mit *A. lwoffii*-stimulierten Primärkultur-Überständen

Weiterführend wurde analysiert, inwieweit eine Veränderung oder aber vergleichbare Reaktion mit Kulturüberständen der primären Peritonealmakrophagen induziert wird, da murine Makrophagen-Kulturzellen (J774) nicht unbedingt identische Reaktionen zeigen wie primäre Zellen. Dazu wurden die Überstände der *A. lwoffii*-exponierten Peritonealmakrophagen (1×10^6 CFU/ml für 24 h) mit naiven CD4⁺/62L⁺ T-Zellen *in vitro* nach dem oben beschriebenen Behandlungsprotokoll (s. 3.3.2) kultiviert. Die Überstände der Peritonealmakrophagen wurden dabei im Verhältnis von 1:10 und 1:2 eingesetzt und die Konzentration der Zytokine, IL-17A, IL-13 und IL-10 mittels CBA bestimmt. Auch hier zeigte sich, dass der *A. lwoffii*-stimulierte Makrophagen-Überstand einen signifikanten Anstieg der Zytokine IL-17A, IL-13 und IL-10 in naiven CD4⁺ T-Zellen induziert (Abb. 25). Für die drei Zytokine konnte ein vergleichbarer, dosisabhängiger Anstieg der Zytokinproduktion wie zuvor mit der Behandlung der Makrophagen-Kulturzellen (J774) beobachtet werden.

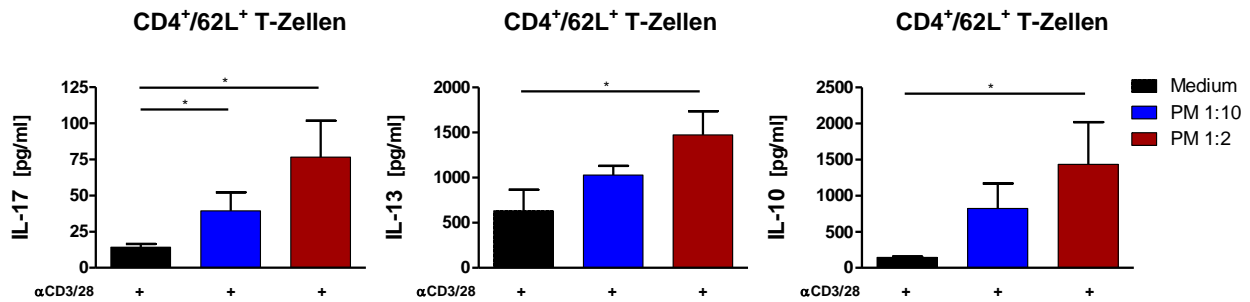


Abb. 25 Zytokinprofil von naiven CD4⁺/CD62L⁺ T-Zellen nach *in vitro* Kultivierung mit *A. lwoffii*-behandelten Primärkultur-Überständen

Naive CD4⁺/CD62L⁺ T-Zellen wurden aus MNCs der Milz von weiblichen Balb/c-Mäusen aufgereinigt und mit αCD3/28 stimuliert. Anschließend erfolgte die *in vitro* Kultivierung für 5 Tage mit *A. lwoffii*-behandelten Primärkultur-Überständen [1 x 10⁶ CFU/ml] im Verhältnis 1:10 und 1:2. An Tag 5 wurden die Zellen gewaschen, erneut in Kultur genommen und mit αCD3 stimuliert. Nach weiteren 18 h wurde der Überstand gewonnen und die Freisetzung der Zytokine mittels CBA bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte aus fünf unabhängigen Versuchen (n=5). Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

3.3.4 Zytokinproduktion in CD4⁺/62L⁺ T-Zellen nach Behandlung mit Cholera Toxin stimulierten Kulturüberständen

Als nächstes wurde der Einfluss der Cholera Toxin exponierten Makrophagen-Überstände auf naive CD4⁺/62L⁺ T-Zellen *in vitro* untersucht. Dazu wurden die Überstände der Makrophagen-Kultur J774, die sowohl mit CT als auch mit CTB stimuliert wurden (24 h, 2 µg/ml) eingesetzt. Auch hier erfolgte die *in vitro* Kultivierung der CD4⁺/62L⁺ T-Zellen nach dem oben beschriebenen Behandlungsprotokoll (s. 3.3.2) und die Messung der Zytokinproduktion mittels CBA. Für IL-17A konnte in CD4⁺/62L⁺ T-Zellen gezeigt werden, dass ein signifikanter Anstieg der Zytokinproduktion mit CT behandeltem Makrophagen-Überstand erreicht wurde (Abb. 26). Die Stimulation mit dem Überstand der CTB stimulierten Makrophagenzellen führte allerdings im Gegensatz dazu nur zu einer geringen Induktion der IL-17A Zytokinexpression. Die Freisetzung von IL-13 konnte ebenfalls durch Behandlung mit Überständen der beiden Cholera Toxin Subtypen (CT und CTB) festgestellt werden. Hier zeigte sich jedoch, dass die Induktion des IL-13 nur mit der geringeren Konzentration des Überstandes (1:10) erreicht werden konnte. Ferner wurde ein Anstieg der IL-10 Produktion ebenfalls durch Behandlung mit Überständen der beiden Cholera Toxin Subtypen (CT und CTB) detektiert, wobei dieser keine signifikante Änderung in der Zytokinexpression erreichte. Somit konnte bei dieser Versuchsreihe keine dosisabhängige Induktion der untersuchten Zytokine durch Behandlung mit unterschiedlichen

Konzentrationen der Cholera Toxin (CT und CTB) stimulierten Makrophagen-Überstände beobachtet werden.

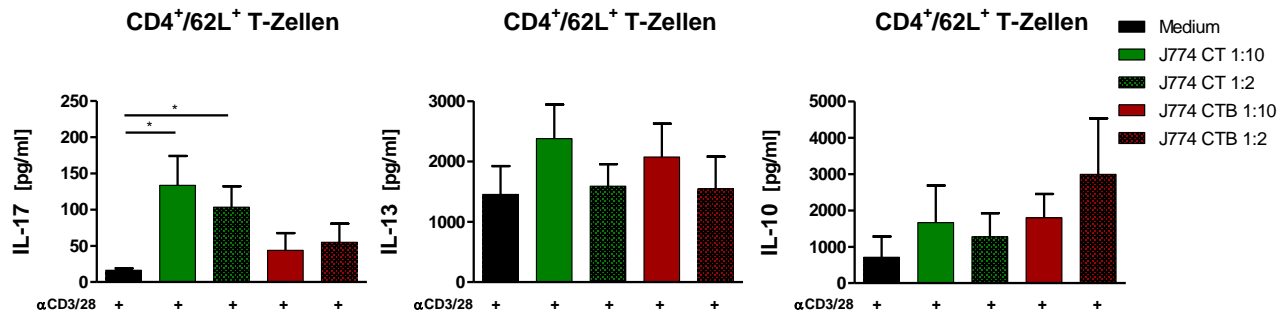


Abb. 26 Zytokinprofil von naiven CD4⁺/CD62L⁺ T-Zellen nach *in vitro* Kultivierung mit Cholera Toxin behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen

Naive CD4⁺/CD62L⁺ T-Zellen wurden aus MNCs der Milz von weiblichen Balb/c-Mäusen aufgereinigt und mit α CD3/28 stimuliert. Anschließend erfolgte die *in vitro* Kultivierung für 5 Tage mit Cholera Toxin (CT) und Cholera Toxin B-Untereinheit (CTB)-behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen [2 μ g/ml] im Verhältnis 1:10 und 1:2. An Tag 5 wurden die Zellen gewaschen, erneut in Kultur genommen und mit α CD3 stimuliert. Nach weiteren 18 h wurde der Überstand gewonnen und die Freisetzung der Zytokine mittels CBA bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte aus fünf unabhängigen Versuchen (n=5). Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

3.3.5 Zytokinproduktion von IL-17A, IL-13 und IL-10 in unstimulierten CD4⁺/62L⁺ T-Zellen

In diesem weiterführenden Experiment wurde zur Kontrolle der T-Zell-Aktivierung durch Rezeptorstimulation untersucht, inwieweit eine Aktivierung der unreifen CD4⁺/62L⁺ T-Zellen jedoch ohne gleichzeitige T-Zellspezifische Stimulation der T-Zellen mit anti-CD3/anti-CD28 die Induktion der Zytokinproduktion bewirken kann. Für diese Untersuchung wurden naive CD4⁺/62L⁺ T-Zellen erneut, wie unter 3.3.2 beschrieben, während der Inkubation mit Überständen der *A. lwoffii*-exponierten Makrophagen-Kulturzellen (J774) ohne Stimulation der T-Zellen mit anti-CD3/anti-CD28 kultiviert. Im Anschluss wurde die Zytokinproduktion der unstimulierten CD4⁺/62L⁺ T-Zellen mittels CBA ermittelt. Die unstimulierten CD4⁺/62L⁺ T-Zellen zeigten in Abwesenheit von anti-CD3/anti-CD28 nur eine stark reduzierte Zytokinproduktion von IL-17A, IL-13 und IL-10 (Abb. 27). Ein geringerer, nicht signifikanter Anstieg der Zytokin-Konzentrationen konnte nach Ko-Inkubation mit der höheren Konzentration des Makrophagen-Überstands (1:2) nachgewiesen werden.

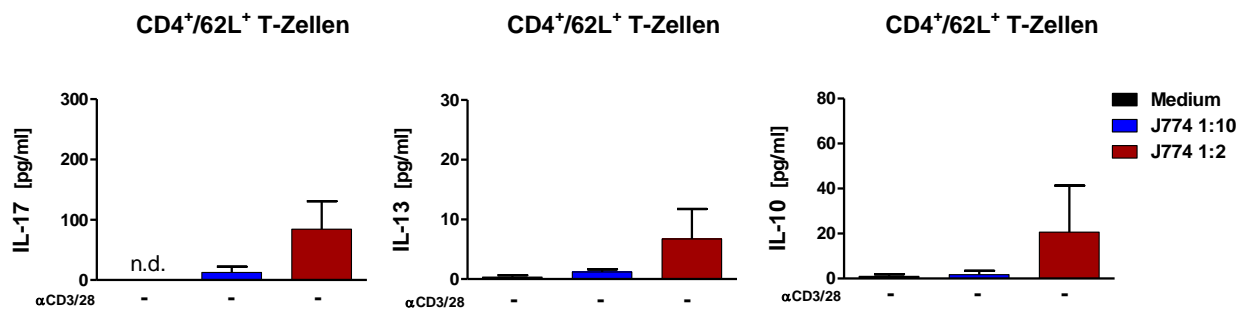


Abb. 27 Zytokinprofil von naiven CD4⁺/CD62L⁺ T-Zellen nach *in vitro* Kultivierung mit *A. Iwoffii*-behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen ohne αCD3/28 Stimulation

Naive CD4⁺/CD62L⁺ T-Zellen wurden aus MNCs der Milz von weiblichen Balb/c-Mäusen aufgereinigt. Anschließend erfolgte ohne αCD3/28 Stimulation die *in vitro* Kultivierung für 5 Tage mit *A. Iwoffii*-behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen [1 x 10⁶ CFU/ml] im Verhältnis 1:10 und 1:2. An Tag 5 wurden die Zellen gewaschen und erneut in Kultur genommen. Nach weiteren 18 h wurde der Überstand gewonnen und die Freisetzung der Zytokine mittels CBA bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (n=3). Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001). n.d.: nicht detektierbar.

3.3.6 mRNA-Expression von IL-17A, IL-13 und IL-10 in CD4⁺/62L⁺ T-Zellen

Im folgenden Versuch wurde analog zur Analyse der Zytokinproduktion der CD4⁺/62L⁺ T-Zellen die mRNA Konzentration der Zytokine IL-17A, IL-13 und IL-10 mittels quantitativer PCR bestimmt. Die CD4⁺ T-Zellen wurden, wie unter 3.3.2 beschrieben, mit unterschiedlich stimulierten Überständen der J774 Makrophagen-Kulturzellen (*A. Iwoffii*- und Cholera Toxin- exponiert) bzw. mit Überständen der primären Peritonealmakrophagen (*A. Iwoffii*-exponiert) kultiviert. Nach dem Mediumwechsel an Tag 5 des *in vitro* Protokolls (s. Kapitel 2.15.4) wurden die CD4⁺ T-Zellen geerntet, da die maximale mRNA-Expression für IL-17A, IL-13 und IL-10 bereits nach 6 Stunden erreicht war. Die mRNA Expression wurde jeweils relativ zur Negativ-Kontrollgruppe (Medium) angegeben. Die Stimulation mit dem Überstand der J774 Makrophagen-Kulturzellen (*A. Iwoffii*-exponiert) führte zu einem signifikanten, vielfachen Anstieg der mRNA Expression von IL-17A und IL-10 in CD4⁺ T-Zellen (Abb. 28). Sowohl IL-17A als auch IL-10 zeigten gegenüber der Mediumkontrolle eine konzentrationsabhängige Induktion ihrer Expression. Für das Zytokin IL-13 war kein Expressionsunterschied in den Ansätzen detektierbar.

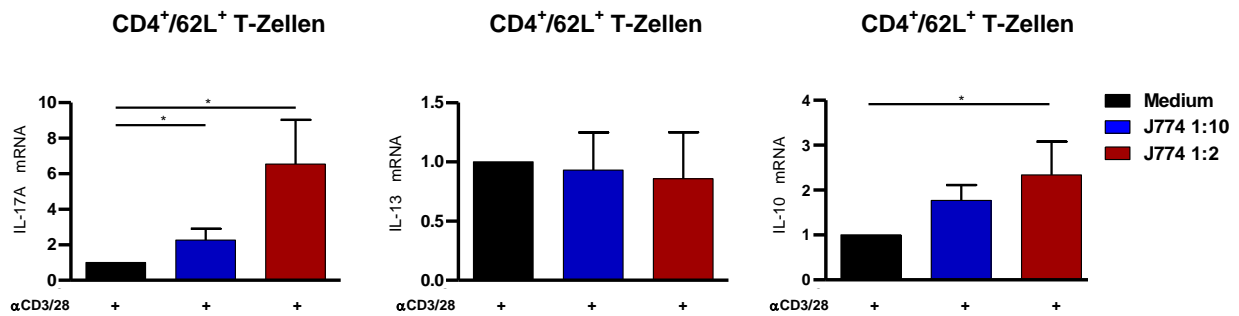


Abb. 28 Genexpression von IL-17A, IL-13 und IL-10 in naiven CD4⁺/CD62L⁺ T-Zellen nach *in vitro* Kultivierung mit *A. lwoffii*-behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen

Naive CD4⁺/CD62L⁺ T-Zellen wurden aus MNCs der Milz von weiblichen Balb/c-Mäusen aufgereinigt und mit α CD3/28 stimuliert. Anschließend erfolgte die *in vitro* Kultivierung für 5 Tage mit *A. lwoffii*-behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen [1×10^6 CFU/ml] im Verhältnis 1:10 und 1:2. Am Tag 5 wurden die Zellen gewaschen, erneut in Kultur genommen und mit α CD3 stimuliert. Nach weiteren 6 h wurden die Zellen geerntet. Die Expression der angezeigten Gene wurde im Verhältnis zu dem *Housekeeping*-Gen GAPDH mittels quantitativer real-time PCR bestimmt. Die Expressionsänderung ist relativ zur unbehandelten Mediumkontrolle dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen (n=4). Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

Die Kultivierung mit *A. lwoffii*-behandelten Primärkultur-Überständen der Makophagen führte in CD4⁺ T-Zellen ebenso zu signifikanten und konzentrationsabhängigen Unterschieden relativ zur Negativ-Kontrollgruppe (Medium) (Abb. 29). Der deutlichste Anstieg der mRNA Produktion war für IL-17A zu beobachten, wohingegen für IL-10 ein mittlerer Expressionsanstieg detektiert werden konnte. Damit unterschied sich die IL-10 mRNA Produktion nicht signifikant von der Negativ-Kontrollgruppe. Es zeigte sich aber eine Tendenz in Richtung einer stärkeren IL-10 Expression durch *A. lwoffii*-behandelte Primärkultur-Überstände. Auch hier konnte die IL-13 mRNA nicht nachgewiesen werden. Die Stimulation mit dem Primärkultur-Überstand der Makrophagen reduzierte sogar die IL-13 mRNA Konzentration tendenziell im Vergleich zur Negativ-Kontrollgruppe (Medium) (Abb. 29).

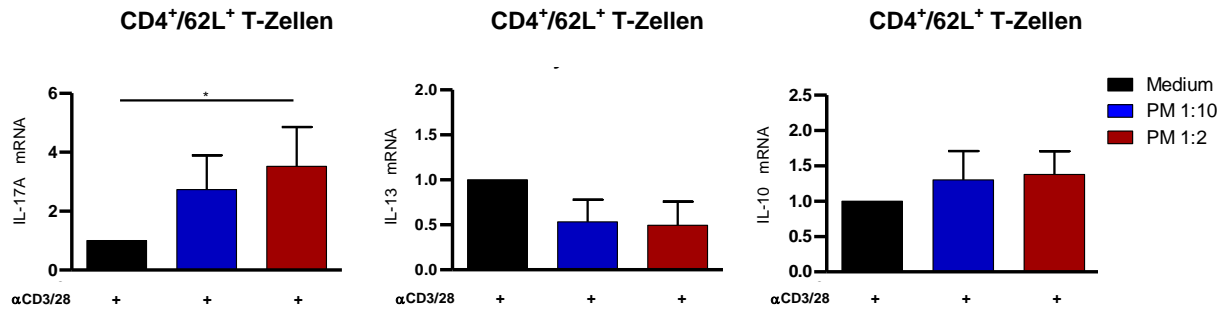


Abb. 29 Genexpression von IL-17A, IL-13 und IL-10 in naiven CD4⁺/CD62L⁺ T-Zellen nach *in vitro* Kultivierung mit *A. lwoffii*-behandelten Primärkultur-Überständen

Naive CD4⁺/CD62L⁺ T-Zellen wurden aus MNCs der Milz von weiblichen Balb/c-Mäusen aufgereinigt und mit α CD3/28 stimuliert. Anschließend erfolgte die *in vitro* Kultivierung für 5 Tage mit *A. lwoffii*-behandelten Primärkultur-Überständen [1×10^6 CFU/ml] im Verhältnis 1:10 und 1:2. An Tag 5 wurden die Zellen gewaschen, erneut in Kultur genommen und mit α CD3 stimuliert. Nach weiteren 6 h wurden die Zellen geerntet. Die Expression der angezeigten Gene wurde im Verhältnis zu dem *Housekeeping*-Gen GAPDH mittels quantitativer real-time PCR bestimmt. Die Expressionsänderung ist relativ zur unbehandelten Mediumkontrolle dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen (n=4). Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

Bezüglich der IL-17A und IL-10 mRNA Konzentrationen ergaben sich ähnliche Verhältnisse in CD4⁺ T-Zellen, die mit Überständen des CT und CTB behandelten J774-Makrophagen kultiviert wurden (Abb. 30). Doch konnte hier die signifikante mRNA Expression von IL-17A auch nur mit dem CT stimulierten Makrophagen-Überstand detektiert werden. Für die IL-10 mRNA zeigte sich relativ zur Negativkontrolle (Medium) ein starker Expressionsanstieg mit beiden Cholera Toxin (CT und CTB) behandelten Überständen lediglich ohne das ein Signifikanzniveau erreicht wurde. Allerdings zeigte sich kein Einfluss von Cholera Toxin (CT und CTB) stimulierten Makrophagen-Überständen auf die mRNA-Expression von IL-13 in CD4⁺ T-Zellen.

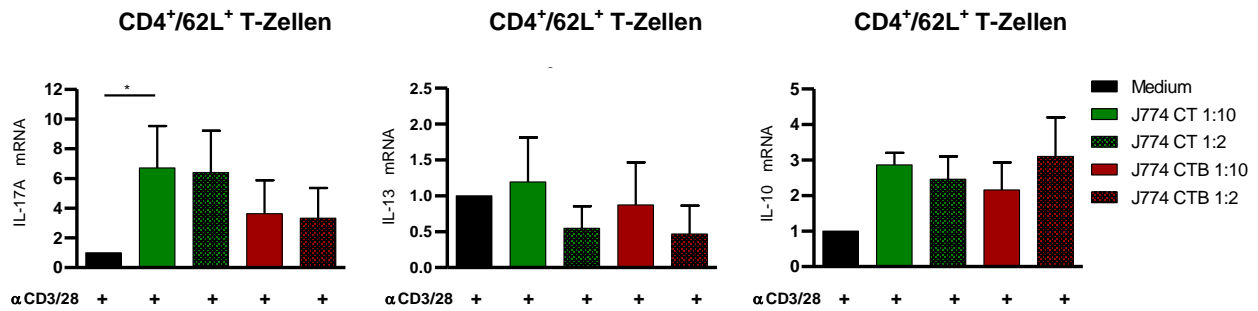


Abb. 30 Genexpression von IL-17A, IL-13 und IL-10 in naiven CD4⁺/CD62L⁺ T-Zellen nach *in vitro* Kultivierung mit Cholera Toxin behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen

Naive CD4⁺/CD62L⁺ T-Zellen wurden aus MNCs der Milz von weiblichen Balb/c-Mäusen aufgereinigt und mit α CD3/28 stimuliert. Anschließend erfolgte die *in vitro* Kultivierung für 5 Tage mit Cholera Toxin (CT) und Cholera Toxin B-Untereinheit (CTB) behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen [2 μ g/ml] im Verhältnis 1:10 und 1:2. An Tag 5 wurden die Zellen gewaschen, erneut in Kultur genommen und mit α CD3 stimuliert. Nach weiteren 6 h wurden die Zellen geerntet. Die Expression der angezeigten Gene wurde im Verhältnis zu dem *Housekeeping*-Gen GAPDH mittels quantitativer real-time PCR bestimmt. Die Expressionsänderung ist relativ zur unbehandelten Mediumkontrolle dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen (n=4). Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

3.3.7 Einfluss der rekombinanten Proteine IL-6, TGF β und TNF α auf die Expression von IL-17A, IL-13 und IL-10 in CD4⁺/62L⁺ T-Zellen

Zur Analyse des Einflusses und der Wirkungsweise der *A. lwoffii*-induzierten proinflammatorischen Makrophagenzytokine IL-6 und TNF α auf die Produktion von T-Zell-Zytokinen in CD4⁺/62L⁺ T-Zellen wurde untersucht, ob zellspezifische Stimulantien wie rekombinante Proteine (rhIL-6, rhTGF β und rhTNF α) alleine die Expression der T-Zell-Zytokine IL-17A, IL-13 und IL-10 induzieren. Zur Durchführung dieser Analyse wurden naive CD4⁺/62L⁺ T-Zellen mit den rekombinanten Proteinen rhIL-6, rhTGF β und rhTNF α für 5 Tage kultiviert (s. Kapitel 2.15.4). Da zur Induktion von IL-17A in T-Zellen die simultane Wirkung von IL-6 und TGF β entscheidend ist, wurden einige Ansätze der CD4⁺/62L⁺ T-Zellen in Kombination der rekombinanten Proteine rhIL-6 und rhTGF β kultiviert. Um die Veränderung der Expressionslevel der gemessenen Zytokine zu vergleichen, wurden zur Kontrolle CD4⁺/62L⁺ T-Zellen ohne Stimulantien (Mediumkontrolle) kultiviert. Im Anschluss erfolgte die Analyse der Zytokinexpression von IL-17A, IL-13 und IL-10 mittels CBA.

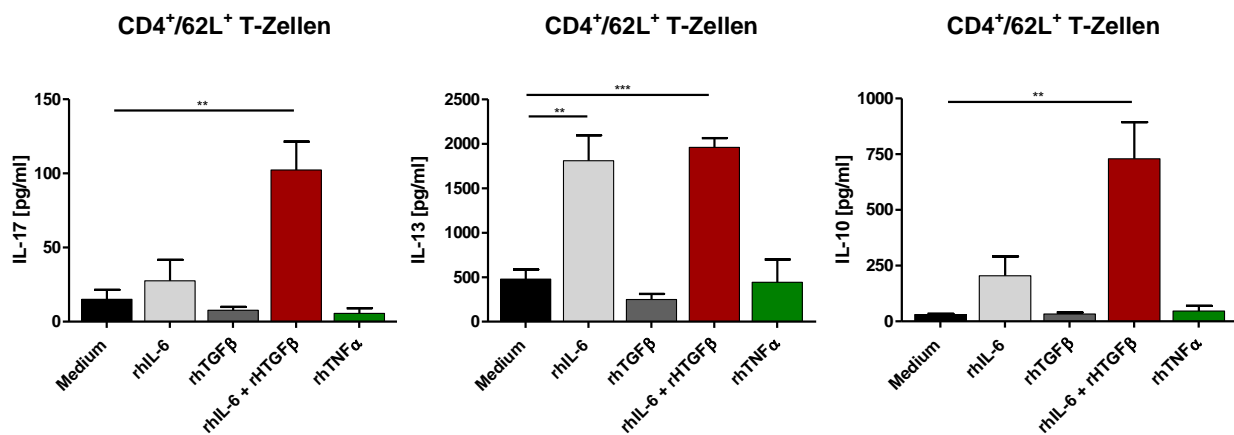


Abb. 31 Zytokinprofil von naiven CD4⁺/CD62L⁺ T-Zellen nach *in vitro* Stimulation mit rekombinanten Proteinen

Naive CD4⁺/CD62L⁺ T-Zellen wurden aus MNCs der Milz von weiblichen Balb/c-Mäusen aufgereinigt und mit αCD3/28 stimuliert. Anschließend erfolgte die *in vitro* Stimulation für 5 Tage mit rekombinanten Proteinen rhIL-6 (50 ng/ml), rhTGFβ (10 ng/ml) und rhTNFα (100 ng/ml). An Tag 5 wurden die Zellen gewaschen, erneut in Kultur genommen und mit αCD3 stimuliert. Nach weiteren 18 h wurde der Überstand gewonnen und die Freisetzung der Zytokine mittels CBA bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte aus fünf unabhängigen Versuchen (n=5). Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

Wie in Abb. 31 gezeigt, wurde die Zytokinexpression von IL-17A in naiven CD4⁺/CD62L⁺ T-Zellen durch Ko-Stimulation mit rekombinanten IL-6 und TGFβ signifikant erhöht. Durch alleinige Behandlung mit rekombinanten IL-6 oder aber mit rekombinanten TGFβ konnte im Vergleich zur Negativkontrolle (Medium) kein deutlicher Anstieg der Expression gezeigt werden. Eine Veränderung der Expression durch die Zugabe von rekombinanten TNFα wurde ebenfalls nicht induziert. Auch die Konzentration von IL-13 durch rhIL-6 Stimulation, sowohl in Kombination mit rhTGFβ als auch durch die reine rhIL-6 Behandlung, wurde signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu zeigte die Stimulation mit rekombinanten TNFα keinen Einfluss auf die IL-13 Protein-Konzentration. Der Anstieg der IL-10 Produktion wurde durch Ko-Stimulation mit rekombinanten IL-6 und TGFβ stärker induziert als durch alleinige rhIL-6 Zugabe. Bei der Inkubation mit rekombinanten TNFα war kein Unterschied zwischen der unstimulierten Negativkontrolle (Medium) und der mit rhTNFα stimulierten Probe bezüglich der IL-10 Zytokininduktion ersichtlich. Aus den Ergebnissen dieses Versuchsansatzes kann daher geschlussfolgert werden, dass die Zytokinexpression von IL-17A, IL-13 und IL-10 in naiven CD4⁺/CD62L⁺ durch das proinflammatorische Zytokin IL-6 induziert wird.

3.3.8 Inhibition der Zytokinexpression von IL-17A, IL-13 und IL-10 mittels spezifischer Antikörper in CD4⁺/62L⁺ T-Zellen

Um die Bedeutung des *A. lwoffii*-stimulierten Makrophagenzytokins IL-6 auf die *in vitro* Expression der T-Zell-Zytokine IL-17A, IL-13 und IL-10 weiter zu untersuchen, wurden naive CD4⁺/62L⁺ T-Zellen erneut mit Überständen der *A. lwoffii*-exponierten Makrophagen-Kulturzellen (J774) in Kombination mit blockierenden Antikörpern kultiviert. Zur Neutralisierung von IL-6 im Überstand der *A. lwoffii*-exponierten Makrophagen-Kulturzellen wurden neutralisierende anti-IL-6 und anti-TGFβ Antikörper eingesetzt, die zuvor in Zellkulturexperimenten eine neutralisierende Wirkung gezeigt hatten. Um die Aufnahme von IL-6 und damit jegliche Aktivierung der Zytokinexpression von IL-17A, IL-13 und IL-10 in CD4⁺/62L⁺ T-Zellen über IL-6 zu verhindern, wurde das im Makrophagen-Überstand (*A. lwoffii*-exponiert) vorhandene IL-6 erst nach vorausgegangener Inkubation, d.h. vor Zugabe auf T-Zellen mit Hilfe von anti-IL-6 und anti-TGFβ, neutralisiert und anschließend mit naiven CD4⁺/62L⁺ T-Zellen 5 Tage kultiviert (s. Kapitel 2.15.4). Zum Vergleich der *in vitro* Zytokinexpression wurden Kontrollansätze (Mediumkontrolle) der CD4⁺/62L⁺ T-Zellen ohne Stimulation mit Überständen der J774 Makrophagen-Kulturzellen (*A. lwoffii*-exponiert) kultiviert. Die Analyse der Zytokin-Konzentrationen von IL-17A, IL-13 und IL-10 im Zellkultur-Überstand erfolgte mittels CBA.

In Abb. 32 ist die IL-17A Freisetzung der CD4⁺/62L⁺ T-Zellen gezeigt. Die Behandlung des Makrophagen-Überstands (*A. lwoffii*-exponiert) mit blockierenden Antikörpern gegen IL-6 und TGFβ wies jedoch keinen hemmenden Effekt auf die IL-17A Freisetzung auf. Auch die separate Gabe der neutralisierenden anti-IL-6 und anti-TGFβ Antikörper beeinflusste die Zytokinexpression nicht. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollproben (ohne blockierende Antikörper), die lediglich mit dem Makrophagen-Überstand in unterschiedlichen Konzentrationen (1:10 und 1:2) kultiviert wurden, kam es sogar zu einer starken Zunahme der IL-17A Induktion. Dagegen zeigten unbehandelte Zellen (Mediumkontrolle) kaum eine Induktion der IL-17A Expression.

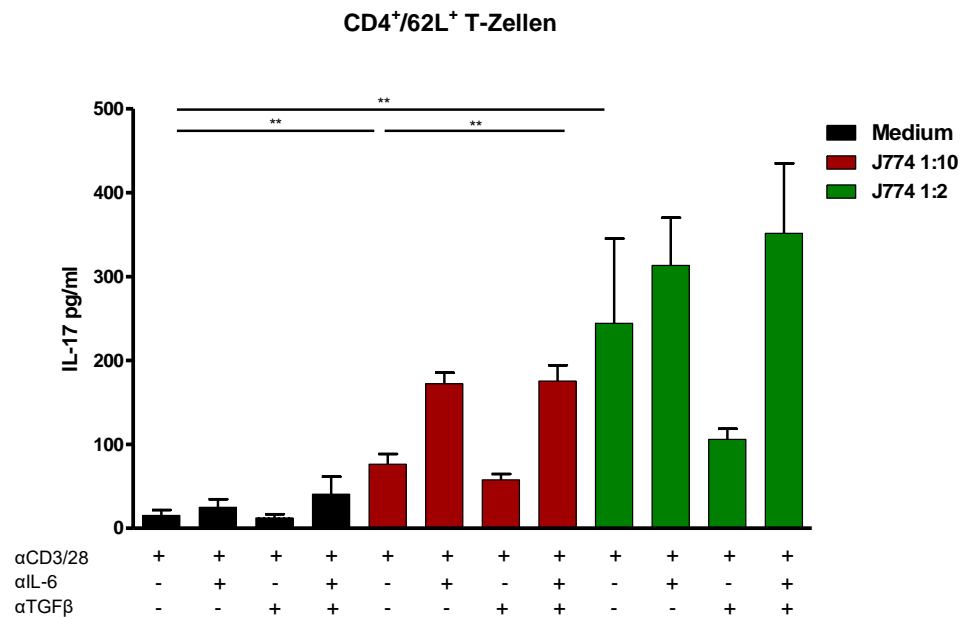


Abb. 32 Hemmung der IL-17A Zytokinexpression durch αIL-6 und αTGFβ von naiven CD4⁺/CD62L⁺ T-Zellen nach *in vitro* Kultivierung mit *A. lwoffii*-behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen

Naive CD4⁺/CD62L⁺ T-Zellen wurden aus MNCs der Milz von weiblichen Balb/c-Mäusen aufgereinigt und mit αCD3/28 stimuliert. *A. lwoffii*-behandelte J774 Makrophagen-Kulturüberstände [1×10^6 CFU/ml] wurden zunächst in Gegenwart der blockierenden Antikörper αIL-6 (5 μg/ml) und αTGFβ (100 ng/ml) vorinkubiert. Anschließend erfolgte die *in vitro* Kultivierung für 5 Tage mit *A. lwoffii*-behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen im Verhältnis 1:10 und 1:2. An Tag 5 wurden die Zellen gewaschen, erneut in Kultur genommen und mit αCD3 stimuliert. Nach weiteren 18 h wurde der Überstand gewonnen und die Freisetzung von IL-17A mittels CBA bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (n=3). Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

Unter denselben Bedingungen, wie in dem in Abb. 32 dargestellten Experiment, wurde ebenfalls der Einfluss der neutralisierenden anti-IL-6 und anti-TGFβ Antikörper auf die IL-13 Zytokinexpression in CD4⁺/62L⁺ T-Zellen untersucht (Abb. 33). Durch Neutralisierung der Makrophagen-Überstände (*A. lwoffii*-exponiert) in Kombination mit anti-IL-6 und anti-TGFβ, die sowohl im Verhältnis von 1:10 als auch im Verhältnis von 1:2 mit naiven CD4⁺/62L⁺ T-Zellen kultiviert wurden, konnte eine signifikant reduzierte IL-13 Freisetzung beobachtet werden. Hier zeigte auch eine alleinige Behandlung mit anti-IL-6 einen starken Einfluss auf die Zytokinproduktion, die Werte entsprachen denen der parallel mit anti-IL-6 und anti-TGFβ behandelten Gruppen. Die Negativkontrolle (Medium) wies dagegen nur geringe Mengen der IL-13 Zytokinexpression auf.

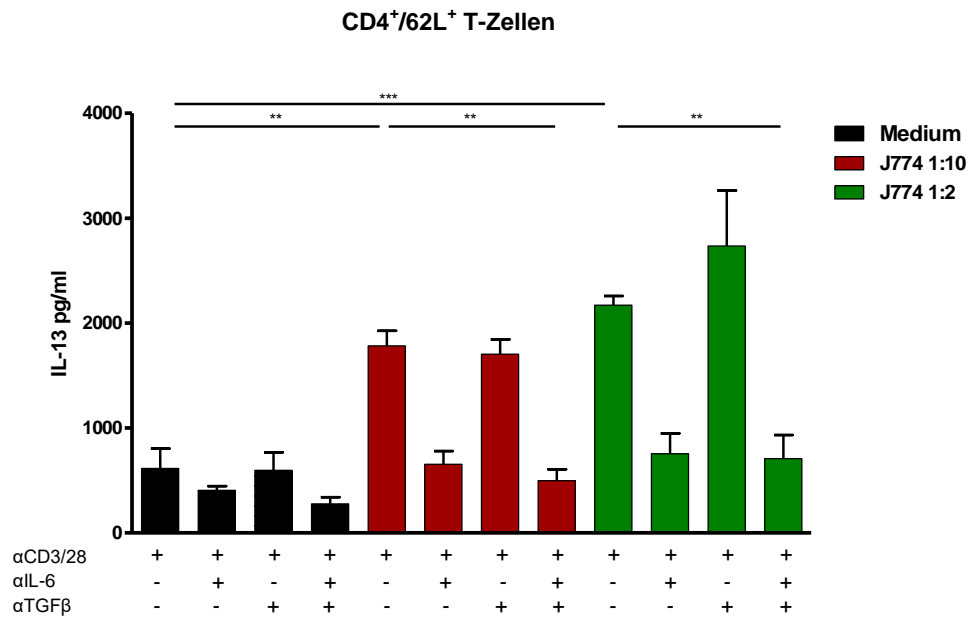


Abb. 33 Hemmung der IL-13 Zytokinexpression durch αIL-6 und αTGFβ von naiven CD4⁺/CD62L⁺ T-Zellen nach *in vitro* Kultivierung mit *A. lwoffii*-behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen

Naive CD4⁺/CD62L⁺ T-Zellen wurden aus MNCs der Milz von weiblichen Balb/c-Mäusen aufgereinigt und mit αCD3/28 stimuliert. *A. lwoffii*-behandelte J774 Makrophagen-Kulturüberstände [1 x 10⁶ CFU/ml] wurden zunächst in Gegenwart der blockierenden Antikörper αIL-6 (5 μg/ml) und αTGFβ (100 ng/ml) vorinkubiert. Anschließend erfolgte die *in vitro* Kultivierung für 5 Tage mit *A. lwoffii*-behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen im Verhältnis 1:10 und 1:2. An Tag 5 wurden die Zellen gewaschen, erneut in Kultur genommen und mit αCD3 stimuliert. Nach weiteren 18 h wurde der Überstand gewonnen und die Freisetzung von IL-13 mittels CBA bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (n=3). Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

Im nächsten Schritt wurde die Zytokinproduktion des IL-10 analysiert, die vergleichbar mit den Ergebnissen der IL-13 Expression war. Sowohl die alleinige anti-IL-6 Behandlung als auch die gemeinsame Inkubation der anti-IL-6 und anti-TGFβ Antikörper mit dem Makrophagen-Überstand (*A. lwoffii*-exponiert) induzierte eine deutlich schwächere IL-10 Zytokin-expression in CD4⁺ T-Zellen (Abb. 34). Insgesamt führte die funktionelle Inhibition zu signifikanten Veränderungen gegenüber den Kontrollgruppen, die lediglich mit dem Makrophagen-Überstand ohne Zugabe neutralisierender Antikörper kultiviert wurden. In der Negativkontrolle (Medium) waren nur geringe IL-10 Konzentrationen zu detektieren.

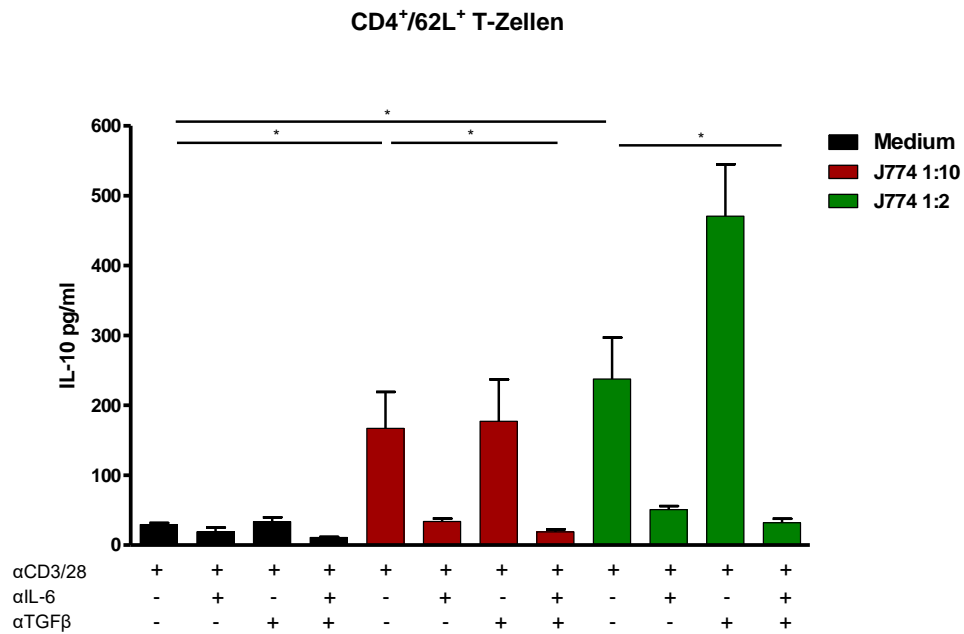


Abb. 34 Hemmung der IL-10 Zytokinexpression durch αIL-6 und αTGFβ von naiven CD4⁺/CD62L⁺ T-Zellen nach *in vitro* Kultivierung mit *A. lwoffii*-behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen

Naive CD4⁺/CD62L⁺ T-Zellen wurden aus MNCs der Milz von weiblichen Balb/c-Mäusen aufgereinigt und mit αCD3/28 stimuliert. *A. lwoffii*-behandelte J774 Makrophagen-Kulturüberstände [1×10^6 CFU/ml] wurden zunächst in Gegenwart der blockierenden Antikörper αIL-6 (5 μg/ml) und αTGFβ (100 ng/ml) vorinkubiert. Anschließend erfolgte die *in vitro* Kultivierung für 5 Tage mit *A. lwoffii*-behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen im Verhältnis 1:10 und 1:2. An Tag 5 wurden die Zellen gewaschen, erneut in Kultur genommen und mit αCD3 stimuliert. Nach weiteren 18 h wurde der Überstand gewonnen und die Freisetzung von IL-10 mittels CBA bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (n=3). Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

3.4 Epigenetische Regulation in CD4⁺/62L⁺ T-Zellen

Nachdem sich gezeigt hatte, dass das proinflammatorische Zytokin IL-6, durch *A. lwoffii* Stimulation in Makrophagen, die Induktion von IL-17A in CD4⁺ T-Zellen beeinflusst, stellte sich die Frage ob die Modulation der Zytokinexpression mit epigenetischen Veränderungen assoziiert ist. Da IL-17A bei der *A. lwoffii* F78-vermittelten Prävention des asthmatischen Phänotyps eine essentielle Rolle spielen könnte, wurde im Folgenden untersucht, ob DNA-Methylierung innerhalb des IL-17A Promotors einen möglichen Mechanismus für die *in vitro* Regulation der Zytokinproduktion darstellt.

3.4.1 Analyse der Promotor-Methylierung von IL-17A in CD4⁺/62L⁺ T-Zellen nach Stimulation mit *A. lwoffii*-behandelten Kulturüberständen

Weiterführend wurde analysiert, inwieweit *in vitro* eine Veränderung der DNA-Methylierung des IL-17A Promotors in CD4⁺/CD62L⁺ T-Zellen nach *in vitro* Kultivierung mit *A. lwoffii*-behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen induziert werden kann. Hierzu wurden die aufgereinigten und mit anti-CD3/28 stimulierten CD4⁺/62L⁺ T-Zellen aus der Milz mit dem Überstand der J774 Makrophagen-Kultur, die für 24 h mit *A. lwoffii* (1 x 10⁶ CFU/ml) stimuliert wurde, für 5 Tage kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen gewaschen und erneut mit anti-CD3 stimuliert. Nach 18 Stunden wurden die Zellen geerntet und mittels der im Methodenteil beschriebenen Bisulfit-Pyrosequenzierung der Methylierungsstatus des IL-17A Promotors analysiert.

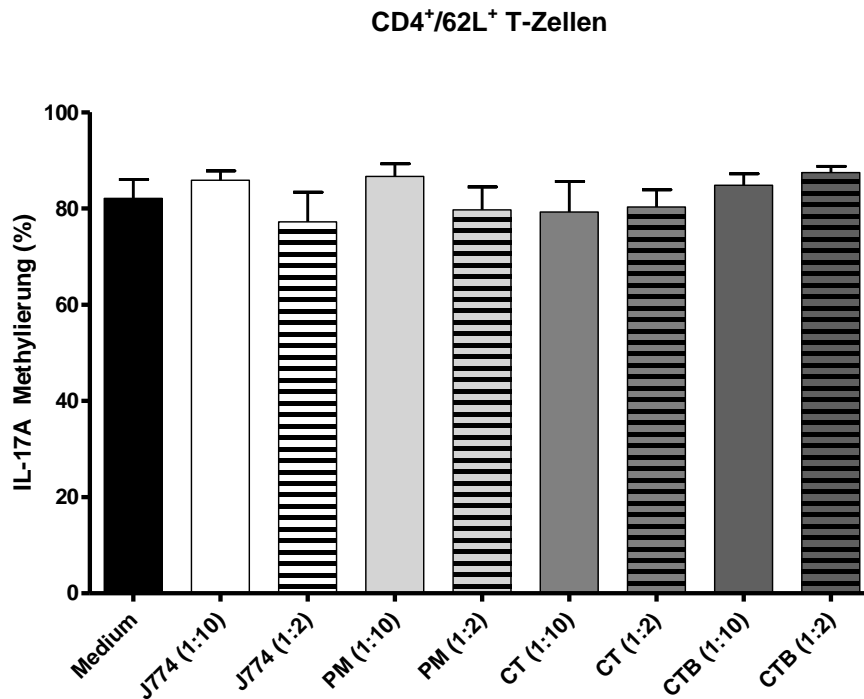


Abb. 35 Veränderung der Methylierung des IL-17A Promotors von naiven CD4⁺/CD62L⁺ T-Zellen nach *in vitro* Kultivierung mit *A. lwoffii*-behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen

Naive CD4⁺/CD62L⁺ T-Zellen wurden aus MNCs der Milz von weiblichen Balb/c-Mäusen aufgereinigt und mit α CD3/28 stimuliert. Anschließend erfolgte die *in vitro* Kultivierung für 5 Tage mit *A. lwoffii*-behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen [1×10^6 CFU/ml] und Cholera Toxin (CT) bzw. Cholera Toxin B-Untereinheit (CTB) behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen [2 μ g/ml] im Verhältnis 1:10 und 1:2. An Tag 5 wurden die Zellen gewaschen, erneut in Kultur genommen und mit α CD3 stimuliert. Nach weiteren 18 h wurden die Zellen geerntet und mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung der Methylierungsgrad des IL-17A Promotors bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (n=3). Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M.

Der Methylierungsstatus am IL-17A Promotor zeigte, dass generell ein relativ hohes absolutes Methylierungsniveau am IL-17A Promotor vorhanden ist. Die Spanne des Methylierungsgrades reichte von 78 % bis 87 % (Abb. 35). Die Änderungen der IL-17A DNA-Methylierung in CD4⁺/CD62L⁺ T-Zellen lieferte allerdings im Vergleich der Kontrollgruppe (Medium) zu den behandelten Gruppen (*A. lwoffii*- bzw. Cholera Toxin (CT und CTB)-stimulierte Makrophagen-Kulturüberstände) keine signifikanten Unterschiede. Leider gelang es unter diesen Bedingungen nicht, mit diesem Methylierungsassay einen nennenswerten Anteil an IL-17A-bildenden Zellen zu induzieren, um valide Ergebnisse zu erzielen, so dass diese interessante Fragestellung noch weiterführend bearbeitet werden muss.

3.5 Charakterisierung des asthmatischen Phänotyps nach Cholera Toxin Exposition im Akutmodell der allergischen Atemwegsentzündung

Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst die Etablierung eines *in vitro* Assays, mit dem der direkte Einfluss der *A. lwoffii* und Cholera Toxin Exposition auf Zellen des innate Immunsystems untersucht werden sollte. In den vorhergehenden Versuchen konnte anhand von *in vitro* Studien die Expression charakteristischer proinflammatorischer Zytokine der *A. lwoffii* und Cholera Toxin Stimulation qualitativ und quantitativ in einer Kinetik analysiert werden. Im Rahmen dieser Versuche wurde belegt, dass sowohl *A. lwoffii* als auch Cholera Toxin *in vitro* eine inflammatorische Reaktion in Zellen der angeborenen Immunität bzw. Makrophagen auslöst und als Reaktion erwartungsgemäß die Produktion typischer Zytokine des angeborenen Immunsystems (IL-6 und TNF- α) induziert. Nachdem gezeigt werden konnte, dass neben *A. lwoffii* auch die Stimulation von Cholera Toxin behandelten Makrophagen-Überständen die Induktion weiterer inflammatorischer Zytokine in CD4⁺ T-Zellen *in vitro* beeinflusst, stellte sich die Frage nach dem Einfluss der immunmodulatorischen Wirksamkeit von Cholera Toxin auf die Entstehung und Ausprägung des asthmatischen Phänotyps. Zur Erforschung der noch unbekanntenen molekularen Mechanismen des schützenden Effekts der Cholera Toxin Applikation war es deshalb für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse, aufbauend auf einem bereits innerhalb der Arbeitsgruppe entwickelten Modell der akuten Atemwegsentzündung, die Etablierung und Charakterisierung der Cholera Toxin Exposition *in vivo* zu verwirklichen. Da bisher noch keine vergleichbaren experimentellen Ansätze zur Verabreichung von Cholera Toxin in murinen *in vivo*-Modellen publiziert waren, wurde im Rahmen der Messung der Zytokin-Kinetik (s. 3.2) die Dosis zur Stimulation der *in vitro* Reaktion als Anhaltspunkt für die Applikations-Konzentration der nachfolgenden *in vivo* Versuche genutzt.

3.5.1 Cholera Toxin Exposition führt zu einer Reduktion der akuten allergischen Atemwegsentzündung im Mausmodell des experimentellen Asthmas

Nachdem im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Exposition von *A. lwoffii* anhand des murinen Modells der akuten Atemwegsentzündung sowohl eine T_H2-typische OVA-spezifische Antikörperproduktion als auch die Ausprägung einer allergischen Atemwegsentzündung supprimieren konnte (s. 3.1), wurde in der Folge, basierend auf dem *in vivo* Akutmodell, der Einfluss der Cholera Toxin Exposition auf

Sensibilisierung und Ausprägung des allergischen Phänotyps im Mausmodell untersucht. Aufgrund der zytotoxischen Eigenschaften des Wildtyp-Proteins (CT), die vielfach zu Unverträglichkeiten in der Maus führen können, wurde den Mäusen über einen Expositionszeitraum von 20 Tagen insgesamt nur fünfmal Cholera Toxin intranasal verabreicht. Parallel zur Cholera Toxin Behandlung wurden die Tiere durch drei subkutane Injektionen mit OVA sensibilisiert und einem OVA-Aerosol exponiert. Den Mäusen der Negativ-Kontrollgruppen wurde statt OVA lediglich PBS injiziert. Zum Vergleich der immunmodulatorischen Eigenschaften des CT wurde CTB einer weiteren Behandlungsgruppe appliziert. Folgende phänotypische Parameter wurden mittels der im Methodenteil beschriebenen Analysen untersucht, um den allergischen Phänotyp zu charakterisieren: allergenspezifische Antikörper im Serum, Differenzierung der Zellpopulationen in der BAL, Zytokinproduktion (Lymphknoten und BAL), Produktion proinflammatorischer Zytokine nach Kurzzeitstimulation mit Cholera Toxin (Serum und BAL), Lungenfunktionsmessung und Lungenhistologie.

Im Rahmen der Untersuchungen der OVA-spezifischen Immunglobulin Titer im Serum nach Applikation von Cholera Toxin (CT und CTB) an OVA-sensibilisierte Tiere konnte ein deutlicher Effekt der erfolgreichen Sensibilisierung anhand der erhöhten IgE- und IgG₁-Produktion gemessen werden (Abb. 36). Auch nach Quantifizierung der infiltrierten Leukozyten fiel eine Veränderung der Zusammensetzung des allergischen BAL-Infiltrats auf. So zeigten OVA-sensibilisierte Tiere eine akute Entzündung in der BAL, welche bedingt war durch einen signifikanten Anstieg der Leukozyten-Konzentration und der eosinophilen Granulozyten, die den größten Teil des Infiltrats ausmachen (Abb. 37). Während in der BAL der OVA-sensibilisierten und CT behandelten Tiere eine deutlich verringerte Anzahl an Leukozyten und eine signifikante Reduktion an eosinophilen Granulozyten beobachtet werden konnte, führte die Behandlung mit CTB zu einem massiven Influx der Leukozyten und eosinophilen Granulozyten. Die weitere Zählung und Differenzierung der Leukozyten ergab, dass sowohl Lymphozyten als auch neutrophile Granulozyten und Makrophagen in CT behandelten Tieren eine erhöhte Anzahl aufweisen im Vergleich zur OVA-Gruppe. Gänzlich anders ist der Anteil dieser Zellen in CTB behandelten Tieren. Hier war die Anzahl der Lymphozyten und Makrophagen geringer und neutrophile Granulozyten konnten sogar überhaupt nicht beobachtet werden.

Weiterhin kam es in Tieren der allergenprovozierten Kontrollgruppe (OVA) zu einer Hyperreagibilität der Atemwege nach Provokation mit Methacholin, die mit einer Verringerung der Lungenfunktion einherging (Abb. 38). Im Gegensatz dazu war in OVA-

exponierten Tieren der Cholera Toxin behandelten Gruppen (CT und CTB) insgesamt die Wiederherstellung der Atemwegshyperreaktivität und Normalisierung der Lungenfunktion zu erkennen.

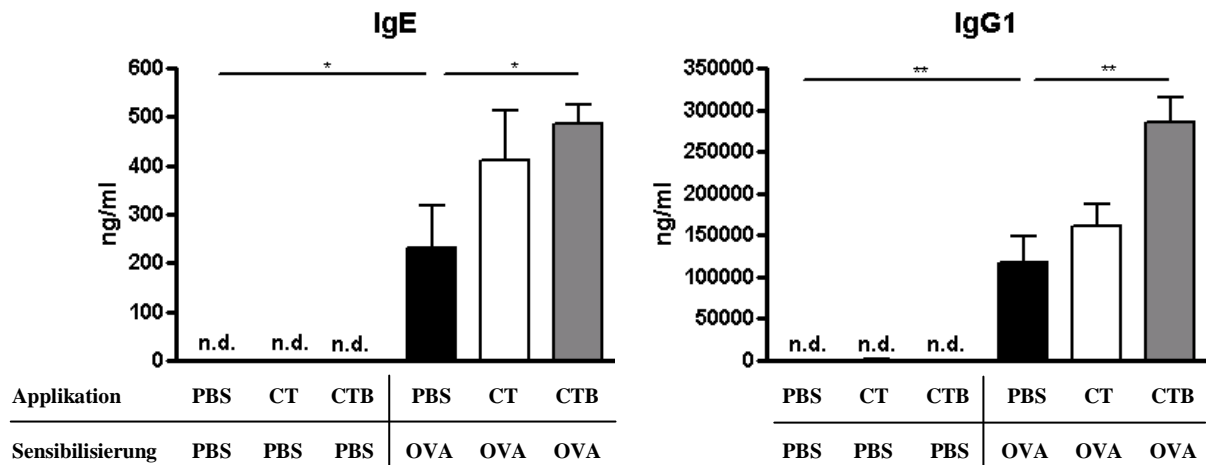


Abb. 36 OVA-spezifische Immunglobulin-Konzentrationen im Serum nach Behandlung mit Cholera Toxin im akuten Modell der allergischen Atemwegsentzündung

Weiblichen Balb/c-Mäusen (n=8 pro Gruppe) wurde beginnend sieben Tage vor der Sensibilisierung mit OVA (PBS als Kontrolle) Cholera Toxin (CT) und Cholera Toxin B-Untereinheit (CTB) mit einer Dosis von 2 µg/50 µl intranasal appliziert. Anschließend erfolgte die dreimalige Provokation mit 1 % OVA-Aerosol. Die Abnahme der Blutproben zur Serumgewinnung fand 48 h nach der letzten OVA-Exposition statt. Die Bestimmung der OVA-spezifischen Immunglobuline IgE und IgG₁ im Serum wurde mittels ELISA durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001). n.d.: nicht detektierbar.

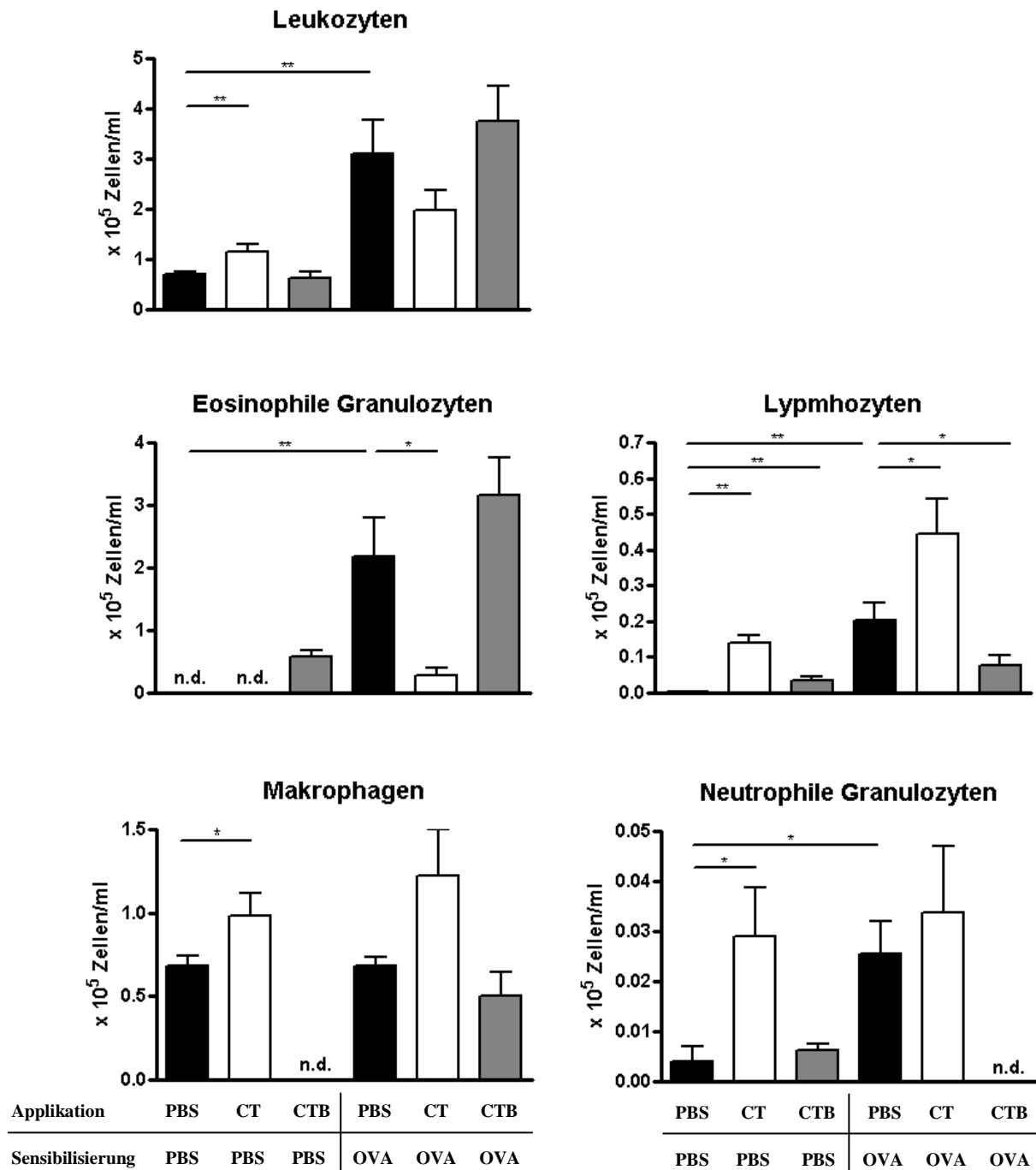


Abb. 37 Differenzierung der Leukozyten in der BAL nach Behandlung mit Cholera Toxin im akuten Modell der allergischen Atemwegsentzündung

Weiblichen Balb/c-Mäusen (n=8 pro Gruppe) wurde beginnend sieben Tage vor der Sensibilisierung mit OVA (PBS als Kontrolle) Cholera Toxin (CT) und Cholera Toxin B-Untereinheit (CTB) mit einer Dosis von 2 µg/50 µl intranasal appliziert. Anschließend erfolgte die dreimalige Provokation mit 1 % OVA-Aerosol. Die bronchoalveoläre Lavage fand 48 h nach der letzten OVA-Exposition statt. Die Quantifizierung der Zellen wurde lichtmikroskopisch anhand zytologischer Kriterien durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001). n.d.: nicht detektierbar.

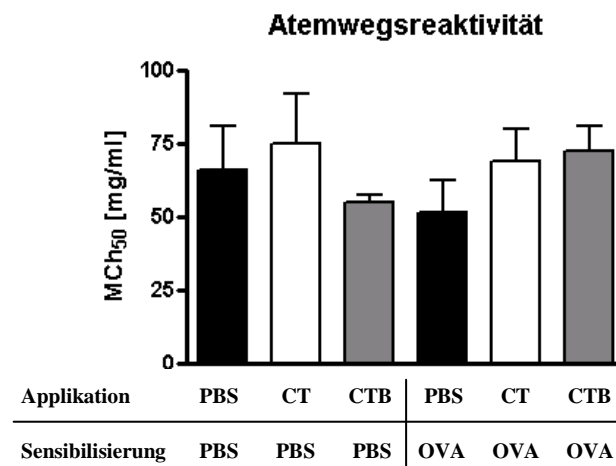


Abb. 38 Atemwegsreaktivität nach Behandlung mit Cholera Toxin im akuten Modell der allergischen Atemwegsentszündung

Weiblichen Balb/c-Mäusen (n=8 pro Gruppe) wurde beginnend sieben Tage vor der Sensibilisierung mit OVA (PBS als Kontrolle) Cholera Toxin (CT) und Cholera Toxin B-Untereinheit (CTB) mit einer Dosis von 2 µg/50 µl intranasal appliziert. Anschließend erfolgte die dreimalige Provokation mit 1 % OVA-Aerosol. 24 h nach der letzten OVA-Exposition erfolgte die Analyse der Atemwegsreaktivität mittels Head-Out Body-Plethysmographie und wird als die Konzentration an β-Methyl-Acetylcholin (MCh₅₀) ausgedrückt, die eine 50 %-ige Reduktion des Ausgangswerts des halbmaximalen expiratorischen Atemflusses bewirkt. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E.M. (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001). n.d.: nicht detektierbar.

Zur weiteren Charakterisierung der Atemwegsentszündung wurde das Zytokinprofil in der BAL und von MNCs der lungendrainierenden Lymphknoten bestimmt. So zeigte die Cholera Toxin Behandlung keinerlei Einfluss auf die Produktion von IFN γ im Vergleich zur OVA-Kontrollgruppe, die Werte der PBS-Kontrollgruppen waren ebenfalls stark supprimiert (Abb. 39). Während die Produktion der T_H2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 in OVA exponierten Tieren signifikant erhöht war, führte die Cholera Toxin Applikation in OVA-sensibilisierten Tieren zu deutlich geringeren Konzentrationen an T_H2-Zytokinen sowohl in den Überständen der Lymphknoten als auch in der BAL. Die Unterschiede erreichten sogar ein starkes Signifikanzniveau.

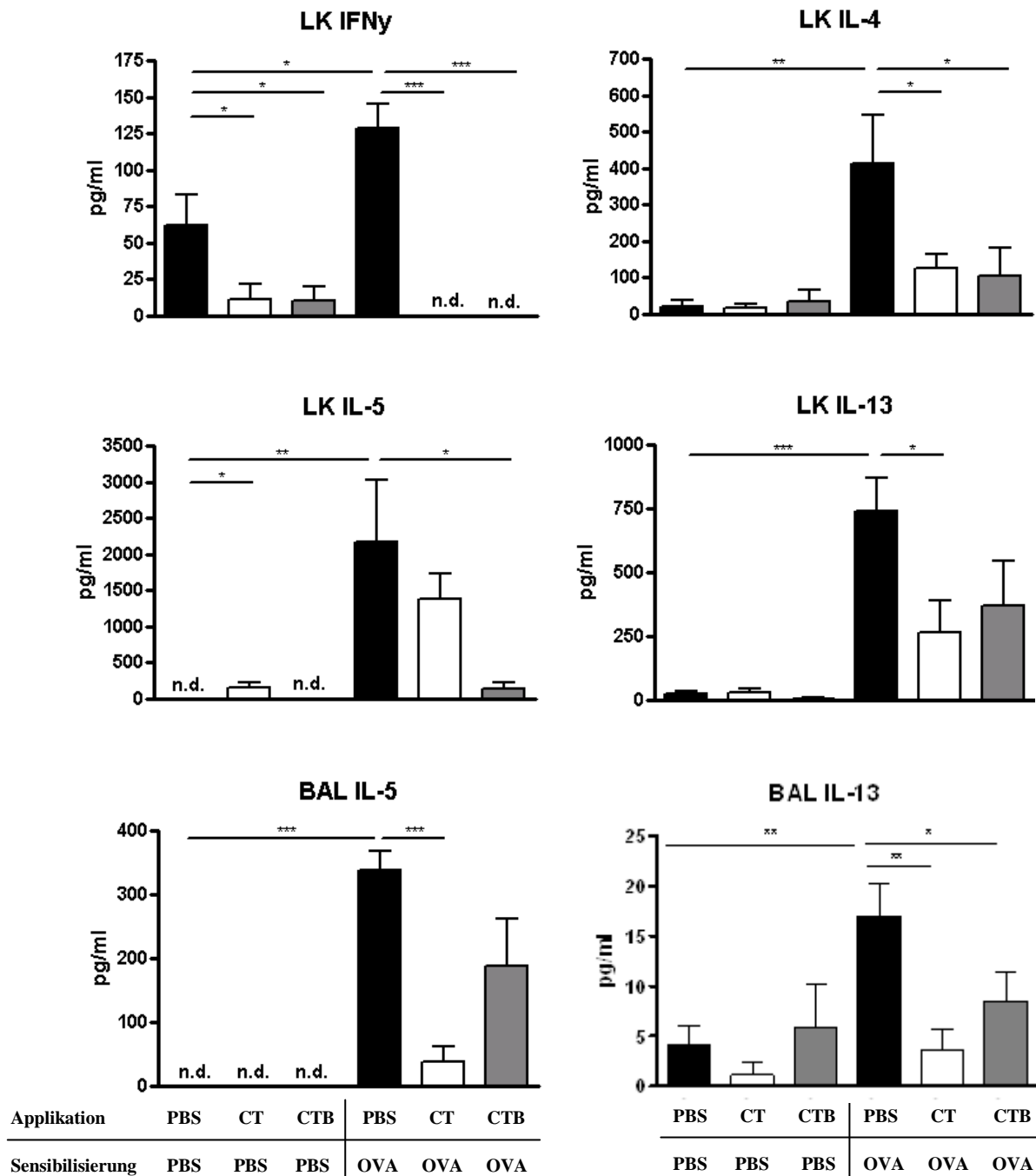


Abb. 39 Zytokin-Konzentrationen in der BAL und in den Lymphknoten nach Behandlung mit Cholera Toxin im akuten Modell der allergischen Atemwegsentzündung

Weiblichen Balb/c-Mäusen (n=8 pro Gruppe) wurde beginnend sieben Tage vor der Sensibilisierung mit OVA (PBS als Kontrolle) Cholera Toxin (CT) und Cholera Toxin B-Untereinheit (CTB) mit einer Dosis von 2 μ g/50 μ l intranasal appliziert. Anschließend erfolgte die dreimalige Provokation mit 1 % OVA-Aerosol. Die bronchoalveoläre Lavage und Entnahme der Lymphknoten fand 48 h nach der letzten OVA-Exposition statt. Zytokin-Konzentrationen im zellfreien Überstand der BAL (A) und Lymphknoten (B) wurden mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001). n.d.: nicht detektierbar.

Ergänzend wurde der Einfluss der Cholera Toxin Applikation auf die Konzentration der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF α im Serum und in der BAL untersucht. 4 h und 24 h nach der Kurzzeitstimulation mit CT und CTB wurde eine Peritoneallavage durchgeführt und Serum gewonnen. In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass CT und CTB *in vivo* eine systemische Entzündungsreaktion induzieren. Das inflammatorische Zytokin IL-6, das während der frühen Immunantwort bereits 4 h nach Applikation des CT aktiviert wird, dient als Indikator dieser Entzündungsreaktion (Abb. 40). Das CTB zeigte allerdings erst 24 h nach der Applikation einen erhöhten Anstieg des IL-6 im Serum. Die lokale Entzündungsreaktion in der Lunge konnte ebenfalls erst nach 24 h in der BAL nachgewiesen werden. Dabei führte nur die Behandlung mit CTB zu einem signifikanten Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF α .

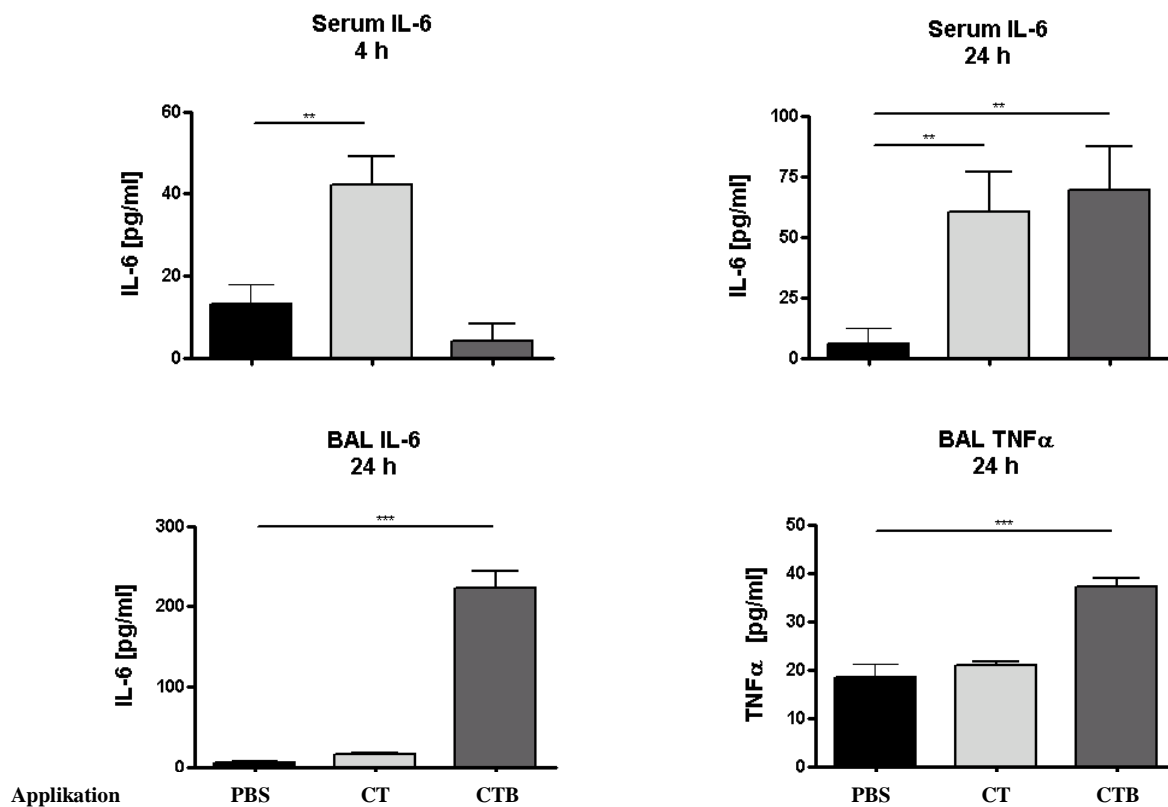


Abb. 40 Zytokin-Konzentrationen in der BAL und im Serum nach Kurzzeitstimulation mit Cholera Toxin *in vivo*

Weiblichen Balb/c-Mäusen (n=8 pro Gruppe) wurde Cholera Toxin (CT) und Cholera Toxin B-Untereinheit (CTB) mit einer Dosis von 2 μ g/50 μ l intranasal appliziert. Die bronchoalveoläre Lavage und Abnahme der Blutproben zur Serumgewinnung fand 4 h und 24 h nach der Behandlung mit Cholera Toxin statt. Zytokin-Konzentrationen im zellfreien Überstand der BAL und im Serum wurden mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001). n.d.: nicht detektierbar.

In der mikroskopischen Analyse der Lungenhistologie konnte in der OVA-Gruppe, wie erwartet, eine starke Infiltration von Entzündungszellen in das Gewebe im Gegensatz zur PBS-Gruppe beobachtet werden (Abb. 41). Diese Infiltration wurde durch die Cholera Toxin (CT und CTB) Behandlung fast vollständig verhindert. Es konnten nur noch vereinzelt infiltrierende eosinophile Granulozyten und PAS-positive Becherzellen detektiert werden. In nicht-sensibilisierten Tieren zeigte Cholera Toxin (CT und CTB) keinen Effekt.

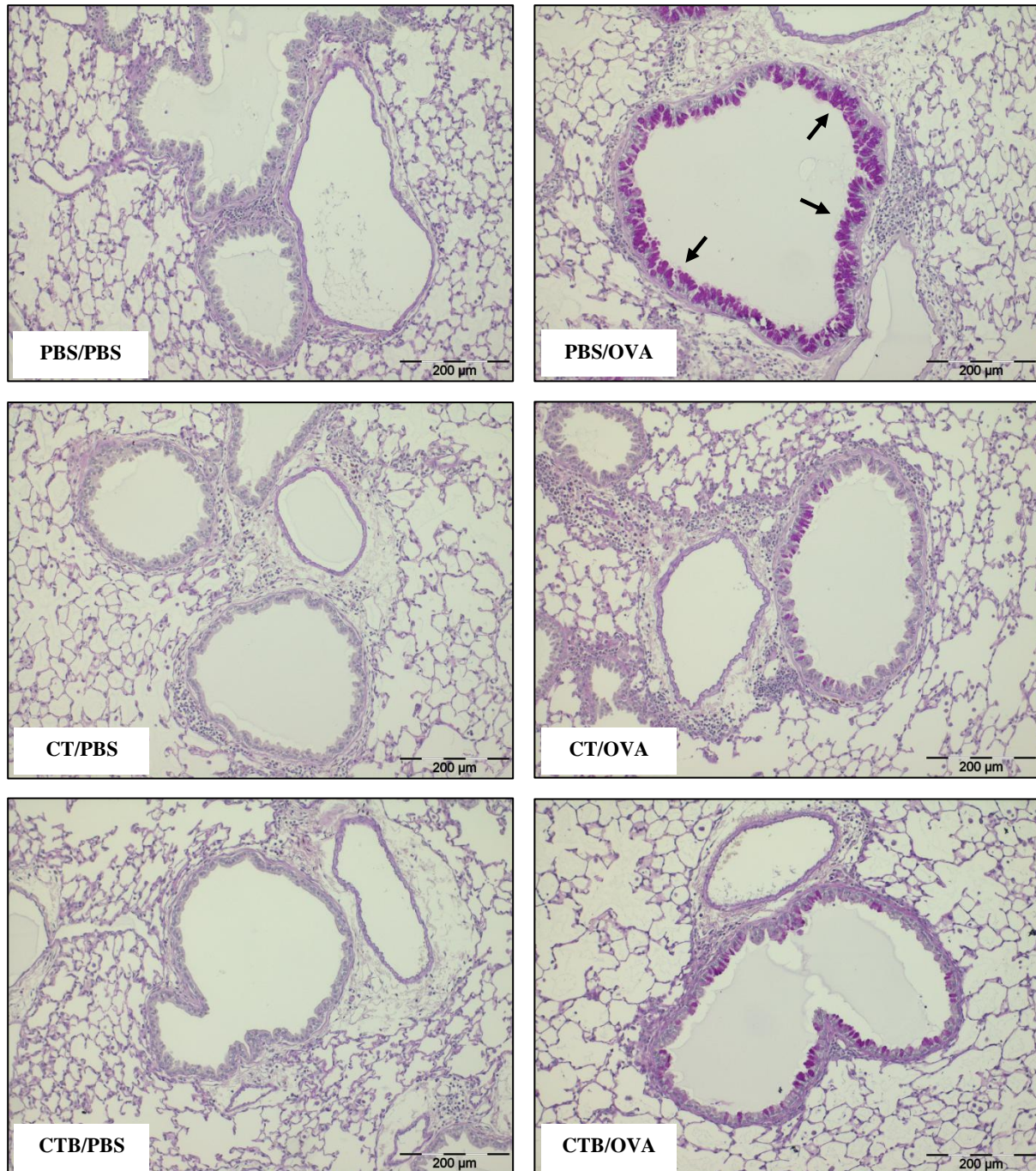


Abb. 41 Lungenhistologie nach Behandlung mit Cholera Toxin im akuten Modell der allergischen Atemwegsentzündung

Weiblichen Balb/c-Mäusen (n=8 pro Gruppe) wurde beginnend sieben Tage vor der Sensibilisierung mit OVA (PBS als Kontrolle) Cholera Toxin (CT) und Cholera Toxin B-Untereinheit (CTB) mit einer Dosis von 2 µg/50 µl intranasal appliziert. Anschließend erfolgte die dreimalige Provokation mit 1 % OVA-Aerosol. 48 h Stunden nach der letzten OVA-Exposition erfolgte die Lungenentnahme. Histologische Darstellung der Infiltration inflammatorischer Zellen in das Lungengewebe sowie der Anteil mukosproduzierender Becherzellen (lila) in den Atemwegen mittels PAS-Färbung. Pfeile kennzeichnen eosinophile Granulozyten. Balken = 200 µm.

3.5.2 Zusammenfassung der Phänotypanalysen

Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass die Applikation von CT in OVA-sensibilisierten Tieren zu einer deutlichen Reduktion der pulmonalen Entzündungsreaktion und des asthmatischen Phänotyps im Tiermodell der akuten Atemwegsentzündung führt. Im Vergleich zur Positiv-Kontrollgruppe (PBS/OVA) mit einer erfolgreich induzierten akuten Atemwegsentzündung, sichtbar an der Induktion OVA-spezifischer Immunglobuline, führte die Behandlung mit CT zur reduzierten Anzahl der eosinophilen Granulozyten in der BAL mit signifikanten Effekten und zur Normalisierung der bronchialen Hyperreagibilität. Anhand weiterer Parameter der Lungenhistologie konnte eine deutliche Reduktion der pulmonalen Entzündungsreaktion festgestellt werden. Ferner bestätigte auch das Zytokinmuster nach der CT Applikation eine stark verringerte signifikante Produktion der T_H2 -Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 sowohl in den Überständen der Lymphknoten als auch in der BAL. Darüber hinaus konnte das CT mit seinen immunstimulatorischen Eigenschaften kurz nach der Applikation die Synthese proinflammatorischer Zytokine (IL-6 und $TNF\alpha$) induzieren, die bereits 4 h später systemisch verfügbar sind. Im Gegensatz zu dem Wildtypprotein (CT) führte die Behandlung mit CTB nur teilweise zu signifikanten Veränderungen gegenüber der Positiv-Kontrollgruppe (PBS/OVA). In den mit CTB behandelten OVA-sensibilisierten Mäusen konnte ein deutlicher Anstieg der Gesamt-Leukozytenzahl festgestellt werden. Dies war im Wesentlichen bedingt durch die Zunahme an eosinophilen Granulozyten. Weiterhin konnte interessanterweise die Entstehung einer Atemwegshyperreagibilität verhindert werden. Bei der histologischen Analyse der Atemwege und des Lungengewebes zeigte sich eine deutlich reduzierte Anzahl mukusproduzierender Becherzellen und ein verminderter Entzündungsgrad. Ferner ließ das Zytokinmuster ebenfalls eine stark verringerte Produktion der T_H2 -Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 sowohl in den Überständen der Lymphknoten als auch in der BAL aufweisen. Des Weiteren erfolgte die Induktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und $TNF\alpha$ erst 24 h nach Applikation des CTB sowohl systemisch als auch lokal. Es muss schließlich zusammenfassend festgestellt werden, dass trotz gewisser Tendenzen die Immunmodulation mit CTB keinen deutlichen Effekt auf die Ausprägung des allergischen Phänotyps hat. Dagegen konnte dargestellt werden, dass das CT einen protektiven Effekt sowohl auf die Sensibilisierung gegenüber OVA als auch auf die Ausprägung des allergischen Phänotyps hat und dass dieser eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Asthma-Protektion im Mausmodell spielt.

4 DISKUSSION

Das allergische Asthma bronchiale ist charakterisiert durch eine chronische Entzündung der Atemwege, die sich in unterschiedlichen Phänotypen manifestieren kann. Wie bei der Entwicklung einer Vielzahl komplexer, chronisch-entzündlicher Erkrankungen resultiert diese ebenfalls aus der Interaktion zwischen genetischer Disposition und Umweltexposition [208]. So können über entsprechende Gen-Umwelt-Interaktionen verschiedenste Umweltfaktoren, z.B. aus dem mikrobiellen Milieu, das jeweilige Genrepertoire beeinflussen und somit die Expression von Genen zulassen oder unterbinden. In zahlreichen epidemiologischen Studien konnte belegt werden, dass ein regelmäßiger Aufenthalt in einer Bauernhofumgebung bzw. die erhöhte mikrobielle Belastung in früher Kindheit, das Risiko im späteren Leben an atopischen Krankheiten und Asthma zu erkranken, reduziert (siehe auch Kapitel 1.2.2, S. 17) [188, 196]. Bei der Suche nach protektiven Faktoren aus dem bäuerlichen Umfeld konnten eine Vielzahl an wesentlichen Bauernhof-spezifischen Faktoren, sowie der aus dem Kuhstall isolierte Bakterienstamm *A. lwoffii* F78 identifiziert werden, die invers mit dem Auftreten von allergischen Erkrankungen assoziiert werden [193]. Im Mausmodell für akutes Asthma bronchiale verhinderte die intranasale Applikation von *A. lwoffii* F78 die Entstehung des allergischen Phänotyps [197]. Über die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen ist jedoch wenig bekannt.

In diesem Zusammenhang wurde die epigenetische Regulation, vermittelt durch die Mechanismen der DNA-Methylierung und Histonmodifikation, in den letzten Jahren als ein neuer Mechanismus zwischen Gen-Umweltinteraktionen und der Fehlfunktion des Immunsystems im Rahmen der Asthmapathogenese identifiziert [227]. An der Immunpathogenese des Asthma bronchiale sind eine Vielzahl von Zellen beteiligt. Aus immunologischer Sicht entsteht durch Sekretion eines spezifischen Zytokinmusters nach Allergenkontakt, auf zellulärer Ebene die Reifung und Differenzierung verschiedener T-Zell-Subpopulationen (T_H1 -, T_H2 -, T_H17 - sowie regulatorische T-Zellen) und die asthmatische Entzündungsreaktion wird über eine gesteigerte T_H2 -Antwort gesteuert. Nach Vuillermin et al. könnte eine mikrobielle Exposition vor dem Allergenkontakt zu einer veränderten DNA-Methylierung führen, die die Expression Asthma-relevanter Gene, z.B. der T_H2 -Zytokine, beeinflusst und so das Erkrankungsrisiko reduziert [227]. Dennoch ist bisher nicht geklärt, welche funktionellen Konsequenzen die mikrobielle Exposition auf die Veränderung der epigenetischen Regulation bei der T-Zell-Differenzierung und damit nachfolgend auf die Entwicklung von Allergie und Asthma im Tiermodell hat.

Als klärendes Bindeglied zwischen Gen-Umweltinteraktionen und der Fehlfunktion des Immunsystems im Rahmen der Asthmapathogenese wird dem angeborenen Immunsystem eine zentrale Bedeutung beigemessen. In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass Mikroorganismen oder deren Bestandteile das noch nicht vollständig gereifte Immunsystem beeinflussen und prägen, was durch Publikationen gestützt wird, in denen allergieprotektive Eigenschaften für mikrobielle Bestandteile wie LPS nachgewiesen wurden [182, 187, 245, 246]. Auch die Analyse der im Rahmen des Pränatal-Modells mit *A. lwoffii*-behandelten Mütter, zeigte, dass durch die intranasale Applikation von *A. lwoffii* bei diesen eine Induktion der angeborenen Immunantwort auslöst, die mit einer Erhöhung der proinflammatorischen Zytokinproduktion (IL-6, TNF α) einhergeht [198]. Die Interaktion zwischen Zellen der angeborenen und adaptiven Immunität ist folglich entscheidend für die Polarisierung der T-Zell-Immunantwort, was auf eine zentrale Rolle der mikrobiell induzierten Mediatoren bzw. des proinflammatorischen Zytokinprofils und der nachfolgenden immunmodulierenden Wirkung auf die allergische Entzündungsreaktion schließen lässt. So spielen Makrophagen eine entscheidende Rolle bei der Wahrnehmung von Bakterien durch das angeborene Immunsystem und beeinflussen die nachfolgenden Antworten des adaptiven Immunsystems im Hinblick auf die T-Helfer-Polarisierung der CD4⁺ T-Zellen.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die für die allergieprotektiven Eigenschaften verantwortlichen proinflammatorischen Mediatoren der Makrophagen, induziert durch mikrobiellen Stimuli, wie *A. lwoffii* F78 und Cholera Toxin (CT und CTB) zu identifizieren und deren Einfluss auf T-Zell-Zytokine (z.B. IL-17A) naiver CD4⁺ T-Zellen zu untersuchen. Darüber hinaus folgte die epigenetische Analyse der DNA-Methylierung in CD4⁺ T-Zellen (innerhalb des IL-17A Promotors), um einen möglichen Mechanismus für die *in vitro* Regulation der Zytokininduktion zu identifizieren. So sollte ein *in vitro* T-Zellsystem etabliert werden, dass eine genauere Untersuchung der zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen eines komplexen Zusammenspiels verschiedenster Zytokine, die im Rahmen einer Reaktion des angeborenen und adaptiven Immunsystems freigesetzt werden, erlaubt und die Erkenntnisse aus dem Tiermodell in ein *in vitro* Modell übertragen lässt. Dafür wurde zunächst eine genaue Analyse des durch *A. lwoffii* F78-induzierten protektiven Effekts auf die Entstehung von experimentellem Asthma im Mausmodell demonstriert, die sowohl die Lebend- als auch die Totkeim-Exposition beinhaltet. Ferner wurde zur Analyse der Auswirkungen einer Cholera Toxin (CT und CTB) Behandlung auf Sensibilisierung und Ausprägung des allergischen Phänotyps, ein *in vivo* Akutmodell der allergischen Atemwegsentzündung etabliert.

4.1 Die Lebend- und Totkeim-Exposition von *A. lwoffii* führt zu einer Reduktion der akuten allergischen Atemwegsentzündung im Mausmodell des experimentellen Asthmas

Das allergische Asthma bronchiale ist eine durch T_H2 -Zellen vermittelte Erkrankung, die eine immunologische Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ I darstellt. Die Hauptmerkmale des allergischen Asthmas sind eine IL-4-abhängige Produktion von allergenspezifischem IgE und eine über IL-5 vermittelte Atemwegsentzündung. Die Infiltration des Lungengewebes ist durch eosinophile Granulozyten, Mastzellen und Lymphozyten charakterisiert. Die Hyperreagibilität der Atemwege gegen nicht-spezifische Stimuli ist ein weiteres Charakteristikum des allergischen Asthma bronchiale [214, 261].

Als Grundlage für weiterführende molekulare Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit sollte nun im ersten Teil der Arbeit als „Proof-of-Concept“, die Analyse des *A. lwoffii* F78-induzierten protektiven Effekts auf die Entwicklung einer experimentellen allergischen Atemwegsentzündung im Mausmodell demonstriert werden, die sowohl die Lebend- als auch die Totkeim-Exposition beinhaltet. Hier stellte sich konkret die Frage, ob insbesondere die Totkeimapplikation von *A. lwoffii* F78 die Induktion eines asthmaprotektiven Effekts herbeiführt. Dazu wurden, aufbauend auf dem bereits von Debarry und Kollegen [197] publizierten Versuchsaufbau für das Akutmodell des experimentellen Asthmas BALB/c Mäuse präventiv mit *A. lwoffii* (lebend- bzw. ethanolabgetötet) intranasal behandelt und anschließend mit OVA sensibilisiert und provoziert, um eine asthmatische Entzündungsreaktion zu induzieren. In anschließenden Analysen wurde der asthmaprotektive Effekt von *A. lwoffii* F78 in Bezug phänotypische Parameter, wie allergenspezifische Antikörper im Serum, Differenzierung der Zellpopulationen in der BAL, Zytokinproduktion, Lungenfunktionsmessung sowie Lungenhistologie untersucht, um die Entwicklung eines allergischen Phänotyps zu charakterisieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass die Lebend- und Totkeim-Exposition mit dem Bakterium *A. lwoffii* F78 zu einer signifikanten Reduktion des asthmatischen Phänotyps in den Tieren führt. Unter der Bedingung einer bereits etablierten T_H2 -Immunantwort fanden sich persistierend hohe Titer für allergenspezifisches IgE und IgG1 im Serum der Positiv-Kontrollgruppe nach wiederholter Provokation OVA-sensibilisierter Tiere. Erfahrungsgemäß führt die Sensibilisierung mit OVA im Tiermodell des experimentellen Asthmas zu hohen allergenspezifischen OVA-IgE und OVA-IgG1 Titern [28, 30, 56]. Durch den Erfolg der allergischen Sensibilisierungsreaktion ist die Voraussetzung geschaffen, den Einfluss der *A. lwoffii* F78 Exposition auf die T_H2 -Immunität zu untersuchen.

Dieser Effekt geht mit der Produktion und Sekretion von typischen T_H2 -spezifischen Interleukinen (IL-4, IL-13) einher, die für eine T_H2 -abhängige B-Zell Aktivierung und einen Klassenswitch hin zur IgE- bzw. IgG1-Produktion spricht [28, 29]. Im Gegensatz zu der deutlichen Verbesserung lokaler phänotypischer und funktioneller Parameter durch die Applikation von *A. lwoffii* (Lebend- und Totkeim- Exposition) erfolgte systemisch kein Einfluss auf OVA-spezifische Immunglobulin Titer (IgE, IgG1) im Vergleich zur Positiv-Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die immunmodulatorischen Effekte von *A. lwoffii* F78 im akuten Tiermodell einerseits auf die T-Zellantwort beschränkt sind und andererseits lokale Mechanismen der Allergiereaktion direkt durch die Bakterien beeinflusst werden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen Studien, in denen *A. lwoffii* F78 die allergische Immunantwort der Atemwege signifikant reduzierte und eine deutliche Verbesserung der Atemwegsreaktivität bewirkte, erzielt. So hatte in einem *in vivo*-Mausmodell des experimentellen Asthmas die intranasale Applikation von *A. lwoffii* F78 vor der anschließenden Sensibilisierung mit dem OVA-Antigen keine signifikante Auswirkung auf den allergenspezifischen IgE Titer [197]. Darüber hinaus steht dieses Ergebnis im Einklang mit Daten aus epidemiologischen Studien, in denen gezeigt wurde, dass Kinder, die auf Bauernhöfen aufwuchsen, zwar signifikant weniger allergische Manifestationen aufweisen, dies jedoch unabhängig von einer vorhandenen allergischen Sensibilisierung war [190].

Zur Analyse der lokalen Effekte der *A. lwoffii* Applikation wurde die Produktion der T_H2 -Zytokine IL-5 und IL-13 in den zellfreien Überständen der BAL untersucht. Sowohl die IL-5 als auch die IL-13 Produktion wurde durch die *A. lwoffii* Applikation (Lebend- und Totkeim-Exposition) in OVA-sensibilisierten und provozierten Tieren im Vergleich zur Positiv-Kontrollgruppe signifikant gesenkt. Das von T_H2 -Zellen gebildete IL-5 ist das entscheidende Zytokin für die Reifung und Differenzierung eosinophiler Granulozyten [262]. Eine Behandlung von Mäusen mit einem IL-5 Antikörper reduzierte die pulmonale Eosinophilie [263]. Durch den Beginn einer Allergenprovokation von sensibilisierten Tieren im akuten Stadium der allergischen Reaktion, wurde eine massive, von eosinophilen Granulozyten dominierte Entzündung vor allem in der BAL erreicht. Dieses Ergebnis wurde auch schon in einigen anderen Arbeiten gezeigt [21, 264, 265]. Dies lässt darauf schließen, dass eine IL-5-Reduktion einer der molekularen Mechanismen ist, über den die *A. lwoffii* Applikation den allergischen Phänotyp reduzieren kann, sichtbar an einer Reduktion der Eosinophilenzahl in der BAL sowie am geringeren entzündlichen Infiltrat in der Lungenhistologie, welches zu großen Teilen aus eosinophilen Granulozyten bestand. Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor

des IL-5 ist die Beeinflussung der Lungenfunktion (AHR). Die Atemwegshyperreagibilität (AHR) ist das klinisch auffälligste Merkmal des Asthma bronchiale. Eosinophile Granulozyten und deren Mediatoren stehen in Verdacht in die Induktion einer AHR involviert zu sein [266]. So bilden Eosinophilen-defiziente Tiere keine Becherzellhyperplasie aus, produzieren weniger Schleim in den Becherzellen und antworten auf eine Allergenexposition nicht mit einem hyperreagiblen Bronchialsystem [267]. Neben IL-5 führt IL-13 im Mausmodell ebenfalls zu bronchialer Hyperreagibilität und erhöhter Mukusproduktion [268]. Auch beim Menschen konnte in Lungenbiopsien von Asthmatikern eine erhöhte IL-13 Expression nachgewiesen werden [269]. Die beobachteten reduzierten IL-13 Titer könnten somit zur verbesserten Lungenfunktionsmessung bzw verringerten Atemwegsreagibilität gegenüber MCh sowie der verringerten Zahl an mukusproduzierenden Becherzellen in der Lungenhistologie *A. lwoffii*-exponierter Tiere (Lebend- und Totkeim-Exposition) beigetragen haben. Somit scheint die Suppression der zwei wichtigen T_H2-Zytokine IL-5 und IL-13 durch den Effekt der *A. lwoffii*-vermittelten Asthmaprotektion bedingt zu sein.

Die in der vorliegenden Arbeit detektierte hohe Zahl an Leukozyten, insbesondere der neutrophilen Granulozyten, in der BAL von ausschließlich mit *A. lwoffii*-behandelten Tieren weist auf eine T_H-gesteuerte inflammatorische Antwort, die sich typischerweise gegen Bakterien richtet [275]. Diese Ergebnisse korrelieren mit Befunden anderer Gruppen, die ebenfalls allergieprotektive Effekte durch Bakterien oder mikrobielle Bestandteile wie LPS nachweisen konnten. Hier konnte gezeigt werden, dass aufgrund der wiederholten intranasalen Behandlungen der Mäuse mit relativ hohen Dosen an Bakterien der Anstieg der Leukozytensubpopulationen, gemessen an dem starken Einstrom von Neutrophilen, Makrophagen und Lymphozyten, als Reaktion auf die mikrobielle Stimulation charakteristisch ist [270-274].

Die vorliegende Arbeit liefert erstmals Daten darüber, dass in einem direkt vergleichenden Experiment die Lebendkeim- und Totkeim-Exposition von *A. lwoffii* F78 vor und während der Sensibilisierung mit OVA in einem reduzierten asthmatischen Phänotyp resultiert. Interessanterweise schien die Ethanol-Inaktivierung die Aktivität der Bakterien bezüglich des protektiven Effekts auf den asthmatischen Phänotyp nicht zu beeinflussen. Dieser Effekt scheint von der alkoholbeständigen LPS-Struktur der gram-negativen Bakterien abhängig zu sein, die durch eine Ethanol-Inaktivierung der Bakterien nicht neutralisiert werden kann. In dieser Hinsicht ist bekannt, dass das LPS gram-negativer Bakterien die zentrale Struktur ist, welche für die allergieprotektiven Effekte verantwortlich ist. Diverse Studien bestätigten für LPS und bakterielle DNA anhand von *in vivo*-Mausversuchen protektive Effekte bezüglich

einer Allergieentstehung [199, 200, 245]. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass sowohl der Zeitpunkt als auch die Dosis der LPS-Behandlung entscheidend ist. So wurde die allergische Immunantwort unterdrückt, wenn die LPS-Behandlung vor der Sensibilisierung der Tiere stattfand, jedoch verstärkt, wenn die Behandlung erst während der Provokation mit dem Allergen erfolgte [246, 270, 274, 276]. Die in diesen Studien erhobenen Daten belegen zudem, dass die protektive Wirkung der LPS-Exposition über eine etablierte anti-allergische T_H1-Immunantwort gesteuert wird [245, 270, 277]. Folglich führte die LPS-Gabe zu einer erhöhten IFN γ -Zytokinproduktion, die mit der Reduktion des T_H2-Zytokinmilieus und des asthmatischen Phänotyps korrelierte [245, 270, 277]. Die in der vorliegenden Arbeit zu erwartende erhöhte IFN γ -Sekretion nach *A. lwoffii* Exposition konnte in diesem Experiment nicht untersucht werden. Insgesamt führte die Totkeim-Exposition *A. lwoffii* F78 jedoch zu einer signifikanten Reduktion des asthmatischen T_H2-Phänotyps (Atemwegsentzündung, Mukusproduktion, Atemwegshyperreagibilität) in den Tieren, wobei dieser Effekt auf eine T_H1-Stimulation und der damit verbundenen Veränderung der T_H1/T_H2-Balance zurückzuführen ist.

Die Befunde der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass insbesondere die Ethanol-inaktivierten Kuhstallbakterien als potentielle Kandidaten für immuntherapeutische Behandlungsstrategien in Betracht gezogen werden können. Ein weiterer Ansatzpunkt für das Langzeit-Ziel bei der Weiterentwicklung von allergieprotektiven Therapiestrategien, wäre die Untersuchung der zugrunde liegenden Mechanismen des *A. lwoffii*-LPS. Möglicherweise könnte das LPS von *A. lwoffii* den Einsatz des gesamten Bakteriums im Hinblick auf die Prävention als potentiell immunmodulatorisch wirksame Einzelkomponente ersetzen. Um dies endgültig zu klären, müssten nun *in vivo*-Mausversuche mit dem *A. lwoffii*-LPS folgen.

4.2 Induktion eines proinflammatorischen Zytokinprofils in Zellen des innate Immunsystems durch mikrobielle Stimulation mit *A. lwoffii* und Cholera Toxin

Von besonderer Bedeutung ist die Rolle des innate Immunsystems bei der mikrobiell induzierten Allergieprotektion. In murinen Modellsystemen, zur Erforschung der allergischen Atemwegsentzündung, wird dem Zelltyp der Makrophagen eine zentrale Rolle als mögliches Ziel für eine Intervention bei der Modulation der Immunreaktivität zugeschrieben. Es ist vorstellbar, dass durch die Wechselwirkung zwischen aktivierten Makrophagen bzw. deren Mediatoren und T-Zellen eine immunologische Imbalance hervorgerufen werden kann, die die Entwicklung einer allergischen Atemwegsentzündung begünstigt.

Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass die *A. lwoffii* Exposition eine Aktivierung der angeborenen Immunität in den Muttertieren zur Folge hat und diese essentiell für den Asthma-Schutz der Nachkommen ist [198]. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen deutlich, dass durch die *A. lwoffii* Exposition eine Immunmodulation im Organismus möglich ist, die durch das innate Immunsystem vermittelt wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden in weiterführenden Untersuchungen die Erkenntnisse aus dem Tiermodell in ein *in vitro* Modell übertragen, um bezüglich der hintergründigen Fragestellung beteiligter Mediatoren der angeborenen Immunantwort, den Mechanismus des Asthma-protectiven *A. lwoffii* Effekts genauer zu analysieren. Dafür wurde zunächst eine genaue Analyse des durch *A. lwoffii*-induzierten Zytokinprofils der angeborenen Immunantwort durchgeführt. Murine Makrophagen-Kulturzellen (J774) wurden mit *A. lwoffii* behandelt und die Expression charakteristischer Zytokine der angeborenen Immunantwort (IL-6, TNF α , IL-1 β , IL-17A und IFN γ) in Bezug auf die Zeit- und Dosisabhängigkeit in einer Kinetik quantifiziert. Erwartungsgemäß zeigte sich für die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF α ein Anstieg der Proteinexpression bereits nach 4 Stunden, wobei die maximale Expression nach 24 Stunden erreicht war. Beide Zytokine, sowohl IL-6 als auch TNF α verhielten sich in ihrer Reaktivität sehr ähnlich und das Expressionslevel bei der Konzentration von 1×10^6 CFU/ml *A. lwoffii* für die Expositionsdauer von 24 Stunden stellte repräsentative Stimulationsbedingungen für die Induktion dar. Ein dosisabhängiger Anstieg der Zytokin-Konzentration von IL-6 und TNF α konnte ebenfalls nach Stimulation mit LPS erreicht werden. In einem weiteren Versuch wurden primäre Makrophagen aus der Peritonealhöhle unbehandelter BALB/c Mäuse isoliert und mit *A. lwoffii* stimuliert, da diese auch im Tiermodell bei intranasaler Applikation in direktem Kontakt mit *A. lwoffii* gelangen und vermutlich die darauffolgende immunologische Antwort generieren. Hier zeigte sich ebenfalls, dass *A. lwoffii* einen vergleichbaren dosisabhängigen Anstieg der Zytokinproduktion induziert. Die Ergebnisse der IL-6 und TNF α Expression decken sich mit den Zytokindaten aus den Kulturüberständen der J774 Makrophagen-Zelllinie.

Während der Inkubationszeit mit *A. lwoffii* sollten Makrophagen als APCs der angeborenen Immunantwort die Bakterien phagozytieren und aktiviert werden. Um die Aktivierung dieser Zellen zu demonstrieren, wurde über eine gram-negativ Färbung, die zytoplasmatische Lokalisation der Bakterien durch phagozytotische Aktivität der primären Makrophagen mittels mikroskopischer Aufnahmen visualisiert. Diese Ergebnisse bilden die Voraussetzung für die funktionelle Bedeutung der Phagozytose und alle nachfolgenden Untersuchungen der *A. lwoffii*-induzierten Zytokinexpression in Makrophagen. Gram-negative Bakterien wie

A. lwoffii lösen durch ihre Oberflächenstrukturen eine Induktion der angeborenen Immunantwort aus. Durch das innerhalb ihrer Mureinschicht liegende LPS reagieren insbesondere Monozyten und Makrophagen mit der Sekretion von inflammatorischen Zytokinen [219]. LPS wird von einem Lipopolysaccharid-Bindungsprotein (LBP) opsonisiert und dieser Komplex vom CD14-Rezeptor auf phagozytierenden Zellen erkannt und gebunden, was letztlich in einer Aktivierung des TLR4 resultiert. [215-217]. Darüber hinaus findet aber auch eine Aktivierung über TLR2, NOD1 und NOD2 statt [215-217]. Diese führt über verschiedene Signalwege zu einer Aktivierung proinflammatorischer Zytokingene. Dass die untersuchten Zytokine im Rahmen der Kinetik ihr Maximum der Protein-Konzentration nach 24 h erreichen, lässt sich dadurch erklären, dass diese Zytokine von den Zellen neu synthetisiert werden müssen, weil sie nicht in gespeicherter Form vorliegen. Diese Synthese wird von Transkriptionsfaktoren wie NFAT, NfκB oder AP-1 reguliert [281]. Experimente anderer Arbeitsgruppen, die MNCs von BALB/c-Mäusen mit LPS oder *E. coli* stimulierten, fanden in demselben Versuchsaufbau ein zeitlich nahezu identisches Expressionsmuster für IL-6, die quantitativ sogar ähnlich stark war [282]. Auch die Analyse der im Rahmen des Pränatal-Modells mit *A. lwoffii*-behandelten Müttern durchgeführte Versuch, zeigte, dass durch die intranasale Applikation von *A. lwoffii* bei diesen eine Immunantwort auslöst, die mit einer Erhöhung der Zytokine IL-6 und TNFα in BAL und Serum einhergeht und vom Vorhandensein von TLRs in den Muttertieren abhängig ist [198].

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die modulierende Wirkung der Cholera Toxin Exposition auf die Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren durch innate Immunzellen zu untersuchen. Dazu wurden Makrophagen-Kulturzellen für 24 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen des Cholera Toxin Wildtyp-Proteins (CT) sowie der nicht toxischen Cholera Toxin B-Untereinheit (CTB) stimuliert und die Ergebnisse in einer Zytokin-Kinetik analysiert. Beide Cholera Toxin Subtypen (CT und CTB) wiesen *in vitro* keine zellschädigende Wirkung in Makrophagen-Kulturzellen auf. Im Rahmen der Kinetik wurde eine deutliche Expression der IL-6 und TNFα Konzentrationen nach der Behandlung mit CTB (2 µg/ml) beobachtet (Abb. 22). Im Gegensatz zu CTB zeigte die Behandlung mit CT keinen Effekt hinsichtlich der IL-6 und TNFα Produktion in Makrophagen. Demnach scheint die Wirkung des Wildtyp-Proteins keine Rolle in der Ausprägung der proinflammatorischen Zytokinproduktion in Zellen des innate Immunsystems zu spielen. Hier stellt sich die Frage, welche Faktoren bei der Stimulation mit Cholera Toxin eine Rolle spielen, da beide Proteineinheiten die B-Untereinheit enthalten aber dennoch unterschiedliche Wirkungen auf die Zytokinexpression von IL-6 und TNFα in Makrophagen aufweisen. Leider

gibt es zur Zeit kaum Daten über die möglichen Wirkmechanismen bzw. makrophagen-modulatorischen Eigenschaften der Cholera Toxin Exposition und der zelluläre Mechanismus ist noch nicht hinreichend erklärt. Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedliche Wirkungsweise könnte allerdings in der Struktur des Cholera Toxin liegen. Das Cholera Toxin ist ein Exotoxin, das im Inneren der Bakterienzelle produziert und durch ein allgemeines Sekretionssystem ausgeschieden wird. Es gehört zur Klasse der AB-Toxine und besteht aus einem toxischen A-Teil, welcher katalytische Aktivität besitzt sowie mehreren nicht-toxischen B-Untereinheiten, welche die spezifische Bindung an die Zielzelle vermittelt [247]. Die Aufnahme in Zellen geschieht durch rezeptorvermittelte Endozytose (engl. receptor mediated endocytosis, RME). Das eingeschleuste Toxin befindet sich zunächst in einem Endosom, welches üblicherweise während seiner Reifung angesäuert wird [280]. Diese Ansäuerung löst dann die Ausschleusung des A-Teiles aus dem Endosom ins Cytoplasma aus. Somit kann der A-Teil durch ein Enzym gespalten werden und seine toxische Wirkung entfalten [280]. Aufgrund der komplizierten Aufnahme und Aktivierung des CT erscheint es logisch anzunehmen, dass die B-Untereinheit des Toxins, die im wesentlichen für die Bindung verantwortlich ist und eine sogenannte Vektorfunktion aufweist, in seiner nicht-konjugierten Form eine stärkere Bindungskomponente darstellt. Demnach würde diese Komponente eine bessere Aufnahme in die Zellen bewirken. So könnte die Induktion der Zytokinexpression von IL-6 und TNF α durch die CTB-Stimulation in unserem Modell aufgrund der fehlenden A-Untereinheit bedingt sein. Des Weiteren besteht aber auch noch die Möglichkeit, dass die Erkennung des CT-Gesamtproteins über andere Rezeptoren erfolgt, so dass infolge durch Stimulation mit dem CT-Gesamtprotein unterschiedliche Signalkaskaden bzw. inflammatorische Zytokine induziert werden, die im Rahmen unserer Versuchsreihe nicht untersucht worden sind. Dies bleibt allerdings eine Mutmaßung, da bisher nur wenig darüber bekannt ist, welchen Einfluss das CT auf die Regulation der Zytokinexpression in Makrophagen hat. Aus den Ergebnissen dieses Versuchsansatzes kann daher geschlussfolgert werden, dass das CTB ein starkes immunmodulatorisches Potential auf Zellen des innate Immunsystems besitzt. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen Studien, in denen Toxine appliziert wurden, erzielt. Es gibt Hinweise darauf, dass Toxine, wie z.B. das Endotoxin von *Haemophilus influenzae*, bronchiale Epithelzellen zur Produktion von IL-6 anregen [283]. Die in dieser *in vitro* Versuchsreihe erhobenen Daten der CTB Applikation stimmen mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen aus den *in vitro* Versuchen mit der *A. lwoffii* Exposition überein, da auch hier eine erhöhte IL-6 und TNF α Produktion nach einer 24-stündigen Stimulation beobachtet wurde. So unterstreichen die gewonnenen Ergebnisse die

Rolle von mikrobiellen Komponenten bei der Aktivierung des innate Immunsystems und unterstützen das Bestreben die proinflammatorische Makrophagenaktivität durch mikrobielle Exposition weiter zu charakterisieren. Dies könnte zu einem besseren Verständnis der möglichen mikrobiell induzierten, mediatorvermittelten Einflüsse auf das adaptive Immunsystem, die im Verlauf der Pathogenese der allergischen Atemwegsentzündung mit einer protektiven Immunreaktion assoziiert ist, beitragen.

4.3 Stimulation von adaptiven Immunzellen mit *A. lwoffii* und CT exponierten Makrophagen-Kulturüberständen führt zur Zytokinexpression von IL-17, IL-13 und IL-10

Im Rahmen der vorausgehenden Versuche konnte belegt werden, dass *A. lwoffii* und Cholera Toxin (CTB) auch *in vitro* eine inflammatorische Reaktion auslösen und die proinflammatorische Zytokinproduktion von IL-6 und TNF α in Zellen des innate Immunsystems induzieren. Da das angeborene Immunsystem einen wesentlichen Anteil an der Immunaktivierung hat und die nachfolgenden Antworten des erworbenen Immunsystems gerade im Hinblick auf die T_H-Polarisierung beeinflussen kann [209, 210, 211], waren diese Ergebnisse entscheidend und dienten als Grundlage für die Analyse der molekularen Ursachen in adaptiven Immunzellen, die einen Schritt hin zur Aufklärung der protektiven Mechanismen über mikrobielle Stimuli erlauben soll. Um die im *in vivo*-Mausmodell gezeigten allergieprotektiven Fähigkeiten von *A. lwoffii* F78 im Hinblick auf die zu Grunde liegenden Mechanismen näher zu untersuchen, wurden CD4⁺ T-Zellen als Modellsystem gewählt und ein *in vitro* T-Zellsystem etabliert, da diese neben der bereits erwähnten Prägung des Immunsystems auch an der Entwicklung von Allergien maßgeblich beteiligt sind [307, 308, 309].

Zur Analyse der proinflammatorischen Wirkungsweise der *A. lwoffii*-induzierten Makrophagenzytokine IL-6 und TNF α und des Cholera Toxin (CT und CTB)-induzierten Makrophagenzytokins IL-6 wurden CD4⁺ T-Zellen ausschließlich anhand ihres Zytokinprofils charakterisiert. Dazu wurden naive CD4⁺ T-Zellen mit *A. lwoffii* F78 und CT Cholera Toxin (CT und CTB) stimulierten Makrophagen-Kulturüberständen, die ein signifikantes Expressionsniveau von IL-6 und TNF α aufweisen, kultiviert. Wie in Kapitel 3.3.2 (Abbildung 24) gezeigt werden konnte, wurde mit dem *A. lwoffii*-behandelten Makrophagen-Überstand ein signifikanter Konzentrationsanstieg der Expression von IL-17A, IL-13 und IL-10 in naiven CD4⁺ T-Zellen erreicht. Diese unterschiedlichen Zytokin-Konzentrationen

lassen sich mit einer Induktion von naiven $CD4^+/62L^+$ T-Zellen durch *A. lwoffii*- und Cholera Toxin-stimulierte Zytokine erklären. Naive T_H0 -Zellen werden als noch nicht vollständig polarisierte T-Zellen diskutiert, die sowohl T_H1 , T_H2 als auch T_H17 -Zytokine produzieren [299, 300]. Diese Zellen können nachweislich über einen längeren Zeitraum in einem undifferenzierten Zustand existieren und durch weitere Polarisierungssignale dann in Richtung T_H1 , T_H2 oder T_H17 weiter differenzieren, was die Annahme bestätigt, dass eine vollständige Polarisierung durch einen weiteren Kontakt mit mikrobiellen Organismen oder aber mikrobiellen Proteinen möglich ist. [299, 300].

In der nachfolgenden Diskussion werden die untersuchten Zytokine IL-17A, IL-13 und IL-10 der $CD4^+$ T-Zellen zunächst separat betrachtet. In diesen Passagen werden jeweils alle oben aufgeführten Ergebnisse (s. Kapitel 3), d.h. der Einfluss von *A. lwoffii*- und Cholera Toxin-behandelten Makrophagen-Überständen *in vitro* auf naive $CD4^+/62L^+$ T-Zellen im Kontext zueinander diskutiert. Eine zusammenfassender Betrachtung der in *in vitro* und *in vivo* Erkenntnisse wird im letzten Abschnitt der Arbeit (Kapitel 4.5 Mögliche Mechanismen der Allergieprävention durch mikrobielle Stimuli) diskutiert.

IL-17

Die *in vitro* Daten zeigen, dass mit dem *A. lwoffii*-behandelten Makrophagen-Überstand im Vergleich zur Mediumkontrolle ein signifikanter konzentrationsabhängiger Anstieg der Zytokinexpression von IL-17A in naiven $CD4^+$ T-Zellen erreicht werden konnte. Gleiches konnte auch auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Mit den Zellkultur-Überständen der *A. lwoffii*-exponierten Peritonealmakrophagen konnte ebenfalls ein dosisabhängiger Anstieg der Zytokinproduktion wie zuvor mit der Behandlung der Makrophagen-Kulturzellen (J774) beobachtet werden. Durch Ko-Stimulation mit den rekombinanten Proteinen IL-6 und TGF β konnte die Expression des IL-17A in naiven $CD4^+$ T-Zellen ebenfalls induziert werden. Diese ersten Daten führten hier zu der Hypothese, dass die Zytokinexpression von IL-17A in $CD4^+$ T-Zellen durch das *A. lwoffii*-induzierte proinflammatorische Zytokin IL-6 ausgelöst wurde.

In dieser Hinsicht ist bekannt, dass für die Differenzierung von T_H17 -Zellen aus naiven $CD4^+$ Vorläuferzellen das immunmodulatorische TGF β und das proinflammatorische IL-6 essentiell sind, da sie den T_H17 assoziierten Transkriptionsfaktor ROR γ t aktivieren [109,110]. Die vorliegenden Daten aus dem *in vitro* Zellkulturmodell bestätigen diese Ergebnisse auf der Ebene der Zytokininduktion. Für TGF β gibt es im Hinblick auf die Immunmodulation eine Reihe widersprüchlicher Studien. Zwar sind Hinweise darauf vorhanden, dass geringe

Konzentrationen von TGF β die Differenzierung von T_H17-Zellen begünstigen, wogegen stets hohe Konzentrationen des Zytokins für die Entstehung von regulatorischen T-Lymphozyten verantwortlich sind [104, 109]. Desweiteren induziert IL-17 in Granulozyten die Expression von GM-CSF, IL-8 und IL-6 und bewirkt so eine Aktivierung und Attraktion von neutrophilen Granulozyten und eine verstärkte Bildung der Granulozyten (Granulozytopoese) [302]. Neben Daten zur *in vitro* Induktion von IL-17A gibt es auch erste *in vivo*-Versuche in Bezug auf die Immunomodulation über IL-17A und Asthma im Tiermodell. So konnte von Schnyder-Candrian et al. gezeigt werden, dass bei einer bestehenden allergischen Atemwegsentzündung, die Gabe von IL-17A im Maus-Modell, die T_H2-Zytokinproduktion, Eosinophilie und die bronchiale Hyperreagibilität reduzierte [130]. Diese Daten lieferten erstmals Hinweise für eine Immunsuppression durch IL-17A und unterstützen daher auch unsere Hypothese der Immunpolarisierung durch IL-17A, obwohl die Rolle von IL-17A und die Induktion über mikrobielle Komponenten in der Pathogenese des Asthma bronchiale kontrovers diskutiert wird und noch nicht vollständig geklärt ist. Daneben konnte gezeigt werden, dass in Mäusen und Menschen durch die Einwirkung von Agrarstaub die T-Zell Polarisation in Richtung T_H1 und T_H17 getrieben wird [310]. Dies lässt vermuten, dass noch nicht analysierte Komponenten im Staub, bzw. mikrobielle Komponenten für die Zusammensetzung der T_H Subtypen und somit für das Immunsystem eine maßgebliche Rolle spielen könnten.

Basierend auf den Erkenntnissen zur Induktion des IL-17A durch die *in vitro* Stimulation über IL-6 wurden naive CD4⁺/62L⁺ T-Zellen mit Überständen der *A. lwoffii*-exponierten Makrophagen-Kulturzellen (J774) in Kombination mit neutralisierenden Antikörpern kultiviert. Durch Neutralisierung mit dem anti-IL-6 und anti-TGF β Antikörper, welche die Aufnahme von IL-6 und damit jegliche Aktivierung der Zytokinexpression von IL-17A verhindern sollte, wäre eine Abnahme der IL-17A Expression zu erwarten gewesen. Hingegen dieser Erwartung waren keine hemmenden Einflüsse auf die Freisetzung von IL-17A zu beobachten. Ein Grund für dieses unerwartete Ergebnis könnten die unterschiedlichen Signalkaskaden bei der Differenzierung von T_H17-Zellen aus naiven CD4⁺ Vorläuferzellen sein. Neben der Aktivierung des IL17A über den Hauptsignalweg von IL-6, wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist die Aktivierung über den alternativen IL-21 Signalweg auch von Bedeutung bei der Induktion T_H17-polarisierender CD4⁺ T-Zellen und der IL-17A Zytokinexpression [109, 110]. Es ist also durchaus denkbar, dass trotz vorhandener Neutralisierung mit dem anti-IL-6 und anti-TGF β Antikörper bzw. fehlender IL-6 Stimulation eine Beteiligung von IL-21 die Aktivierung der Zytokinexpression von

IL-17A in CD4⁺ T-Zellen induziert hat. Dies würde die Freisetzung von IL-17A bei dieser Versuchsreihe belegen. Die Induktion des IL-21 durch *A. lwoffii* wurde allerdings bisher im Zellkultursystem nicht untersucht, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass in den Überständen der *A. lwoffii*-exponierten Makrophagen-Kulturzellen (J774) IL-21 vorhanden war, welches anstelle von IL-6 als Mediator fungiert. Zur weiteren Aufklärung sollte daher in folgenden Experimenten das IL-21 sowie dessen Einfluss auf naive CD⁺ T-Zellen nach *in vitro* Stimulation mit Überständen der *A. lwoffii*-exponierten Makrophagen-Kulturzellen (J774) untersucht werden. Folglich könnte eine zusätzliche Neutralisation mit einem anti IL-21 Antikörper in Kombination mit dem anti-IL-6 und anti-TGFβ Antikörper die Zytokinexpression von IL-17A verhindern.

Zudem konnte gezeigt werden, dass die IL-17A Zytokinexpression in naiven CD⁺ T-Zellen neben der Stimulation mit *A. lwoffii*-exponierten Makrophagen-Kulturüberständen durch einen weiteren, mikrobiell stimulierten Makrophagen-Kulturüberstand (J774) aktiviert werden kann. Hier scheint die Behandlung mit dem Kulturüberstand des Cholera Toxin Wildtyp-Proteins (CT) einen signifikanten Einfluss auf die erhöhte IL-17A Zytokinexpression zu haben und somit für die erhöhten Spiegel an IL-17A mitverantwortlich zu sein. Ähnliche Verhältnisse zeigten sich auch auf mRNA-Ebene. Da in vorausgehenden Versuchen die gesteigerte IL-6 Expression nach der *in vitro* CT Stimulation von murinen Makrophagen-Kulturzellen ausblieb, scheint ein direkter Zusammenhang von IL-6 und der verstärkten Induktion von IL-17A in CD4⁺ T-Zellen zunächst paradox. Die Ergebnisse dieser Versuche deuten dennoch darauf hin, dass die IL-17A Produktion in CD4⁺ T-Zellen möglicherweise über einen anderen stimulierenden Einfluss aktiviert wurde. Dieser Effekt legt nahe, dass die verstärkte IL-17A Expression anstelle von IL-6, ebenfalls über den oben erwähnten IL-21-abhängigen, alternativen Signalweg aktiviert wurde. Diese Vermutung bedarf allerdings noch eingehender Untersuchungen bezüglich der proinflammatorischen Zytokinexpression in Makrophagen-Kulturzellen induziert durch das Cholera Toxin Wildtyp-Protein (CT). Die Daten dieser Versuchsreihe unterstützen die Beobachtungen einer verstärkten *A. lwoffii*-induzierten IL-6 Expression in murinen Makrophagen-Kulturzellen *in vitro* und einer direkt damit einhergehenden IL-17A Expression in naiven CD4⁺ T-Zellen. Dies bestärkt den bisherigen Wissenstand mit der Annahme, dass T_H17 Zellen mit ihrem Leitzytokin IL-17A eine bedeutende Rolle bei der mikrobiell stimulieren Aktivierung spielen. Da die gesteigerte IL-6 Sekretion mit protektiven Effekten bei der Entwicklung des Asthma bronchiale assoziiert und die Entstehung der allergischen Erkrankung bereits in der frühen Phase der T-Zell-Entwicklung determiniert ist, ist ein direkter Zusammenhang von *A. lwoffii*

und der Induktion des IL-17A über das Mediatorzytokin IL-6 erstmals nachgewiesen worden.

IL-13

Die Kultivierung der naiven CD4⁺ T-Zellen mit Überständen der *A. lwoffii*-stimulierten Makrophagen-Kulturzellen und Primärkulturzellen (Peritonealmakrophagen) führte hingegen zu sehr unterschiedlichen Resultaten im Hinblick auf die IL-13 Produktion, wobei auf Proteinebene eine Zunahme der Zytokininduktion zu verzeichnen war. Auch die Überstände der Makrophagen-Kultur (J774), die mit beiden Cholera Toxin Subtypen (CT und CTB) stimuliert wurden führten zu einer Freisetzung von IL-13 mit der geringeren Konzentration des Überstandes (1:10). In diesem Fall waren jedoch keinerlei signifikante Auswirkungen auf die Expression des IL-13 messbar. Die Ergebnisse des Proteinnachweises und der mRNA Expression sind dagegen kontrovers. Eine Veränderung der Expressionslevel der gemessenen mRNA-Spiegel von IL-13 konnte nicht gezeigt werden. Häufig werden fehlende Korrelationen zwischen mRNA- und Protein-Expressionen an unterschiedlichen Kinetiken aufgrund von unterschiedlichen Halbwertszeiten von mRNA und Proteinen beobachtet [311, 312, 313]. Andererseits können posttranskriptionelle Abläufe wie Splicen, nukleozelluläre Transporte und mRNA-Degradation die gemessenen mRNA-Spiegel beeinflussen und einen Effekt auf die Sensitivität der Nachweismethode ausüben. Ein neutralisierender anti-IL-6 Antikörper, der zur Neutralisierung des IL-6 in Makrophagen-Überständen (*A. lwoffii*-exponiert) eingesetzt wurde, zeigte einen starken Einfluss auf die Zytokinproduktion und reduzierte signifikant die IL-13 Freisetzung in CD4⁺/62L⁺ T-Zellen. Der bei dem Einsatz des rekombinanten IL-6 auftretende Anstieg scheint ebenfalls spezifisch zu sein, da sich gleichermaßen durch Inhibition mit dem neutralisierenden anti-IL-6 Antikörper, die Konzentrationen des IL-13 supprimieren ließ. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass das IL-6, die naiven CD4⁺/62L⁺ T-Zellen dahingehend beeinflusst, eine Induktion des T_H2-Zytokins IL-13 auszulösen.

T_H2 assoziierte Zytokine werden hauptsächlich von den T_H2 polarisierten Zellen gebildet. Sie definieren sich durch die Sekretion eines spezifischen Zytokinmusters (IL-4, IL-5, IL-13) und entstehen durch Aktivierung und Differenzierung naiver T_H0-Zellen nach Allergenkontakt. IL-5 und IL-13 führen im Mausmodell zu bronchialer Hyperreagibilität und erhöhter Mukusproduktion [268]. Im Mausmodell der akuten allergischen Atemwegsentzündung, die ebenfalls durch das Vorkommen von IL-5 und IL-13 gekennzeichnet ist, führte die i.n. Applikation von *A. lwoffii* zu einer signifikanten Reduktion von IL-5 und IL-13 nach Allergenprovokation (s. Kapitel 4.1). Auch die pränatale Exposition mit *A. lwoffii* F78, die

ebenfalls zu einer Verminderung des asthmatischen Phänotyps in den Tieren führt, zeigte eine Verschiebung der T_H1/T_H2 -Balance in Richtung T_H1 auf und ging einher mit einer erniedrigten IL-4, IL-5 und IL-13 Produktion durch MNCs von pränatal exponierten Mäusen [301]. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die T_H2 assoziierten Zytokine IL-4 und IL-5 durch die Einwirkung von *A. lwoffii*-behandelten J774-Makrophagen-Kulturüberständen in naiven $CD4^+/62L^+$ T-Zellen fast vollständig supprimiert wurden, da die Sekretion von IL-4 und IL-5 kaum zu verzeichnen war. Die Ergebnisse für IL-4 und IL-5 unterstützen die Hypothese, dass *A. lwoffii*-induzierte Makrophagenzytokine einen wesentlichen Faktor für die Entwicklung einer T_H2 -dominierten Immunantwort darstellen und stimmen mit den Ergebnissen aus dem Tiermodell überein, da auch hier eine verminderte IL-4 und IL-5 Produktion mit einem *A. lwoffii*-induzierten, geringeren allergischen Phänotyp verbunden war. Die demnach zu erwartende Suppression der IL-13 Sekretion im Zellkultursystem korreliert nicht mit den Ergebnissen aus den *in vivo* Versuchen und scheint somit einen paradoxen Zusammenhang darzustellen. Da diese Prozesse im *in vivo* Modell entzündungsgesteuert ablaufen und im Zellkultursystem keine Allergenprovokation in den Atemwegen vorlag, könnte dies eine Erklärung für die im Vergleich zum *in vivo* Modell gewonnenen Ergebnissen darstellen. Diese Studienergebnisse liefern dennoch erste Hinweise, dass *A. lwoffii*-induzierte Makrophagenzytokine die Entwicklung und Ausprägung von naiven $CD4^+/62L^+$ T-Zellen beeinflussen können. Hier kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass bedingt durch die Vielzahl an möglichen biochemischen Reaktionen und „Pathways“ der innate und adaptiven Immunantwort weitere Mechanismen essentiell beteiligt sind.

IL-10

Während der *in vitro* Kultivierung von $CD4^+/62L^+$ T-Zellen wurde eine signifikante, konzentrationsabhängige Expression von IL-10 mit dem *A. lwoffii*-behandelten Makrophagen-Kulturüberstand und mit dem Peritonealmakrophagen-Überstand festgestellt. Der gravierende IL-10 Anstieg der Zytokin-Konzentration konnte gleichermaßen auf mRNA-Ebene bestätigt werden. Allerdings konnte kein signifikanter Anstieg der IL-10 Produktion mittels der beiden Cholera Toxin-behandelten Überstände (CT und CTB) verzeichnet werden, wobei ein klarer Trend ohne Signifikanzniveau für eine Induktion detektiert werden konnte. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte weiterhin ein Anstieg der IL-10 Produktion durch Ko-Stimulation von $CD4^+/62L^+$ T-Zellen mit rekombinanten IL-6 und TGF β gezeigt werden. Zur Neutralisierung von IL-6 im Überstand der *A. lwoffii*-exponierten Makrophagen-Kulturzellen wurden auch hier neutralisierende anti-IL-6 und anti-TGF β Antikörper

eingesetzt, um die Aktivierung der Zytokinexpression von IL-10 in CD4⁺/62L⁺ T-Zellen über IL-6 zu verhindern. Die anti-IL-6 und anti-TGFβ Behandlung des Makrophagen-Überstands (*A. lwoffii*-exponiert) induzierte eine deutlich schwächere IL-10 Zytokinexpression in CD4⁺ T-Zellen. Diese Beobachtung korreliert auch mit den Ergebnissen der *in vitro* Induktion mit rekombinanten IL-6 und bestätigt die Annahme, dass die Zytokinexpression von IL-10 in naiven CD4⁺/CD62L⁺ durch das proinflammatorische Zytokin IL-6 (*A. lwoffii*-induziert in Makrophagen) beeinflusst wird. In aktuellen Studien wird IL-10 überwiegend regulatorischen T-Zellen (Treg) zugeschrieben [303]. So dämpfen diese Zellen mittels IL-10 sowohl T_H1- als auch T_H2-dominierte Antworten des Immunsystems [303]. So wurde in einem von Wills-Karp et al. aufgestelltem Gegenregulations-Modell postuliert, dass mikrobielle Stimulationen jeglicher Art über eine IL-10 Induktion Asthma-protektiv wirken [304]. Die wesentlichen Zellen die neben Tregs als Quelle von IL-10 in Frage kommen, sind Makrophagen, B-Zellen und DCs sowie alle T-Helfer-Subpopulationen, die ebenfalls Bestandteil der MNC-Population sind [305, 306]. Die verstärkte Produktion von IL-10 in unserem Zellkultursystem lässt vermuten, dass sich hier eine T_H17-Subpopulation aus naiven CD4⁺/CD62L⁺ differenziert hat, die neben IL-17A auch parallel die IL-10 Produktion induziert. In der Literatur werden für T_H17-Zellen zwei unterschiedliche Subtypen charakterisiert, die sich grundlegend in ihrer Funktion und Pathogenität unterscheiden, wobei die unterschiedlichen Signal- und Differenzierungswege, Pathogenitätsfaktoren für die Generierung beider T_H17-Subpopulationen darstellen [120, 121]. Dabei handelt es sich um T_H17-Zellen, die neben der Expression von IL-17A, die Ko-Expression der Zytokine IFNγ oder IL-10 durchführen [111, 112, 113, 114]. Die Ko-Expression von IFNγ (T_H17/T_H1-Phänotyp) führt dabei zur Ausprägung pathogener Eigenschaften innerhalb der T_H17-Zellpopulation, wie z.B. bei der inflammatorischen Erkrankung Morbus Crohn, wo neben IL-17A die IFNγ Koproduktion von T_H17-Zellen in entzündlich veränderten Geweben der Mukosa beobachtet wurde [115, 116]. Während T_H17-Zellen die neben IL-17A IFNγ koproduzieren über den „alternativen“ TGFβ-unabhängigen Differenzierungsweg (IL-23 oder IL-1β induziert) induziert werden, wird für IL-10 ko-produzierende T_H17-Zellen, welche unter IL-6 enthaltenden Bedingungen differenziert werden, ein TGFβ-abhängiger Differenzierungsweg diskutiert [117, 118, 119]. In einem Mausmodell der Multiplen Sklerose wurden unter IL-6 und TGFβ enthaltenden Bedingungen IL-10 ko-produzierende T_H17-Zellen als Subtyp identifiziert, die keine Krankheitssymptome und neuroinflammatorischen Veränderungen des ZNS ausgelöst haben [118, 119]. Folglich wurden für diese Subpopulation an IL-10 produzierenden T_H17-Zellen anti-inflammatorische, immunsuppressive und protektive Eigenschaften bei entzündungs-

bedingten Immunantworten zugesprochen [114, 115]. Die Ergebnisse dieser Studien unterstützen die Annahme, dass es sich in unserem Zellkultursystem mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine IL-17A und IL-10 koproduzierende T_H17-Population handelt, die sich nach Kultivierung mit *A. lwoffii*-exponierten Makrophagen-Kulturüberständen, d.h. IL-6 Freisetzung, aus naiven CD4⁺/62L⁺ T-Zellen differenziert hat. Die Tatsache, dass in unserem Zellkultursystem die IFN γ Zytokinexpression durch die Einwirkung von *A. lwoffii*-behandelten J774-Makrophagen-Kulturüberständen in naiven CD4⁺/62L⁺ T-Zellen supprimiert wurde, bestätigt die Abwesenheit von IFN γ und somit den Differenzierungsweg der IL-17A und IL-10 Koproduktion. Somit unterstützen diese Daten die Hypothese, dass naive CD4⁺/62L⁺ T-Zellen während der Kultivierung der *A. lwoffii*-behandelten J774-Makrophagen-Kulturüberständen, welche IL-6 enthalten, die *in vitro* Zytokinexpression von 17A, IL-10 und IL-13 induzieren. Dies und die Ergebnisse der *in vivo* Daten lassen vermuten, dass eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren der angeborenen Immunantwort durch mikrobielle Stimulation die Immunpolarisierung fördern, wie auch in gewissem Maße die Immunsuppression unterstützen, was schließlich im Zusammenspiel von allergieassoziierten Mechanismen resultiert.

Unterschiede in der Promotor-Methylierung von IL-17A in naiven CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit *A. lwoffii*-behandelten Kulturüberständen

Die vorliegende Arbeit bestätigt die Hypothese, dass das proinflammatorische Zytokin IL-6, durch *A. lwoffii* Stimulation in Makrophagen, die Induktion von IL-17A in CD4⁺ T-Zellen beeinflusst und darüber hinaus wie sich auf zellulärer Ebene die Zytokinproduktion *in vitro* verändert. Des Weiteren wurde untersucht, ob die Modulation der IL-17A Zytokinexpression mit epigenetischen Veränderungen assoziiert ist bzw. der Methylierungsstatus der proximalen Promotorregion des IL-17A Gens indessen einen möglichen Mechanismus für die *in vitro* Regulation der Zytokinproduktion darstellt. Es konnte somit gezeigt werden, dass der Methylierungsstatus am IL-17A Promotor ein relativ hohes absolutes Methylierungsniveau und ein Methylierungsgrad von 78 % bis 87 % aufweist. Leider konnten mit diesem Methylierungsassay aufgrund von zu geringer Menge an gewonnenem Zellmaterial keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, um valide Ergebnisse zu erzielen. Diese Daten unterstützen dennoch die Rolle der DNA-Methylierung bei der Regulation der Zytokinexpression in CD4⁺ T-Zellen und den möglicherweise bevorzugten Einfluss auf die epigenetische Regulation der IL-17A-Genaktivität.

4.4 Cholera Toxin Exposition führt zu einer Reduktion der akuten allergischen Atemwegsentzündung im Mausmodell des experimentellen Asthmas

Zur Analyse, ob das Cholera Toxin bei der Entwicklung der allergischen Atemwegsentzündung eine protektive Rolle spielt, wurde aufbauend auf einem bereits innerhalb der Arbeitsgruppe entwickelten Modell der akuten allergischen Atemwegsentzündung die Möglichkeit genutzt, die Etablierung und Charakterisierung der Cholera Toxin Exposition *in vivo* zu verwirklichen. Für die Behandlung von Tieren im Modell des experimentellen Asthmas war es von Bedeutung, eine Applikationskonzentration zu finden, die bei einer fünfmaligen Behandlung über einen Expositionszeitraum von 20 Tagen keinerlei Unverträglichkeiten in der Maus bzw. zytotoxische Eigenschaften auf Immunzellen aufwies. Die Dosis von 2 µg/Applikation wurde gut vertragen und es kam zu keinerlei detektierbarem Einfluss auf die behandelten Tiere sowohl hinsichtlich des Phänotyps (Gewicht, Fell, Verhalten) als auch auf zellulärer Ebene (Leukozytendifferenzierung aus dem Blut). Zur Analyse der immunmodulatorischen Wirksamkeit von Cholera Toxin auf die Entstehung und Ausprägung des asthmatischen Phänotyps wurden die Tiere vor und während der Sensibilisierung intranasal mit CT bzw. CTB behandelt und mit OVA provoziert, um eine allergische Atemwegsentzündung zu induzieren. In anschließenden Analysen wurden phänotypische Parameter, wie allergenspezifische Antikörper im Serum, Differenzierung der Zellpopulationen in der BAL, Zytokinproduktion (LK und BAL), Lungenfunktionsmessung sowie Lungenhistologie untersucht, um die Entwicklung eines allergischen Phänotyps zu charakterisieren. Daneben wurde auch die Produktion proinflammatorischer Zytokine nach der *in vivo* Kurzzeitstimulation mit CT und CTB lokal (BAL) und systemisch (Serum) untersucht. Zum Zeitpunkt der Provokation mit einem Allergen-Aerosol haben die Tiere bereits eine ausreichende Anzahl allergenspezifischer Immunzellen (T_H2-Zellen, B-Zellen) ausgebildet, die dann eine lokale Atemwegsentzündung hervorrufen können, die sich durch Eosinophilie, AHR und Mukushypersekretion auszeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein deutlicher Effekt der erfolgreichen Sensibilisierung anhand der erhöhten IgE- und IgG1-Produktion im Serum gemessen. Infolge der Cholera Toxin (CT und CTB) Exposition kam es jedoch zu keiner signifikanten Reduktion der T_H2-assoziierten IgE und IgG1 Antikörper in OVA-sensibilisierten Tieren. Dies geht einher mit Beobachtungen der Phänotypanalyse, in der *A. lwoffii* die lokale pulmonale Entzündungsreaktion erfolgreich reduzierte, auf die systemische Komponente des IgE-Spiegels aber keinen Einfluss nehmen konnte (s. 4.1) [190].

Die fünfmalige i.n. Applikation des Cholera Toxin Wildtyp-Proteins (CT) vor und während erfolgter Sensibilisierung gegenüber OVA führte zu einer Reduktion der bronchialen Hyperreagibilität, einer Verminderung der Eosinophilenzahl in der BAL und in der Lungenhistologie. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Zytokindaten der *in vivo* CT Applikation. Bei der Analyse des lokalen Entzündungsgeschehens führte die CT Applikation zu einer signifikanten Reduktion der T_H2-Zytokine IL-5, IL-13 in der BAL und IL-4, IL-5 und IL-13 in den Überständen OVA-stimulierter MNCs aus den bronchialen LK. Im Gegensatz dazu, konnte infolge der Behandlung mit CTB kein protektiver Effekt in Bezug auf die Reduktion der pulmonalen Eosinophilie festgestellt werden. Allerdings wurde die T_H2-Zytokinproduktion in der BAL (IL-5, IL-13) und in den LK (IL-4, IL-5, IL-13) im Vergleich zur Positiv-Kontrollgruppe gesenkt. Die beobachteten reduzierten IL-13 Titer, entscheidend für die Ausprägung einer AHR, könnten somit zur verbesserten Lungenfunktionsmessung CTB-exponierter Tiere beigetragen haben [87, 88]. Das Entzündungsbild der akuten Entzündungssituation zeigte zudem eine Verschiebung der Anteile der Leukozytensubpopulationen innerhalb des BAL-Infiltrats. Während die CT-Behandlung neben einer reduzierten Eosinophilie zu einer starken Zunahme der neutrophilen Granulozyten führte, konnte infolge der CTB-Applikation keine Neutophilie detektiert werden. Neutrophile Granulozyten werden in Mausmodellen der akuten allergischen Atemwegsentzündung aufgrund phagozytotischer Aktivität, bei Exposition mit mikrobiellen Bestandteilen oder bakteriellen Toxinen detektiert [284]. In unserem Modell scheint dieser Effekt von den immunmodulatorischen Eigenschaften der A-Untereinheit des CT Wildtyp-Gesamtproteins abhängig zu sein. Die toxische A-Untereinheit ist für die Pathogenität des *Vibrio cholerae* verantwortlich, während die nicht-toxische B-Untereinheit (CTB) eine sog. Vektorfunktion aufweist, welche die rezeptorvermittelte Aufnahme in Epithelzellen der Schleimhäute (Atemwegs- oder Darmmukosa) bewirkt [247, 255, 256]. Somit könnte die Suppression der neutrophilen Granulozyten durch die CTB-Applikation, aufgrund der fehlenden immunstimulatorischen Wirkung der A-Untereinheit bzw. des CT-Gesamtproteins bedingt zu sein.

Um zu klären ob die Reduktion der T_H2-Antwort durch eine Verschiebung des T_H1/T_H2 Gleichgewichts zugunsten von T_H1 verursacht sein könnte, wurde die Zytokinproduktion des IFN γ untersucht. Im Rahmen der Hygiene-Hypothese wird eine fehlende T_H1-Stimulation durch mangelnde Exposition gegenüber Mikroorganismen als immunologischer Mechanismus der Asthmaentstehung diskutiert. Dies führt zu einer Imbalance des T_H1/T_H2-Gleichgewichts mit einer Dominanz proasthmatischer T_H2-Zellen [207]. *In vivo* konnte bereits gezeigt

werden, dass die mikrobielle Stimulation über $\text{IFN}\gamma$ eine Reduktion von $\text{T}_{\text{H}2}$ -Zytokinen induzieren kann [284] und eine $\text{IFN}\gamma$ -Exposition zu einem Rückgang der etablierten Atemwegsentzündung sowie zu einer Inhibition der $\text{T}_{\text{H}2}$ -Proliferation *in vitro* führt [286, 287]. Die demnach in der vorliegenden Arbeit zu erwartende erhöhte $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion nach der CT Exposition konnte jedoch nicht beobachtet werden. Insgesamt lässt sich daher der protektive CT-Effekt, der mit einer Reduktion der $\text{T}_{\text{H}2}$ -Zytokine korreliert, nicht durch eine Verschiebung der $\text{T}_{\text{H}1}/\text{T}_{\text{H}2}$ -Balance zugunsten von $\text{T}_{\text{H}1}$ bzw. durch den regulatorischen Effekt der erhöhten $\text{IFN}\gamma$ -Produktion erklären. Ebenso wie in der vorliegenden Arbeit wurden auch in anderen Studien verringerte Zytokin-Konzentrationen sowohl von $\text{T}_{\text{H}2}$ - als auch von $\text{T}_{\text{H}1}$ -Zytokinen nach mikrobieller Stimulation in allergen-sensibilisierten Mäusen detektiert. Repa et al. fanden beispielsweise erniedrigte IL-5 und $\text{IFN}\gamma$ Titer in Milzzellen, die mit dem Birkenpollenallergen rBet restimuliert worden waren. Die Milzzellen stammten aus Mäusen, die zunächst mit *L. lactis* intranasal behandelt worden waren und anschließend mit rBet sensibilisiert wurden [288]. Ohno et al. verabreichten *Bifidobacterium bifidum* G9-1 oral an BALB/c-Mäuse und sensibilisierten diese mit OVA. Auch hier wurden in der Tendenz erniedrigte IL-5 und $\text{IFN}\gamma$ Titer in den Milzzellen der Interventionsgruppe gefunden [289]. Die bei diesen Studien beobachtete parallele Reduktion von $\text{T}_{\text{H}1}$ - und $\text{T}_{\text{H}2}$ -Zytokinen nach Bakterienexposition stehen im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und weisen auf einen von der $\text{T}_{\text{H}1}/\text{T}_{\text{H}2}$ -Balance unabhängigen Mechanismus der mikrobiell-vermittelten Asthmaprotektion hin. Zur weiteren Aufklärung der molekularen Mechanismen sollten daher in folgenden Experimenten weitere Zytokine in die Analysen mit einbezogen werden, um neben $\text{T}_{\text{H}1}$ - und $\text{T}_{\text{H}2}$ -Zellen mögliche, beteiligte T-Zellzytokine und T-Zellpopulationen zu identifizieren, die für die asthmaprotektiven Eigenschaften des CT im Tiermodell verantwortlich sein könnten.

Neben den Zytokinen aus dem Bereich der erworbenen Immunität wurden in weiteren Versuchsgruppen im Rahmen der *in vivo* Cholera Toxin Applikation, Zytokine wie IL-6 bzw. $\text{TNF}\alpha$ lokal und systemisch untersucht. Wie bereits erwähnt spielt im Pränatal-Modell nach Erkenntnissen unserer Arbeitsgruppe IL-6 eine besondere Rolle bei der Übertragung des Asthmaschutzes von Muttertieren auf den Nachwuchs. So zeigte sich, dass die *A. lwoffii*-vermittelte Asthmaprotektion vom Vorhandensein der TLRs in den Muttertieren abhängig ist und deren Stimulation gefolgt ist von erhöhten IL-6 Titern in BAL und Serum [198]. In der vorliegenden Arbeit führte die *in vivo* Kurzzeitstimulation mit CTB zu einem signifikanten Anstieg der IL-6 und $\text{TNF}\alpha$ Konzentration in der BAL, wohingegen mit CT kaum eine Induktion zu verzeichnen war. Insgesamt stimmen die BAL-Zytokindaten der *in vivo*

Kurzzeitstimulation mit den Resultaten der *in vitro* Experimente überein, da die proinflammatorische Zytokinproduktion von IL-6 und TNF α in murinen Makrophagen-Kulturzellen lediglich mit der CTB Behandlung induziert werden konnte. Im Gegensatz zu der lokalen proinflammatorischen Zytokinproduktion wurde systemisch sowohl durch die CT als auch durch CTB Exposition ein signifikanter Anstieg des IL-6 im Serum detektiert. Ursächlich für diese gegenteilige Beobachtung der *in vivo* IL-6 Induktion im Serum durch das CT (im Vergleich zu den *in vitro* Daten) könnten die unterschiedlichen Quellen der Zytokinbestimmung sein (BAL vs. Serum). Zwar gelten Monozyten und alveoläre Makrophagen als wesentliche Produzenten von IL-6 in der BAL, dennoch sind hierzu auch andere Zellen, wie z.B. Endothelzellen in der Lage bei einer akuten Inflammation systemisch IL-6 zu exprimieren [290]. Folglich kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Zellen für die erhöhte Zytokin-Konzentration von IL-6 im Serum nach der CT Behandlung verantwortlich waren, so dass in weiterführenden Studien eine genaue Differenzierung der IL-6 produzierenden Zellen im Serum vorgenommen werden sollte.

Bei zusammenfassender Betrachtung liefern die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zum ersten Mal einen direkten Hinweis darauf, dass die Exposition mit dem CT Gesamtprotein einen protektiven Effekt auf die Entwicklung des experimentellen Asthma im Mausmodell der akuten allergischen Atemwegsentzündung bewirkt. Es konnte gezeigt werden, dass das CT eine signifikant stärkere Reduktion der T_H2-Zytokine sowie der eosinophilen Granulozyten sowohl in der BAL als auch im Gewebe zur Folge hatte und auch die Atemwegsreaktivität gegenüber Metacholin tendenziell verbesserte. Dagegen lieferte die Analyse der *in vivo* CTB Exposition widersprüchliche Ergebnisse. Zwar verringert sich die T_H2-zytokinproduktion deutlich, jedoch sind stets eosinophile Granulozyten sowohl in der BAL als auch im Gewebe zu beobachten, so dass ein protektiver Effekt ausgeschlossen werden konnte. Bislang sind diese Veränderungen der Atemwegsentzündung nach einer alleinigen Applikation des CT oder CTB im Tiermodell der allergischen Atemwegsentzündung noch nicht untersucht. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, finden sich in der Literatur zahlreiche Modelle für eine *in vivo* Cholera Toxin Exposition in ko-applizierter Form, d.h. im Sinne einer Konjugation an einen Fusionspartner (Antigen). CTB-Antigen-Konjugate zeigten in verschiedenen Studien, dass die Immunantwort gegen das konjugierte Antigen sehr viel effizienter verlief und zu einer oralen Toleranzinduktion führte. Im Rahmen der Impfstoff-Forschung ist die richtige Verpackung von Impfstoffkandidaten mittels geeigneter Adjuvantien ein wesentlicher Bestandteil eines Delivery Systems. Bei oralen Vakzinen fungieren Adjuvantien, wie das CT nicht nur allgemein als immun-

stimulierender Stoff sondern auch als Träger, um das gewünschte ko-applizierte Antigen durch das Darmepithel zu schleusen. Im Gegensatz zu Alaun (Aluminiumsalze), das einzige Adjuvans, das im humanmedizinischen Bereich zugelassen ist, erlaubt die Anwendung des CT als Adjuvans einen entscheidenden Vorteil. Aluminiumsalze wirken nur bei Injektionen und nicht bei oraler oder nasaler Applikation wie das Cholera Toxin [291]. Die Adjuvantizität des Cholera Toxin beruht einerseits auf einer durch seine nicht toxische B-Untereinheit vermittelte spezifische Bindung an Zellen (z.B. des Mukosaepithels) und andererseits auf den starken immunmodulatorischen Eigenschaften der toxischen A-Untereinheit [170, 171]. Ausgewählte CTB verknüpfte Antigene wurden nicht nur oral sondern auch intranasal im Tiermodell eingesetzt, um IgE-vermittelte allergische Reaktionen zu unterdrücken [260, 292]. Wiedermann et al. zeigten in einem Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung eine verminderte allergenspezifische IgE-Produktion nach intranasaler Immunisierung der Tiere mit der B-Untereinheit des Cholera Toxoids gekoppelt an Ovalbumin [292-294]. In diesem Modell hat das eingesetzte Konjugat aus Allergen und Toxoid eine Anergie induziert, eine Form der antigen-spezifischen Toleranz, bei der eine T-zelluläre Immunantwort auf das Antigen durch das Konjugat insgesamt abgeschwächt war [292]. Der Einsatz von CT in der Humanmedizin ist freilich durch seine Toxizität limitiert. Eine Alternative ist die Verwendung detoxifizierter Derivate mit erhaltener immunologischer Aktivität oder genetisch modifizierte und damit verträglicher gemachte bakterielle Toxine [172-174]. Ein bestimmter nicht-toxischer Stamm des Cholera-Erregers wird derzeit in klinischer Prüfung intranasal auf seine immunstimulierende Wirkung getestet [295].

4.5 Mögliche Mechanismen der Allergieprävention durch mikrobielle Stimuli

Zusammengenommen konnte in der vorliegenden Arbeit, trotz der fehlenden IL-6 Induktion durch das CT, ein protektiver Effekt des CT Gesamtproteins auf die Entstehung des experimentellen Asthma im Mausmodell demonstriert werden und darüber hinaus, wie sich auf zellulärer Ebene der CD4⁺ T-Zellen, die *in vitro* Zytokinproduktion verändert.

Hier stellt sich die Frage, welche Faktoren für den protektiven Effekt des CT Gesamtproteins der gram-negativen Bakterien *V. cholerae* verantwortlich sind, als nicht-typischer Stellvertreter für die mikrobielle Exposition aus dem Bauernhofmilieu. Nachdem die Bedeutung der innaten und adaptiven Immunantwort bei der mikrobiellen Exposition *in vivo* und *in vitro* unterstrichen werden konnte, stellt sich nun auch die Frage nach den molekularen Mechanismen, die in diesem Zusammenhang eine Rolle bei der experimentellen Asthmaprävention spielen könnten. Vor diesem Hintergrund konnte erst kürzlich innerhalb der Arbeitsgruppe belegt werden, dass das IL-6 eine zentrale Bedeutung bei der Mediation der mikrobiell vermittelten allergieprotektiven Effekte bzw. bei der Auflösung des asthmatischen Entzündungsgeschehens einnimmt. Interessanterweise hatte die intranasale *A. lwoffii* F78 Exposition von IL-6^{-/-} defizienten Mäusen eine Exazerbation des asthmatischen Phänotyps im Tier zur Folge, während die Behandlung von Wildtyp-Mäusen zu einer Unterdrückung der allergischen Atemwegsentzündung führte (D. Kesper, persönliche Mitteilung). Nachdem in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass die *A. lwoffii*-stimulierten und somit IL-6 enthaltenden Makrophagen-Kulturüberstände *in vitro* eine Induktion von IL-17A in CD4⁺ T-Zellen bewirken, wurde infolge dessen der Anteil der IL-17-produzierenden CD4⁺ T-Zellen in Lungen-Homogenaten von IL-6^{-/-} defizienten Mäusen gemessen. So zeigte sich ein Anstieg von CD4⁺/IL-17⁺ T-Zellen in Lungen der Wildtyp-Mäuse nach *A. lwoffii* Exposition und OVA-Sensibilisierung *in vivo*. Dieser IL-6 abhängige Anstieg konnte jedoch nicht in IL-6^{-/-} defizienten Mäusen detektiert werden. (D. Kesper, persönliche Mitteilung). Somit konnte im Einklang mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit, die *A. lwoffii*-abhängige Induktion von IL-6 und dessen Einfluss auf die Differenzierung von IL-17A produzierenden CD4⁺ T-Zellen *in vivo* demonstriert werden.

Dennoch ist immer noch nicht geklärt, welche funktionellen Konsequenzen die Induktion von IL-17A-produzierenden CD4⁺ T-Zellen auf die Entwicklung des asthmatischen Entzündungsgeschehens im Tiermodell hervorruft. Es wird diskutiert, dass das IL-17 anti-inflammatorische Bedingungen auf verschiedenen Ebenen durch Aktivierung von Chemokinen induziert und als sog. negativer Regulator eine protektive Rolle einnimmt (Abb. 42) [130]. Schnyder-Candrian et al. konnten IL-17A als negativen Regulator für die

T_H2 -induzierte pulmonale Inflammation identifizieren und zeigen, dass exogen appliziertes IL-17A in OVA-sensibilisierten und -exponierten Mäusen sowohl die Eosinophilie und T_H2 -Zytokinproduktion als auch die AHR reduzierte [130]. In dieser Studie konnte zudem auch gezeigt werden, dass die IL-17A vermittelten protektiven Effekte durch Inhibition der Chemokinsynthese von Eotaxin (CCL11, Eosinophilen-chemotaktisch wirkende Chemokin-Ligand 11) und TARC (CCL17, thymusaktivitätsreguliertes Chemokin) ausgelöst wurden [130]. Diese Ergebnisse stehen auch im Einklang mit weiteren Daten aus der Literatur, wo für die erhöhte Ausschüttung von Eotaxin, TARC und weiteren regulatorischen Mediatoren, wie z.B. RANTES (CCL5, reguliertes Normal-T-Zell-exprimiertes und sekretiertes Chemokin), aufgrund ihrer chemotaktischen Wirkung eine entscheidende Rolle bei Rekrutierung der eosinophilen Granulozyten in die Atemwege und folglich bei der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale beigemessen wird [37, 38, 296-298].

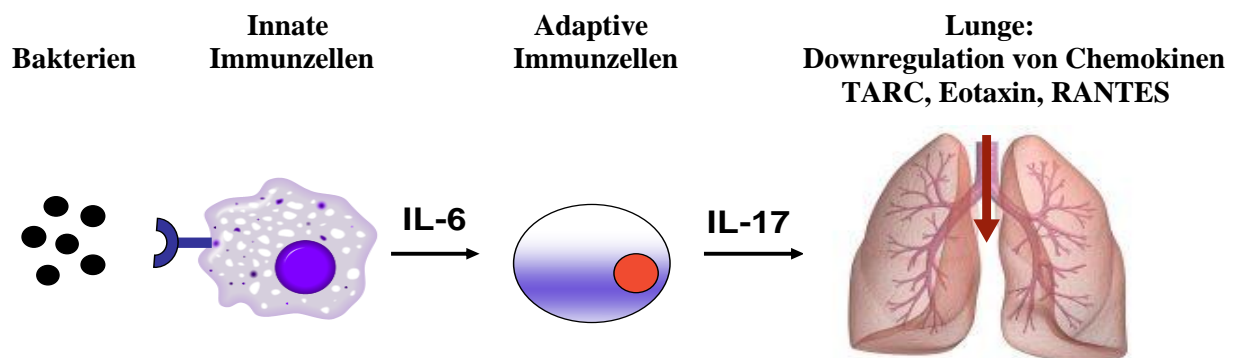


Abb. 42 Mögliche Mechanismen der Allergieprävention
Erläuterungen siehe Text.

Ob T_H17 -Zellen mit ihrem Leitzytokin IL-17A für die Induktion der *A. lwoffii*-vermittelten Asthmaprotektion verantwortlich sind, bleibt noch zu untersuchen. Jedoch deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf eine solche potentielle Rolle hin. Hier sind gewiss noch weitere Studien nötig, um die Mechanismen der *A. lwoffii*-induzierten IL-6- bzw. IL-17-vermittelten anti-inflammatorischen, suppressiven Effekte auf die Regulation der Chemokinsynthese endgültig aufzuklären. Interessant wäre es daher in weiteren Versuchen, die Auswirkungen der *A. lwoffii* F78 Exposition mittels IL-17 knock-out-Mäusen in einem Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung eingehend zu untersuchen, um die

regulative Rolle von IL-17A auf die T_H2-getriggerte Entzündungsreaktion zu identifizieren und näher zu charakterisieren.

In diesem Zusammenhang könnte das IL-17A, in Bezug auf die hier eingangs aufgestellte Fragestellung, auch als wesentlicher Faktor für die *in vivo* Cholera Toxin-induzierten, allergoprotektiven Effekte diskutiert werden. Die Tatsache, dass die *in vitro* CT Stimulation von murinen Makrophagen-Kulturzellen durch ein komplettes Fehlen der IL-6 Produktion gekennzeichnet ist, bedeutet nicht, dass die IL-17A Expression auf der Ebene der T-Zellen unter physiologischen Bedingungen *in vivo* keine Rolle spielt. Aus den Ergebnissen des *in vitro* T-Zellsystems konnte gezeigt werden, dass trotz fehlender IL-6 Sekretion der Makrophagen-Kulturzellen, durch Behandlung mit dem CT stimulierten Makrophagen-Kulturüberstand eine IL-17A Expression in CD4⁺ T-Zellen induziert werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass die *in vitro* IL-17A Produktion in CD4⁺ T-Zellen möglicherweise über eine IL-6 unabhängige Signalkaskade beeinflusst wurde. In dieser Hinsicht ist bekannt, dass das IL-21 über eine Aktivierung des alternativen Signalweges die Differenzierung von IL-17A produzierenden T_H17-Zellen aus naiven CD4⁺ T-Zellen zur Folge hat [110]. Es ist wahrscheinlich, dass die *in vitro* Stimulation der naiven CD4⁺ T-Zellen mit dem CT stimulierten Makrophagen-Kulturüberstand über den IL-21-abhängigen, alternativen Signalweg, die IL-17A Expression in CD4⁺ T-Zellen induziert. Hier könnte spekuliert werden, dass in dem *in vivo* Assay, der protektive Effekt der CT Exposition möglicherweise über eine IL-6 unabhängige Signalkaskade induziert wird, so dass infolge über den anti-inflammatorischen bzw. regulativen Effekt der IL-17A Sekretion Signalkaskaden ausgelöst werden, die wiederum die T_H2-Immunantwort unterdrücken und die Ausprägung des experimentellen Asthmas beeinflussen. Diese Annahme würde auch die fehlende T_H1- Polarisierung (IFN γ Expression) im Akutmodell der *in vivo* CT Exposition erklären, da die Reduktion der T_H2-Immunantwort nicht durch eine Verschiebung des T_H1/T_H2 Gleichgewichts verursacht wurde. Ob das IL-17A bei der CT Exposition tatsächlich eine anti-inflammatorische, regulative Rolle spielt und in diesem Modell, dass IL-21 anstelle von IL-6 als Mediator fungiert kann aufgrund dieser Studie nicht abschließend geklärt werden. Zur weiteren Aufklärung des protektiven CT Effektes sollten daher in folgenden Experimenten weitere Zytokine, wie z.B. IL-21 nach *in vitro* Stimulation mit CT in Makrophagen-Kulturzellen sowie dessen Einfluss auf naive CD⁺ T-Zellen untersucht werden. Hier bietet, dass im Rahmen dieser Arbeit entwickelte *in vitro* T-Zellsystem Möglichkeiten der genaueren Untersuchung der Zusammenhänge. Ferner wäre es auch interessant, den Anteil der CD4⁺/IL-17⁺ T-Zellen in die *in vivo* Analysen mit einzubeziehen und signifikante

Unterschiede in der Zytokinproduktion des IL-21 bzw. IL-17A sowohl systemisch als auch lokal zu untersuchen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Anlässlich für die in den letzten Jahrzehnten stetig steigenden Prävalenzen von Asthma bronchiale in industrialisierten Ländern werden neben einer genetischen Prädisposition vor allem Umweltfaktoren verantwortlich gemacht [177]. Die „Hygiene-Hypothese“ geht davon aus, dass mikrobielle Stimuli allergieprotektiv wirken [194, 195]. Epidemiologische Studien konnten bislang eine Reduktion allergischer Erkrankungen durch Exposition gegenüber mikrobiellen Komponenten im bäuerlichen Umfeld belegen [186, 187]. Infolge wurde der apathogene, gram-negative Keim *A. lwoffii* F78 aus dem Stallstaub traditioneller Kuhställe isoliert [189-191]. Im Tiermodell führte die intranasale Applikation mit dem Modellkeim *A. lwoffii* F78 an OVA-sensibilisierte und -provozierte BALB/c-Mäuse zu einer signifikanten Reduktion des asthmatischen Phänotyps [198]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde speziell die Wirkung der Totkeim-Exposition von *A. lwoffii* F78 auf die allergische Sensibilisierungs- bzw. Entzündungsreaktion in einem akuten Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung untersucht. Sowohl bei der Lebend- als auch bei der Totkeim-Exposition (EtOH abgetötet) von *A. lwoffii* F78 resultierte die intranasale Behandlung in einer signifikanten Reduktion des asthmatischen Phänotyps. So war die Entwicklung der Atemwegshyperreaktivität, Eosinophilie als auch die T_H2-Zytokinproduktion in der BAL signifikant erniedrigt. Auch die histologische Auswertung der Lungen ließ einen stark verminderten pulmonalen Entzündungsgrad und eine deutlich reduzierte Anzahl an mukusproduzierenden Becherzellen sowie eosinophilen Granulozyten in den Atemwegen aufweisen. Die erfolgreiche Reproduktion der Phänotypen führte in erwünschter Weise zur Entstehung eines protektiven, immunmodulatorischen Effekts von *A. lwoffii* F78, wobei dieser Effekt von der Totkeim-Exposition nicht beeinflusst wird.

Es ist bekannt, dass das proinflammatorische Zytokinmilieu eine wichtige Rolle bei der transmaternalen Asthmaprotektion spielt, welche durch die pränatale Exposition mit dem Keim *A. lwoffii* F78 vermittelt wird [198]. Innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die *A. lwoffii* Exposition der Muttertiere eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems zur Folge hat, die mit einer Erhöhung der Zytokine IL-6 und TNF α einhergeht und essentiell für den Asthma-Schutz der Nachkommen ist [198]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein *in vitro* T-Zellsystem etabliert, das eine genauere Untersuchung der zu Grunde liegenden zellulären und molekularen Mechanismen erlaubt, die unter Beteiligung der innate und adaptiven Immunantwort eine Rolle bei der Mediation der mikrobiell induzierten Asthmaprotektion durch *A. lwoffii* F78 und Cholera Toxin spielen. Dazu wurde zunächst die *in vitro* Analyse des proinflammatorischen Zytokinprofils von

Zellen des innate Immunsystems (murine Makrophagen-Kulturzellen und Peritonealmakrophagen) nach Stimulation mit *A. lwoffii* F78 in einer Kinetik durchgeführt. Erwartungsgemäß führte die Stimulation mit *A. lwoffii* F78 (Lebend-/Totkeim-Exposition) zu einem dosisabhängigen Anstieg der proinflammatorischer Zytokine IL-6 und TNF α auf Proteinebene. Die Stimulation mit CTB zeigte ein ähnliches Zytokinsekretionsmuster von IL-6 und TNF α , wogegen die Behandlung mit dem Cholera Toxin Gesamtprotein (CT) die proinflammatorische Zytokinproduktion nicht beeinflusste.

Im zweiten Teil der *in vitro* Versuchsreihe wurden die Auswirkungen der *A. lwoffii* F78 stimulierten Makrophagen-Kulturüberstände, die ein signifikantes Expressionsniveau von IL-6 und TNF α aufweisen, auf naive CD4⁺ T-Zellen in einem im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierten *in vitro* T-Zellsystem untersucht. Mittels dieser Versuche konnte ein signifikanter Anstieg der T-Zell Zytokinproduktion von IL-17A, IL-10 und IL-13 in CD4⁺ T-Zellen festgestellt werden. Auch die mRNA-Expression spiegelte in etwa die auf Proteinebene beobachtete Konstellation wieder. Durch den Zusatz rekombinanter Proteine (rhIL-6 und rhTGF β) bei der *in vitro* Kultivierung der naiven CD4⁺ T-Zellen konnte ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Zytokine IL-17A, IL-10 und IL-13 detektiert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass das *A. lwoffii* F78 induzierte proinflammatorische Zytokin IL-6 der innate Immunzellen (Makrophagen) für die Polarisierung und Sekretion von IL-17A, IL-10 und IL-13 in CD4⁺ T-Zellen verantwortlich ist. Bei der T-Zell Zytokinproduktion von IL-17A durch Kultivierung von naiven CD4⁺ T-Zellen mit Cholera Toxin (CT und CTB)-stimulierten Makrophagen-Kulturüberständen spielt das IL-6 jedoch keine zentrale Rolle. In diesem Zusammenhang spielt hier möglicherweise das IL-21, dass bekannter Weise über einen alternativen Signalweg zur Expression von IL-17A befähigt ist, eine entscheidende Rolle bei der Ausrichtung der T-Zellantwort über Cholera Toxin (CT und CTB)-induzierte proinflammatorische Zytokine. Die in diesen Studien erhobenen Daten tragen zu einer Komplettierung und Erweiterung des *in vitro* Modells der T-zellvermittelten Immunantwort durch mikrobielle Stimuli bei. Erstmals wurden hier immunregulatorische Einflüsse der innate Immunantwort von *A. lwoffii* F78 und Cholera Toxin (CT und CTB) auf die *in vitro* Zytokinexpression der nachgeschalteten, adaptiven Immunantwort einbezogen. So konnte neben den bekannten Subpopulationen ein weiterer unabhängiger T-Helferzell-Subtyp, der IL-17A und IL-10 produzierenden T_H17-Zellen, durch die indirekte Stimulation von *A. lwoffii* F78- bzw. Cholera Toxin-induzierten Zytokinen identifiziert werden. Die oben aufgeführten Zusammenhänge der mediatorvermittelten Interaktion zwischen angeborener und erworbener Immunabwehr über mikrobielle Stimuli im inflammatorischen Geschehen,

weisen zumindest in der Theorie vielfältige Perspektiven auf. Denkbar ist unter anderem eine Antagonisierung beteiligter proinflammatorischer Zytokine des T_H17-Signalweges oder weiterer Mediatoren bei der Induzierung anti-allergischer, anti-inflammatorischer Signalwege, wie z.B. Chemokin-Antworten. Eine Induktion der kürzlich entdeckten T_H17-Zellen durch ein bauerliches Umfeld, die durch die IL-17-Sekretion regulativ auf die T_H1/T_H2-Balance einwirken könnte wird in diesem Zusammenhang diskutiert [137].

Um die potentielle allergoprotektive Wirkung des Cholera Toxin bei der mikrobiell vermittelten Asthma-Protektion *in vivo* zu charakterisieren, wurde im letzten Teil der Arbeit die intranasale Exposition des Cholera Toxin (CT und CTB) im akuten Modell der allergischen Atemwegsentzündung untersucht. Die Charakterisierung des asthmatischen Phänotyps zeigte für die Exposition mit dem CT Gesamtprotein, einen protektiven Effekt auf die Entwicklung des experimentellen Asthma im Mausmodell. Die Behandlung resultierte in einer signifikanten Reduktion der T_H2-Zytokine sowie der eosinophilen Granulozyten sowohl in der BAL als auch im Gewebe. Weiterhin zeigten diese Tiere eine tendenzielle Verbesserung der Atemwegsreagibilität. Daneben fanden sich keine Hinweise auf die Initiation einer allergenspezifischen T_H1-Antwort (IFN γ). Die Analyse der *in vivo* CTB Exposition zeigte stark erhöhte Konzentrationen der eosinophilen Granulozyten sowohl in der BAL als auch im Gewebe, so dass ein protektiver Effekt ausgeschlossen werden konnte. Um die Relevanz der veränderten proinflammatorischen Zytokinproduktion zu untersuchen wurde nach der *in vivo* Kurzzeitstimulation mit Cholera Toxin (CT und CTB), die Produktion von IL-6 und TNF α lokal und systemisch untersucht. Die Spiegel der BAL-Zytokindaten korrelierten mit den Resultaten der *in vitro* Experimente. Die Exposition mit CT zeigte keine Induktion der lokalen Zytokinproduktion von IL-6- und TNF α . Damit sprechen die Daten dieser Arbeit für ein protektives Potential von Cholera Toxin (Wildtyp Gesamtprotein) im Zusammenhang mit allergischem Asthma bronchiale.

Die Ergebnisse zeigen auch, dass die durch Cholera Toxin induzierten Immunmodulationswirkungen des Zytokinmilieus einen vielversprechenden Ansatz zur Untersuchung IL-6 unabhängiger Signalwege darstellen, die eine Rolle bei der Mediation der anti-allergischen Immunantwort durch Cholera Toxin spielen. Auch wenn die beobachteten Effekte nicht auf eine isolierte „Verdrängung“ einer T_H2- durch eine T_H1-Immunantwort zurückzuführen sind, scheint ein Zusammenhang zu einer parallel bestehenden T_H17-Antwort über IL-6 unabhängige Signalwege wahrscheinlich. Diese mögliche T_H17- Immunantwort könnte auf eine allergenspezifische T_H2-Antwort gegenregulatorisch wirken und letzten Endes für den anti-allergischen, protektiven Effekt verantwortlich sein. Das hier vorgestellte Mausmodell

bietet erstmals die Möglichkeit, Immunmodulationswirkungen des Cholera Toxin in einem akuten Modell der allergischen Atemwegsentzündung zu untersuchen und eröffnet damit neue Perspektiven zur Erforschung der mikrobiell vermittelten Allergieprotektion. Daneben ergeben sich auch interessante Ausblicke für einen möglichen Einsatz des Cholera Toxin in der Immuntherapie des allergischen Asthma beim Menschen. Derzeit stehen bakterielle Antigene im Fokus neuer Behandlungsstrategien bei der Entwicklung einer präventiven Allergenimpfung zur Behandlung von allergischen Erkrankungen. Von erheblicher Bedeutung ist hierbei jedoch nicht die isolierte Einzelsubstanz. Wirkungsvollere Keimcocktails mit unterschiedlichen mikrobiellen Bestandteilen werden im Ganzen betrachtet. Das Wechselspiel der Keime, so früh wie möglich, d.h. während der Reifung und Programmierung des Immunsystems könnte zu einer Toleranzentstehung führen, um eine erfolgreiche Protektion vor Allergie und Asthma zu ermöglichen.

6 SUMMARY

In addition to genetic predisposition environmental factors are thought to be responsible for steadily increasing prevalence of asthma bronchiale in industrialized countries in the last decades. The hygiene hypothesis implies that exposure to microbial stimuli prevents from allergic diseases. Recent epidemiological studies have demonstrated a reduction of allergic disease after exposition to microbial components in a farming environment. Subsequently the apathogenic, gram-positive bacterium *A. lwoffii* F78 was isolated from the stable dust of rural cow sheds [189-191]. Based on these findings, the intranasal exposure of *A. lwoffii* F78 to Ovalbumin (OVA)-sensitized and -challenged BALB/c-mice significantly reduced the development of an asthmatic phenotype in an animal model of experimental asthma [198]. The aim of the present work was first of all to characterize the effect of exposure to ethanol killed *A. lwoffii* F78 on the development to the asthmatic phenotype of in an acute mouse model of allergic airway inflammation. In fact, it could be shown that both ethanol killed as well as living intranasal administration of *A. lwoffii* F78 were able to reduce the asthmatic phenotype significantly in mice. The protective effect of *A. lwoffii* F78 led to a clear improvement of the airway reactivity in the lung, decreased levels of eosinophilic granulocytes and T_H2 cytokine expression in the BAL. The histological analysis of the lungs revealed a highly reduced airway inflammation, reduced number of goblet cells and eosinophilic granulocytes in the airways. Finally, the effectiveness of reproduced phenotypes resulted with development of a protective immune modulatory phenotype induced by *A. lwoffii* F78, which was not affected in protection by ethanol killed bacteria.

It is known that the proinflammatory cytokine response plays an important role in the transmaternal asthma protection, which is mediated by prenatal exposure to *A. lwoffii* F78 [198]. In our group it has been shown that *A. lwoffii* F78 exposure to pregnant mother mice led to an activation of the innate immune system accompanied by increased levels of the cytokines IL-6 and TNF α , which are essential for the asthma protection of the progeny [198]. In this study, an *in vitro* T-cell system was established allowing more detailed investigation of the underlying cellular and molecular mechanisms of the innate and adaptive immune response that play an important role in the mediation of microbial induced asthma protection through *A. lwoffii* F78 and Cholera Toxin. For this, the first step was the analysis of *A. lwoffii* induced proinflammatory cytokine profile and kinetic of cells of the innate immune system like murine macrophage culture cells and peritoneal macrophages *in vitro*. As expected, stimulation with *A. lwoffii* F78 (living and ethanol killed exposure) led to a dose-dependent increase of proinflammatory cytokines IL-6 and TNF α at the protein level. The treatment with

cholera toxin b-subunit (CTB) showed a similar cytokine profile of IL-6 and TNF α , whereas by treatment with the cholera toxin total protein (CT) proinflammatory cytokine expression was not affected.

In the next part of the *in vitro* studies the effects of *A. lwoffii* F78 stimulated macrophage culture supernatants containing significant levels of expressed IL-6 and TNF α , on naive CD4⁺ T-cells, were analysed using a new established *in vitro* T-cell system. By means of these experiments a significant increase of T-cell cytokine production of IL-17A, IL-10 and IL-13 in CD4⁺ T-cells were detected. The observed mRNA expression reflected approximately indeed levels of the protein expression. By the addition of recombinant proteins (rhIL-6 and rhTGF β) during the *in vitro* culturing of naive CD4⁺ T-cells a significant increase of the cytokines IL-17A, IL-10 and IL-13 were detected too. Thus, these results allowed drawing the conclusion that the *A. lwoffii* F78 induced proinflammatory cytokine IL-6 of the innate immune cells (macrophages) is responsible for polarizing and secretion of IL-17A, IL-10 and IL-13 in CD4⁺ T-cells. However the T-cell cytokine production of IL-17A by culturing of naive CD4⁺ T-cells with cholera toxin stimulated macrophage culture supernatants, IL-6 plays no pivotal role. In this regard, the IL-21 which is well known for induction of IL-17A expression via alternative signaling pathways, may play a crucial role on the formation of the T-cell response by cholera toxin induced proinflammatory cytokines. Consequently, collected data of these studies redound a completing and extension of the *in vitro* model of T-cell mediated immune response by microbial stimuli. These data demonstrate for the first time, immunoregulatory effects of the innate immune response by *A. lwoffii* F78 and cholera toxin were involved to analysis of *in vitro* cytokine expression by the downstream, adaptive immune response. Thus, besides being known corresponding subpopulations an independent T helper cell subtype of IL-17A and IL-10-producing T_H17 cells could be identified by this indirect stimulation with *A. lwoffii* F78 and cholera toxin-induced cytokines. As already described, mediator-induced interactions between innate and adaptive immunity via microbial stimuli in inflammatory reactions, possessed hypothetically diverse perspectives. Still, it is conceivable that involved proinflammatory cytokines or further mediators of the T_H17 signaling pathway antagonize for induction of an anti-allergic, anti-inflammatory signaling pathway (e.g. chemokine responses). In this context, there is discussion about induction of recently discovered T_H17 cells by a rural environment may have regulating effect on T_H1/T_H2 balance by IL-17 secretion [137].

In the last part of this work the intranasal exposure of cholera toxin (CT and CTB) has been analysed in an acute model of allergic airway inflammation to characterize the potential

allergoprotective effect of cholera toxin in microbially-mediated asthma protection. The analysis of the asthmatic phenotype revealed a protective effect on the development of experimental asthma in mice by intranasal exposure to CT total protein. This treatment resulted in a significant reduction of T_H2 cytokines and the eosinophil granulocytes in the BAL as well as in the tissue. Furthermore, these animals showed a tended improvement of the airway hyper responsiveness. In addition, there was no initiation of an allergen-specific T_H1 response (IFN γ) found. However, the analysis of CTB administration revealed elevated levels of eosinophils in both the BAL and the tissue. Therefore protective properties could be excluded for CTB administration *in vivo*. Additionally, to investigate the relevance of the modified proinflammatory cytokine production, the expression of IL-6 and TNF α was investigated locally and systemically after short term stimulation with CT and CTB *in vivo*. This *in vivo* treatment correlated with the results of *in vitro* experiments regarding levels of BAL cytokine expression. Altogether, there was no induction of an altered locally cytokine secretion of IL-6 and TNF α by short term stimulation with CT. Thus, these data provide the first evidence of a protective potential of cholera toxin (CT) associated with allergic asthma. Furthermore, the results of cholera toxin induced immunomodulatory response by cytokine profile represent a promising approach for examination of IL-6 independent signaling pathways that play a role in the mediation of anti-allergic immune response by cholera toxin. Although the observed effects are not due to an isolated repression of a T_H2 by a T_H1 immune response, a parallel existing T_H17 response through IL-6 independent signaling pathways seems likely. This response is presumably counteracting to an allergen-specific T_H2 response and accountable for the anti-allergic, protective effect. The represented mouse model provides new opportunities to examine immunomodulatory effects of cholera toxin in an acute model of allergic airway inflammation and offers new perspectives to the study microbially mediated allergy protection. Furthermore, interesting views on the possible use of cholera toxin in the treatment of allergic asthma in human can now be offered. Currently, bacterial antigens are the focus of new treatment strategies for development of a preventive allergen vaccination to protect against allergic diseases. However, the relevance of these antigens are not isolated single substances. More efficient mix of bacterial cocktails with different microbial components are in consideration. The early interaction of different microbial factors during maturation and programming of the immune system could lead to tolerance formation to develop a successful prevention of allergies and asthma.

7 LITERATURVERZEICHNIS (Nach Nummern)

- 1 Larche M., Akdis CA., and Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. 2006. *Nat Rev Immunol* 6, 761-771.
- 2 Valenta R., Ball T., Focke M., Linhart B., Mothes N., Niederberger V., Spitzauer S., Swoboda I., Vrtala S., and Westritschnig K. Immunotherapy of allergic disease. 2004. *Adv Immunol* 82, 105-153.
- 3 Cookson, W. The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. 2004. *Nat Rev Immunol*, 4:978-988.
- 4 Kay, A.B. Allergy and allergic diseases. Second of two parts. 2001. *N Engl J Med* 344, 109-113.
- 5 Beasley R., Pekkanen J., and Pearce N. Has the role of atopy in the development of asthma been over-emphasized? 2001. *Pediatr Pulmonol Suppl* 23, 149-150.
- 6 Barnes, K. C. Gene-environment and gene-gene interaction studies in the molecular genetic analysis of asthma and atopy. 1999. *Clin Exp Allergy* 29 Suppl 4:47-51.
- 7 Cookson, W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. 1999. *Nature*, 402:B5-11.
- 8 Anderson, G. P. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. 2008. *Lancet* v. 372, no. 9643, p. 1107-1119.
- 9 Smith, D., Malone D.C., Lawson K.A., Okamoto L.J., Battista C., Saunders W.B. A nationale estimate of economic costs of asthma. 1997. *Am J Respir Cirt Care Med*, 165: 787-793.
- 10 Fireman, P. Understanding asthma pathophysiology. 2003. *Allergy Asthma Proc*, 24:79-83.
- 11 Streck M.E. Difficult Asthma. 2006. *Proc Am Thorac Soc*, 3: 116-123.
- 12 Holgate ST, Polosa R. The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults. 2006. *Lancet* Volume 368, No. 9537.
- 13 Bateman, E. D. et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. 2008. *Eur Respir J*, v. 31, no. 1, p. 143-178.
- 14 Buhl R., Berdel D., Criege C.P., Gillissen A., Kardos P., Kroegel C. et al. Guidelines for diagnosis and treatment of asthma patients. 2006. *Pneumologie*, 60:139-77.
- 15 Mellman, I. and Steinman, R. M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. 2001. *Cell*, 106:255-258.
- 16 Galli, S. J., Tsai, M., and Piliponsky, A. M. The development of allergic inflammation. 2008. *Nature*, 454:445-454.

- 17 Lambrecht, B. N. and Hammad, H. Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma. 2003. *Nat Rev Immunol*, 3(12):994-1003.
- 18 Vermaelen, K. and Pauwels, R. Accelerated airway dendritic cell maturation, trafficking, and elimination in a mouse model of asthma. 2003. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 29:405-409.
- 19 Racioppi L., Ronchese F., Matis L.A., Germain R.N. Peptide-major histocompatibility complex class II complexes with mixed agonist/antagonist properties provide evidence for ligand-related differences in T cell receptor-dependent intracellular signaling. 1993. *J Exp Med*, 177:1047-60.
- 20 Stirling, R. G. and Chung, K. F. New immunological approaches and cytokine targets in asthma and allergy. 2000. *Eur.Respir J*, 16:1158-1174.
- 21 Lee J.J., Dimina D., et al. Defining a Link with Asthma in Mice Congenitally Deficient in Eosinophils. 2004. *Science* (9), Vol.305.
- 22 Lohoff, M. and Mak, T. W. Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation. 2005. *Nat Rev Immunol*, 5:125-135.
- 23 Murphy, K. M. and Reiner, S. L. The lineage decisions of helper T cells. 2002. *Nat Rev Immunol*, 2:933-944.
- 24 Stirling, R. G. and Chung, K. F. New immunological approaches and cytokine targets in asthma and allergy. 2000. *Eur Respir J*, 16:1158-1174.
- 25 Marone, G. Asthma: recent advances. 1998. *Immunol Today*, 19:5-9.
- 26 McKenzie, A. N. Regulation of T helper type 2 cell immunity by interleukin-4 and interleukin-13. 2000. *Pharmacol Ther*, 88:143-151.
- 27 O'Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. 2004. *Natur Medizin*, Vol 10 (8).
- 28 Geha, R. S., Jabara, H. H. , and Brodeur, S. R. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. 2003. *Nat Rev Immunol*, 3:721-732.
- 29 Wills-Karp, M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. 2004. *Immunol Rev*, 202:175-190.
- 30 Barnes, P. J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. 2008. *Nat Rev Immunol*, 8:183-192.
- 31 Galli, S. J., Tsai, M., and Piliponsky, A. M. The development of allergic inflammation. 2008. *Nature*, 454:445-454.
- 32 Holt, P. G., Macaubas, C., Stumbles, P. A., and Sly, P. D. The role of allergy in the development of asthma. 1999. *Nature*, 402:B12-B17.

- 33 Galli, S. J., Tsai, M., and Piliponsky, A. M. The development of allergic inflammation. 2008. *Nature*, 454:445-454.
- 34 Bousquet J., Jeffery P.K., Busse W.W., Johnson M., Vignola A.M. Asthma. From bronchoconstriction to airway inflammation and remodeling. 2000. *Am J Respir Crit Care Med*, 161(5): 1720-45.
- 35 Kroegel, C. Asthma bronchiale. Thieme Verlag 2002.
- 36 Busse W.W., and Sedgwick J.B. Eosinophil eicosanoid relations in allergic inflammation of the airways. 1994. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 22, 241-249.
- 37 Fireman, P. Understanding asthma pathophysiology. 2003. *Allergy Asthma Proc*, 24:79-83.
- 38 Cohn, L., Elias, J. A. and Chupp, G. L. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. 2004. *Annu Rev Immunol*, 22:789-815.
- 39 Wills-Karp, M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. 2004. *Immunol Rev*, 202:175-190.
- 40 Vignola, A. M., Mirabella, F., Costanzo, G., Di Giorgi, R., Gjomarkaj, M., Bellia, V. and Bonsignore, G. Airway remodeling in asthma. 2003. *Chest*, 123:417S-422S.
- 41 Bergeron, C. and Boulet, L. P. Structural changes in airway diseases: characteristics, mechanisms, consequences, and pharmacologic modulation. 2006. *Chest*, 129:1068-1087.
- 42 Lee, C.G., Homer, R.J., Zhu, Z., Lanone, S., Wang X., Koteliansky, V., Shipley, J.M., Gotwals, P., Noble, P., Chen, Q., Senior, R.M. and Elias, J.A. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta1. 2001. *J Exp Med*, 194:809-821.
- 43 Romagnani, S. The role of lymphocytes in allergic disease. 2000. *J Allergy Clin Immunol*, 105:399-408.
- 44 Abbas, A.K., Murphy, K.M., and Sher, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. 1996. *Nature*, 383: 787-793.
- 45 Hansen, G. Das Th1/Th2-Paradigma beim allergischen Asthma bronchiale. 2001. Springer-Verlag Vol. 2.
- 46 Murphy, K., Travers, P. and Walport, M. Janeway`s Immunobiology. 2007. Garland Science.
- 47 Schütt, C. and Bröker, B. Grundwissen Immunologie. 2009. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Vol. 2. Auflage.
- 48 Smith, K.A. Interleukin -2 - Inception, Impact, and Implications. 1988. *Science*, 240:1169-1176.

- 49 Constant, S. L. and Bottomly, K. Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ T cell responses: the alternative approaches. 1997. *Annu Rev Immunol*, 15:297-322.
- 50 Romagnani, S. The Th1/Th2 paradigm. 1997. *Immunol Today*, 18:263-266.
- 51 Corry, D. B. and Kheradmand, F. Induction and regulation of the IgE response. 1999. *Nature*, 402:B18-B23.
- 52 Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., and Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *J Immunol*, 136(7):2348-2357.
- 53 Nakajima, H. and Takatsu, K. Role of cytokines in allergic airway inflammation. 2007. *Int Arch Allergy Immunol*, 142:265-273.
- 54 Akdis, M., Verhagen, J., Taylor, A., Karamloo, F., Karagiannidis, C., Cramer, R., Thunberg, S., Deniz, G., Valenta, R., Fiebig, H., Kegel, C., Disch, R., Schmidt-Weber, C. B., Blaser, K., and Akdis, C. A. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. 2004. *J Exp Med*, 199(11):1567-1575.
- 55 Silverman, R.H. Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. 2007. *J Virol* 81, 12720-9.
- 56 Barnes, P.J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. 2008. *J Clin Invest* 118, 3546-56.
- 57 Rengarajan, J., Szabo, S. J. and Glimcher, L. H. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. 2000. *Immunol Today*, 21:479-483.
- 58 Gately, M. K., L. M. Renzetti, et al. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. 1998. *Annu Rev Immunol*, 16: 495-521.
- 59 Macatonia, S.E., Hsieh, C.S., Murphy, K.M. and Ogarra, A. Dendritic Cells and Macrophages Are Required for Th1 Development of Cd4⁺ T-Cells from Alpha-Beta Tcr Transgenic Mice - Il-12 Substitution for Macrophages to Stimulate Ifn-Gamma Production Is Ifn-Gamma-Dependent. 1993. *International Immunology*, 5: 1119-1128.
- 60 Moser, M. and Murphy, K.M. Dendritic cell regulation of T(H)1-T(H)2 development. 2000. *Nature Immunology*, 1: 199-205.
- 61 Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X.K., Fathman, C.G. and Glimcher, L.H. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. 2000. *Cell*, 100:655-669.
- 62 Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. 2 Types of Mouse Helper T-Cell Clone Implications for Immune Regulation. 1987. *Immunology Today*, 8:223-227.

- 63 Dighe, A.S., Campbell, D., Hsieh, C.S., Clarke, S., Greaves, D.R., Gordon, S., Murphy, K.M. and Schreiber, R.D. Tissue-Specific Targeting of Cytokine Unresponsiveness in Transgenic Mice. 1995. *Immunity*, 3:657-666.
- 64 Flesch, I.E.A., Hess, J.H., Huang, S., Aguet, M., Rothe, J., Bluethmann, H. and Kaufmann, S.H.E. Early Interleukin-12 Production by Macrophages in Response to Mycobacterial Infection Depends on Interferon-Gamma and Tumor-Necrosis-Factor-Alpha. 1995. *Journal of Experimental Medicine*, 181:1615-1621.
- 65 Wills-Karp, M., et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. 1998. *Science*, 282(5397): p. 2258-61.
- 66 Oro, A.S., et al. Regulation of disease susceptibility: decreased prevalence of IgE-mediated allergic disease in patients with multiple sclerosis. 1996. *J Allergy Clin Immunol*, 97(6): p. 1402-8.
- 67 Shirakawa, T., et al. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. 1997. *Science*, 275(5296): p. 77-9.
- 68 Cohn, L., et al. T helper 1 cells and interferon gamma regulate allergic airway inflammation and mucus production. 1999. *J Exp Med*, 190(9): p. 1309-18.
- 69 Blyth, D., et al. Airway subepithelial fibrosis in a murine model of atopic asthma: suppression by dexamethasone or anti-interleukin-5 antibody. 2000. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 23(2): p. 241-6.
- 70 Renz, H., et al. Inhibition of IgE production and normalisation of airways responsiveness by sensitized CD8 T cells in a mouse model of allergen-induced sensitization. 1994. *J Immunol*, 152: p. 351-360.
- 71 Iwamoto, I., et al. Interferon gamma regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4+ T cells. 1993. *J Exp Med*, 177(2): p. 573-6.
- 72 Hofstra, C., et al. Differential effects of endogenous and exogenous interferon-gamma on immunoglobulin E, cellular infiltration, and airway responsiveness in a murine model of allergic asthma. 1998. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 19(5): p. 826-35.
- 73 Hansen, G., et al. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. 1999. *J Clin Invest*, 103(2): p. 175-83.
- 74 Randolph, D.A., et al. Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma. 1999. *J Immunol*, 162(4): p. 2375-83.
- 75 Holtzman, M., et al. The one-two of T helper cells: does interferon-gamma knock out the Th2 hypothesis for asthma? 1996. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 14(4): p. 316-8.
- 76 Cohn, L., Elias, J. and G. Chupp. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. 2004. *Annu Rev Immunol*, 22: p. 789-815.

- 77 Locksley, R. M. Th2 cells: help for helminths. 1994. *J Exp Med*, 179:1405-1407.
- 78 Holgate, S. T. Genetic and environmental interaction in allergy and asthma. 1999. *J Allergy Clin Immunol*, 104:1139-1146.
- 79 Corry, D. B. and Kheradmand, F. Induction and regulation of the IgE response. 1999. *Nature*, 402:B18-B23.
- 80 Corren, J., Lemanske, R.F., Hanania, N.A., Korenblat, P.E., Parsey, M.V., Arron, J.R., Harris, J.M., Scheerens, H., Wu, L.C., Su, Z., Mosesova, S., Eisner, M.D., Bohen, S.P. and Matthews, J.G. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. 2011. *N Engl J Med* 365, 1088-98.
- 81 Bernstein, L., et al. NHLBI Summary and recommendations of a workshop on the investigative use of fiberoptic bronchoscopy and bronchoalveolar lavage in asthmatics. 1985. *Am Rev of Respir Dis*, 132: p. 180-2.
- 82 Chung, K.F. and P.J. Barnes. Cytokines in asthma. 1999. *Thorax*, 54(9): p. 825-57.
- 83 Riffo-Vasquez, Y., Pitchford, S. and D. Spina. Cytokines in airway inflammation. 2000. *Int J Biochem Cell Biol*, 32: p. 833-853.
- 84 Grunig, G., et al. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. 1998. *Science*, 282: p. 2261-2263.
- 85 Wills-Karp, M., et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. 1998. *Science*, 282(5397): p. 2258-61.
- 86 Elias, J., et al. New insights into the pathogenesis of asthma. 2003. *J Clin Invest*, 111(3): p. 291-7.
- 87 Corry, D. and Kheradmand, F. Induction and regulation of the IgE response. 1999. *Nature*, 402: p. 18-23.
- 88 Kaliner, M.A. Pathogenesis of asthma. 1996. *Clinical Immunology*, p. 909-923.
- 89 Lee, C., et al. Transgenic overexpression of interleukin (IL)-10 in the lung causes mucus metaplasia, tissue inflammation, and airway remodeling via IL-13-dependent and -independent pathways. 2002. *J Biol Chem*, 277(38): p. 35466-74.
- 90 Whittaker, L., et al. Interleukin-13 mediates a fundamental pathway for airway epithelial mucus induced by CD4 T cells and interleukin-9. 2002. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 27(5): p. 593-602.
- 91 Rothenberg, M. Eosinophilia. 1998. *N Engl J Med*, 338(22): p. 1592-600.
- 92 Mattes, J., et al. Intrinsic defect in T cell production of interleukin (IL)-13 in the absence of both IL-5 and eotaxin precludes the development of eosinophilia and airways hyperreactivity in experimental asthma. 2002. *J Exp Med*, 195(11): p. 1433-44.

- 93 Corren, J., Lemanske, R.F., Hanania, N.A., Korenblat, P.E., Parsey, M.V., Arron, J.R., Harris, J.M., Scheerens, H., Wu, L.C., Su, Z., Mosesova, S., Eisner, M.D., Bohen, S.P. and Matthews, J.G. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. 2011. *N Engl J Med* 365, 1088-98.
- 94 Hansen, G. Das Th1/Th2-Paradigma beim allergischen Asthma bronchiale. 2001. Springer-Verlag Vol. 2.
- 95 Lloyd, C.M. and Hessel, E.M. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. 2010. *Nat Rev Immunol*, 10, 838-48.
- 96 Zhu, J. Transcriptional regulation of Th2 cell differentiation. 2010. *Immunol Cell Biol*, 88, 244-9.
- 97 Lloyd, C.M. and Saglani, S. T cells in asthma: influences of genetics, environment, and T-cell plasticity. 2013. *J Allergy Clin Immunol* 131, 1267-74; quiz 1275.
- 98 Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., Zurawski, S., Wiekowski, M., Lira, S.A., Gorman, D., Kastelein, R.A. and Sedgwick, J.D. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. 2003. *Nature*, 421:744-748.
- 99 Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q. and Dong, C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. 2005. *Nat Immunol*, 6:1133-1141.
- 100 Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J. and Littman, D.R. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. 2006. *Cell*, 126:1121-1133.
- 101 Ouyang, W., E. Filvaroff et al. Novel therapeutic targets along the Th17 pathway. 2009. *Eur J Immunol*, 39(3): 670-5.
- 102 Romagnani, S. Regulation of the T cell response. 2006. *Clin Exp Allergy* v. 36, no. 11, p. 1357-1366.
- 103 Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. and Kuchroo, V.K. IL-17 and Th17 Cells. 2009. *Annu Rev Immunol* 27, 485-517.
- 104 Aujla, S.J. and Alcorn, J.F. T(H)17 cells in asthma and inflammation. 2011. *Biochim Biophys Acta* 1810, 1066-79.
- 105 Maddur, M.S., et al. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. 2012. *Am J Pathol*, 181(1): p. 8-18.
- 106 Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M. and Weaver, C.T. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. 2005. *Nat Immunol* 6, 1123-32.

- 107 Dong, C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. 2008. *Nat Rev Immunol* 8, 337-48.
- 108 Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. and Kuchroo, V.K. IL-17 and Th17 Cells. 2009. *Annu Rev Immunol* 27, 485-517.
- 109 Bettelli, E., Carrier, Y., W. Gao, T. Korn, T.B. Strom, M. Oukka, H.L. Weiner, and V.K. Kuchroo. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. 2006. *Nature*, 441:235-238.
- 110 Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jäger, A., Strom, T.B., Oukka, M. and Kuchroo, V.K. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. 2007. *Nature*, 448:484-487.
- 111 Infante-Duarte, C., et al. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. 2000. *J Immunol*, 165(11): p. 6107-15.
- 112 Aarvak, T., et al. IL-17 is produced by some proinflammatory Th1/Th0 cells but not by Th2 cells. 1999. *J Immunol*, 162(3): p. 1246-51.
- 113 Annunziato, F., et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. 2007. *J Exp Med*, 204(8): p. 1849-61.
- 114 Sallusto, F., Zielinski, C.E., Lanzavecchia, A. Human Th17 subsets. 2012. *Eur J Immunol*, 42:2215–2220.
- 115 Zielinski, C.E., Mele, F., Aschenbrenner, D., et al. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta. 2012. *Nature*, 484:514–518.
- 116 Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.P. et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. 2010. *Nature*, 467:967–971.
- 117 Sallusto, F., Zielinski, C.E., Lanzavecchia, A. Human Th17 subsets. 2012. *Eur J Immunol*, 42:2215–2220.
- 118 Tesmer, L. A., Lundy, S. K., Sarkar, S., Fox, D. A. Th17 cells in human disease. 2008. *Immunol Rev*, 223: 87–113.
- 119 Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J. et al. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. 2006. *Immunity*, 24:179–189.
- 120 Esplugues, E., Huber, S., Gagliani, N., et al. Control of TH17 cells occurs in the small intestine. 2011. *Nature*, 475:514–518.
- 121 Das, J., Ren, G., Zhang, L. et al. Transforming growth factor beta is dispensable for the molecular orchestration of Th17 cell differentiation. 2009. *J Exp Med*, 206:2407-2416.

- 122 Molet, S. et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. 2001. *J Allergy Clin Immunol* 108, 430-438.
- 123 Al-Ramli, W. et al. TH17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. 2009. *J Allergy Clin Immunol* 123, 1185-1187.
- 124 Zhao, Y., Yang, J., Gao, Y. D. and Guo, W. Th17 immunity in patients with allergic asthma. 2010. *Int Arch Allergy Immunol* 151, 297-307.
- 125 Wakashian, H. et al. IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice. 2008. *Am J Respir Crit Care Med* 178, 1023-1032.
- 126 He, R., Oyoshi, M. K., Jin, H. und Geha, R. S. Epicutaneous antigen exposure induces a Th17 response that drives airway inflammation after inhalation challenge. 2007. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 15817-15822.
- 127 McKinley, L. et al. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. 2008. *J Immunol* 181, 4089-4097.
- 128 Wilson R. H. et al. Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness. 2009. *Am J Respir Crit Care Med* 180, 720-730.
- 129 Nakae, S. et al. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. 2002. *Immunity* 17, 375-387.
- 130 Schnyder-Candrian, S. et al. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. 2006. *J Exp Med* 203, 2715-2725.
- 131 Kao, C. Y., Y. Chen, et al. IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways. 2004. *J Immunol*, 173(5): 3482-91.
- 132 Kao, C. Y., Huang, F., et al. Up-regulation of CC chemokine ligand 20 expression in human airway epithelium by IL-17 through a JAK-independent but MEK/NF-kappaB-dependent signaling pathway. 2005. *Ibid*, 175(10): 6676-85.
- 133 Weaver, C. T. Th17: The ascent of a new effector T-cell subset. Preface. 2009. *Eur J Immunol*, 39(3): 634-6.
- 134 Newcomb, D.C., Boswell, M.G., Reiss, S., Zhou, W., Goleniewska, K., Toki, S., Harintho, M.T., Lukacs, N.W., Kolls, J.K. and Peebles, R.S. IL-17A inhibits airway reactivity induced by respiratory syncytial virus infection during allergic airway inflammation. 2013. *Thorax* 68, 717-23.
- 135 Sutton, C.E., Lalor, S.J., Sweeney, C.M., Brereton, C.F., Lavelle, E.C. and Mills, K.H. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. 2009. *Immunity* 31, 331-41.

- 136 Murdoch, J.R. and Lloyd, C.M. Resolution of allergic airway inflammation and airway hyperreactivity is mediated by IL-17-producing gamma delta T cells. 2010. *Am J Respir Crit Care Med* 182, 464-76.
- 137 Schaub, B., Liu, J., Hoppler, S., Schleich, I., Huehn, J., Olek, S., Wieczorek, G., Illi, S. and M. E. von. Maternal farm exposure modulates neonatal immune mechanisms through regulatory T cells. 2009. *J Allergy Clin Immunol*, v. 123, no. 4, p. 774-782.
- 138 Corren, J. Inhibition of interleukin-5 for the treatment of eosinophilic diseases. 2012. *Discov Med*, 13(71):305-12.
- 139 Corren, J., Lemanske, R.F., Hanania, N.A., Korenblat, P.E., Parsey, M.V., Arron, J.R., Harris, J.M., Scheerens, H., Wu, L.C., Su, Z., Mosesova, S., Eisner, M.D., Bohlen, S.P. and Matthews, J.G. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. 2011. *N Engl J Med* 365, 1088-98.
- 140 Masoli, M., Fabian, D., Holt, S. and Beasley, R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. 2004. *Allergy* 59, 469-478.
- 141 Anandan, C., Nurmatov, U., van Schayck, O.C. and Sheikh, A. Is the prevalence of asthma declining? Systematic review of epidemiological studies. 2010. *Allergy* 65, 152-167.
- 142 ISAAC, The International Study of Asthma and Allergies in Childhood, Steering Committee, Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic eczema: ISAAC. 1998. *Lancet*, 351: 1225-1232.
- 143 NAEPP, N.A.E.a.P.P., 1999. National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) National Institutes of Health, USA.
- 144 Duhme, H., Weiland, S.K., Rudolph, P., Wienke, A., Kramer, A. and Keil, U. Asthma and allergies among children in West and East Germany: A comparison between Münster and Greifswald using ISAAC phase I protocol. 1998. *Eur Respir J*, 11: 840-847.
- 145 Maziak, W., Behrens, T., Brasky, T.M., Duhme, H., Rzehak, P., Weiland, S.K. and Keil, U. Are asthma and allergies in children and adolescents increasing? Results from ISAAC phase I and phase III surveys in Münster, Germany. 2003. *Allergy*, 58(7): 572-579
- 146 Reuter, P. Springer Lexikon Medizin Medizin zum Begreifen nah. 2004. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, Heidelberg.
- 147 Ukena, D., Fishman, L. and Niebling, W.B. Asthma bronchiale - Diagnostik und Therapie im Erwachsenenalter. 2008. *Deutsches Ärzteblatt*.
- 148 Gillissen, A., Welte, T. Weißbuch Lunge 2000. 2014. Stuttgart-New York, Thieme.
- 149 Skadhauge, L.R., Christensen, K., Kyvik, K.O. and Sigsgaard, T. Genetic and environmental influence on asthma: a population-based study of 11,688 Danish twin pairs. 1999. *Eur Respir J* 13, 8-14.

- 150 Kuiper, S., Muris, J.W., Dompeling, E., Kester, A.D., Wesseling, G., Knottnerus, J.A. and van Schayck, C.P. Interactive effect of family history and environmental factors on respiratory tract-related morbidity in infancy. 2007. *J Allergy Clin Immunol* 120, 388-395.
- 151 Wu, T., Boezen, H.M., Postma, D.S., Los, H., Postmus, P.E., Snieder, H. and Boomsma, D.I. Genetic and environmental influences on objective intermediate asthma phenotypes in Dutch twins. 2010. *Eur Respir J* 36, 261-268.
- 152 Aberg, N. Familial occurrence of atopic disease: genetic versus environmental factors. 1993. *Clin Exp Allergy* 23, 829-834.
- 153 Ronmark, E., Lundback, B., Jonsson, E., Jonsson, A. C., Lindstrom, M. and Sandstrom, T. Incidence of asthma in adults--report from the Obstructive Lung Disease in Northern Sweden Study. 1997. *Allergy*, 52:1071-1078.
- 154 Burke, W., Fesinmeyer, M., Reed, K., Hampson, L. and Carlsten, C. Family history as a predictor of asthma risk. 2003. *Am J Prev Med*, 24:160-169.
- 155 Litonjua, A.A., Carey, V.J., Burge, H.A., Weiss, S.T. and Gold, D.R. Parental history and the risk for childhood asthma. Does mother confer more risk than father? 1998. *Am J Respir Crit Care Med* 158, 176-181.
- 156 Ly, N.P. and Celedon, J.C. Family history, environmental exposures in early life, and childhood asthma. 2007. *J Allergy Clin Immunol* 120, 271-272.
- 157 Hershey, G. K., Friedrich, M. F., Esswein, L. A., Thomas, M. L., and Chatila, T. A. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. 1997. *N Engl J Med*, 337:1720-1725.
- 158 Robinson, D. S., Hamid, Q., Ying, S., Tsicopoulos, A., Barkans, J., Bentley, A. M., Corrigan, C., Durham, S. R. and Kay, A. B. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. 1992. *N Engl J Med*, 326:298-304.
- 159 Ober, C. and Hoffjan, S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. 2006. *Genes Immun*, 7:95-100.
- 160 Hunninghake, G. M., Soto-Quiros, M. E., Avila, L., Su, J., Murphy, A., Demeo, D. L., Ly, N. P., Liang, C., Sylvia, J. S., Klanderman, B. J., Lange, C., Raby, B. A., Silverman, E. K. and Celedon, J. C. Polymorphisms in IL13, total IgE, eosinophilia, and asthma exacerbations in childhood. 2007. *J Allergy Clin Immunol*, 120:84-90.
- 161 Daniels, S.E., Bhattacharya, S., James, A., Leaves, N.I., Young, A., Hill, M.R., Faux, J.A., Ryan, G.F., le Souef, P.N., Lathrop, G.M., Musk, A.W., Cookson, W.O. A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. 1996. *Nature*, 383(6597):247-50.
- 162 Marsh, D.G., Neely, J.D., Breazeale, D.R., Ghosh, B., Freidhoff, L.R., Ehrlich-Kautzky, E., Schou, C., Krishnaswamy, G., Beaty, T.H. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. 1994. *Science*, 264(5162):1152-6.

- 163 Heinzmann, A., Blattmann, S., Forster, J., Kuehr, J., Deichmann, K.A. Common polymorphisms and alternative splicing in the ILT3 gene are not associated with atopy. 2000. *Eur J Immunogenet*, 27(3):121-7.
- 164 Ober, C., Moffatt, M.F. Contributing factors to the pathobiology. The genetics of asthma. 2000. *Clin Chest Med*, 21(2):245-61.
- 165 Moffatt, M.F., Kabesch, M., Liang, L., Dixon, A.L., Strachan, D., Heath, S., Depner, M., von Berg, A., Bufe, A. and Rietschel, E., et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. 2007. *Nature* 448, 470-473.
- 166 Marsh, D.G., Hsu S.H., Roebber, M., Erlich, E., Kautzky, Freidhoff, L.R., Meyers, D.A., Pollard, M.K. and Bias, W.B. HLA-Dw2: A genetic marker for humane immune response to short ragweed pollen allergen Ra5. I. Response resulting primarily from natural antigen exposure. 1982. *J Exp Med*, 155: 1439-1451.
- 167 Duffy, D.L., Martin, N.G., Battisutta, D., Hoffer, J.L. and Mathews, J.D. Genetics of asthma and hay fever in Australien twins. 1990. *Am Rev Respir Dis*, 414: 1351-1358.
- 168 Van Herwerden, L., Harrap, S.B., Wong, Z.Y.H., et al. Linkage of high-affinity IgE receptor gene with bronchial hyperreactivity, even in absence of atopy. 1995. *Lancet*, 346: 894-900.
- 169 D'Amato, G., Liccardi, G., D'Amato, M. Environmental risk factors (outdoor air pollution and climatic changes) and increased trend of respiratory allergy. 2000. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 10(3):123-8.
- 170 von Mutius, E., Martinez, F. D., Fritzsche, C., Nicolai, T., Roell, G. and Thiemann, H. Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. 1994. *Am J Respir Crit Care Med*, 149:358-364.
- 171 von Mutius, E., Fritzsche, C., Weiland, S.K., Roll, G., Magnussen, H. Prevalence of asthma and allergic disorders among children in united Germany: a descriptive comparison. 1992. *BMJ*, 305(6866):1395-9.
- 172 Kramer, U., Heinrich, J., Wjst, M., Wichmann, H.E. Age of entry to day nursery and allergy in later childhood. 1999. *Lancet*, 353(9151):450-4.
- 173 von Mutius, E., Weiland, S.K., Fritzsche, C., Duhme, H., Keil, U. Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany. 1998. *Lancet*, 351(9106):862-6.
- 174 Wahn, U., Lau, S., Bergmann, R., Kulig, M., Forster, J., Bergmann, K., Bauer, C.P., Guggenmoos-Holzmann, I. Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life. 1997. *J Allergy Clin Immunol*, 99(6 Pt 1):763-9.
- 175 Magnusson, L. L., Olesen, A. B., Wennborg, H., and Olsen, J. Wheezing, asthma, hayfever, and atopic eczema in childhood following exposure to tobacco smoke in fetal life. 2005. *Clin Exp Allergy*, 35:1550-1556.

- 176 Fedulov, A. V., Leme, A., Yang, Z., Dahl, M., Lim, R., Mariani, T. J. and Kobzik, L. Pulmonary exposure to particles during pregnancy causes increased neonatal asthma susceptibility. 2008. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 38:57-67.
- 177 Strachan, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. 1989. *BMJ*, 299:1259-1260.
- 178 Jarvis, D., Chinn, S., Luczynska, C. and Burney, P. The association of family size with atopy and atopic disease. 1997. *Clin Exp Allergy*, 27:240-245.
- 179 Celedon, J. C., Litonjua, A. A., Weiss, S. T. and Gold, D. R. Day care attendance in the first year of life and illnesses of the upper and lower respiratory tract in children with a familial history of atopy. 1999. *Pediatrics*, 104:495-500.
- 180 Ball, T. M., Castro-Rodriguez, J. A., Griffith, K. A., Holberg, C. J., Martinez, F. D. and Wright, A. L. Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. 2000. *N Engl J Med*, 343:538-543.
- 181 Juntti, H., Kokkonen, J., Dunder, T., Renko, M., Niinimäki, A., Uhari, M. Association of an early respiratory syncytial virus infection and atopic allergy. 2003. *Allergy*, 58(9):878-84.
- 182 Illi, S., von Mutius, E., Lau, S., Bergmann, R., Niggemann, B., Sommerfeld, C., Wahn, U. and Group, M. Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study. 2001. *BMJ* 322, 390-5.
- 183 Freund, R., Fröhlich, W. and Nase, J. So helfen Sie ihrem Kind bei Asthma. 2008. Oberstebring Verlag GmbH. Vol. 1. Auflage.
- 184 Schmidt, S.M. Atemwegs-Infektionen, Giemen und Asthma Bronchiale. 2011. Pädiatrische Allergologie in Klinik und Praxis 2.
- 185 Heinrich, J., Hoelscher, B., Frye, C., Meyer, I., Wjst, M. and Wichmann, H.E. Trends in prevalence of atopic diseases and allergic sensitization in children in Eastern Germany. 2002. *Eur Respir J* 19, 1040-1046.
- 186 Illi, S., von Mutius, E., Lau, S., Nickel, R., Niggemann, B., Sommerfeld, C. and Wahn, U. The pattern of atopic sensitization is associated with the development of asthma in childhood. 2001. *J Allergy Clin Immunol*, 108(5):709-714.
- 187 Weiss, S. T. Eat dirt-the hygiene hypothesis and allergic diseases. 2002. *N Engl J Med*, 347(12):930-931.
- 188 Braun-Fahrlander, C., Gassner, M., Grize, L., Neu, U., Sennhauser, F.H., Varonier, H.S., Vuille, J.C. and Wuthrich, B. Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. 1999. *Clin Exp Allergy* 29, 28-34.
- 189 Riedler, J., Eder, W., Oberfeld, G. and Schreuer, M. Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization. 2000. *Clin Exp Allergy*, 30:194-200.

- 190 Riedler, J., Braun-Fahrlander, C., Eder, W., Schreuer, M., Waser, M., Maisch, S., Carr, D., Schierl, R., Nowak, D. and von Mutius, E. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. 2001. *Lancet*, 358:1129-1133.
- 191 Braun-Fahrlander, C., Riedler, J., Herz, U., Eder, W., Waser, M., Grize, L., Maisch, S., Carr, D., Gerlach, F., Bufe, A., Lauener, R. P., Schierl, R., Renz, H., Nowak, D. and von Mutius, E. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. 2002. *N Engl J Med*, 347:869-877.
- 192 Alfven, T., Braun-Fahrlander C., Brunekreef, B., von Mutius, E., Riedler, J., Scheynius, A., van Hage, M., Wickman, M., Benz, M.R. and Budde, J., et al. Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle-the PARSIFAL study. 2006. *Allergy* 61, 414-421.
- 193 Waser, M., Michels, K.B., Bieli, C., Floistrup, H., Pershagen, G., von Mutius, E., Ege, M., Riedler, J., Schram-Bijkerk, D. and Brunekreef, B. et al. Inverse association of farm milk consumption with asthma and allergy in rural and suburban populations across Europe. 2007. *Clin Exp Allergy* 37, 661-670.
- 194 Schram-Bijkerk, D., Doekes, G., Douwes, J., Boeve, M., Riedler, J., Ublagger, E., von Mutius, E., Benz, M.R., Pesshagen, G., von Hage, M., Scheynius, A., Braun-Fahrlander, C., Waser, M., Brunekreef, B. Bacterial and fungal agents in house dust and wheeze in children: the PARSIFAL study. 2005. *Clin Exp Allergy* 35, 1272–1278.
- 195 Van Strien R.T., Engel, R., Holst, O., Bufe, A., Eder, W., Waser, M., Braun-Fahrlander, C., Riedler, J., Nowak, D., von Mutius, E.,. Microbial exposure of rural school children, as assessed by levels of N-Acetyl-muramic acid in mattress dust, and its association with respiratory health. 2004. *J Allergy Clin Immunol* 113, 860-867.
- 196 Ege, M.J., Mayer, M., Normand, A.C., Genuneit, J., Cookson, W.O., Braun-Fahrlander, C., Heederik, D., Piarroux, R. and von Mutius, E. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. 2011. *N Engl J Med* 364, 701-709.
- 197 Debarry, J., Garn, H., Hanuszkiewicz, A., Dickgreber, N., Blumer, N., von Mutius, E., Bufe, A., Gattermann, S., Renz, H., Holst, O. and Heine, H. *Acinetobacter lwoffii* and *Lactococcus lactis* strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties. 2007. *J Allergy Clin Immunol*, 119:1514-1521.
- 198 Conrad, M. L., Ferstl, R., Teich, R., Brand, S., Blumer, N., Yildirim, A. O., Patrascan, C. C., Hanuszkiewicz, A., Akira, S., Wagner, H., Holst, O., von Mutius, E., Pfefferle, P. I., Kirschning, C. J., Garn, H. and Renz, H. Maternal TLR signaling is required for prenatal asthma protection by the nonpathogenic microbe *Acinetobacter lwoffii* F78. 2009. *J Exp Med*, 206:2869-2877.
- 199 Klinman, D. M. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. 2004. *Nat Rev Immunol*, 4:249-258.
- 200 Blümer, N., Herz, U., Wegmann, M. and Renz, H. Prenatal lipopolysaccharide-exposure prevents allergic sensitization and airway inflammation, but not airway

- responsiveness in a murine model of experimental asthma. 2005. *Clin Exp Allergy*, 35:397-402.
- 201 von Mutius, E. and le Souef, P. N. Early gene-environment interactions: can they inform primary preventive strategies for asthma? 2007. *Semin Respir Crit Care Med*, 28:255-263.
- 202 Adkins, B. Development of neonatal Th1/Th2 function. 2000. *Int Rev Immunol*, 19(2-3):157-171.
- 203 Adkins, B., Leclerc, C. and Marshall-Clarke, S. Neonatal adaptive immunity comes of age. 2004. *Nat Rev Immunol*, 4(7):553-564.
- 204 Prescott, S. L., Macaubas, C., Holt, B. J., Smallacombe, T. B., Loh, R., Sly, P.D. and Holt, P. G. Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. 1998. *J Immunol*, 160(10):4730-4737.
- 205 Levy, O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. 2007. *Nat Rev Immunol*, 7(5):379-390.
- 206 WONG, G.W. K., VON MUTIUS, E., DOUWES, J., PEARCE, N. Environmental determinants associated with the development of asthma in childhood. 2006. *Int J Tubercul Lung Dis*, 10 (3): 242-251.
- 207 Romagnani, S. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? 2004. *Immunology*, 112:352-363.
- 208 von Mutius, E. and Vercelli, D. Farm living: effects on childhood asthma and allergy. 2010. *Nat Rev Immunol* 10, 861-868.
- 209 Akira, S., Takeda, K. and Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. 2001. *Nat Immunol*, 2(8):675-680.
- 210 Horner, A. A. Toll-like receptor ligands and atopy: a coin with at least two sides. 2006. *J Allergy Clin Immunol*, 117(5):1133-1140.
- 211 Cook, D. N., Pisetsky, D. S. and Schwartz, D. A. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. 2004. *Nat Immunol*, 5(10):975-979.
- 212 Jin, M., Opalek, J.M., Marsh, C.B. and Wu, H.M. Proteome comparison of alveolar macrophages with monocytes reveals distinct protein characteristics. 2004. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 322-329.
- 213 Muller, C. A., Autenrieth, I. B. and Peschel, A. Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. 2005. *Cell Mol Life Sci*, 62(12):1297-1307.
- 214 Janeway, C. A., Jr. and Medzhitov, R. Innate immune recognition. 2002. *Annu Rev Immunol*, 20:197-216.

- 215 Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. and Beutler, B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. 1998. *Science*, 282(5396):2085-2088.
- 216 Travassos, L. H., Girardin, S. E., Philpott, D. J., Blanot, D., Nahori, M. A., Werts, C. and Boneca, I. G. Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. 2004. *EMBO Rep*, 5(10):1000-1006.
- 217 Buwitt-Beckmann, U., Heine, H., Wiesmuller, K. H., Jung, G., Brock, R. and Ulmer, A. J. Lipopeptide structure determines TLR2 dependent cell activation level. 2005. *FEBS J*, 272(24):6354-6364.
- 218 Akira, S. Toll-like receptor signaling. 2003. *J Biol Chem* 278, 38105-38108.
- 219 Erridge, C., Bennett-Guerrero, E., et al. Structure and function of lipopolysaccharides. 2002. *Microbes Infect*, 4(8): 837-851.
- 220 Waddington, C. The epigenotype. 1942. *Endeavour* 1, 18–20.
- 221 Bird, A. Perceptions of epigenetics. 2007. *Nature*, v. 447, no. 7143, p. 396-398.
- 222 Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. and Jones, P. A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. 2004. *Nature*, 429(6990): 457-463.
- 223 Vaissiere, T., Sawan, C. and Herceg, Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. 2008. *Mutat Res*, 659:40-48.
- 224 Fraga, M.F., Ballestar, E., Paz, M.F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M.L., Heine-Suner, D., Cigudosa, J.C., Urioste, M., Benitez, J., Boix-Chornet, M., Sanchez-Aguilera, A., Ling, C., Carlsson, E., Poulsen, P., Vaag, A., Stephan, Z., Spector, T.D., Wu, Y.Z., Plass, C. and Esteller, M. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. 2005. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 10604-10609.
- 225 Anway, M. D., Cupp, A. S., Uzumcu, M. and Skinner, M. K. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. 2005. *Science*, v. 308, no. 5727, p. 1466-1469.
- 226 Waterland, R. A. and Jirtle, R. L. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. 2003. *Mol Cell Biol*, v. 23, no. 15, p. 5293-5300.
- 227 Vuillermin, P. J., Ponsonby, A. L., Saffery, R., Tang, M. L., Ellis, J. A., Sly, P. and Holt, P. Microbial exposure, interferon gamma gene demethylation in naive T-cells, and the risk of allergic disease. 2009. *Allergy*, v. 64, no. 3, p. 348-353.
- 228 Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. 2002. *Genes Dev*, v. 16, no. 1, p. 6-21.
- 229 Klose, R. J. and Bird, A. P. Genomic DNA methylation: the mark and its Mediators. 2006. *Trends Biochem Sci*, v. 31, no. 2, p. 89-97.

- 230 Jaenisch, R. and Bird, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. 2003. *Nat Genet* 33 Suppl:245-254.
- 231 Feinberg, A.P. and Tycko, B. The history of cancer epigenetics. 2004. *Nat Rev Cancer* 4, 143-153.
- 232 Reik, W. and Walter, J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. 2001. *Nature Reviews Genetics*, 2(1): 21-32.
- 233 Yoder, J. A., Walsh, C. P. and Bestor, T. H. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. 1997. *Trends Genet*, v. 13, no. 8, p. 335-340.
- 234 Horsthemke, B. and Wagstaff, J. Mechanisms of imprinting of the Prader-Willi/Angelman region. 2008. *Am J Med Genet A*, v. 146A, no. 16, p. 2041-2052.
- 235 Jones, B. and Chen, J. Inhibition of IFN-gamma transcription by site-specific methylation during T helper cell development. 2006. *EMBO J*, v. 25, no. 11, p. 2443-2452.
- 236 Hark, A. T., Schoenherr, C. J., Katz, D. J., Ingram, R. S., Levorse, J. M. and Tilghman, S. M. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. 2000. *Nature*, v. 405, no. 6785, p. 486-489.
- 237 Iguchi-Ariga, S. M. and Schaffner, W. CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. 1989. *Genes Dev*, 3:612-619.
- 238 Reik, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian Development. 2007. *Nature*, v. 447, no. 7143, p. 425-432.
- 239 Ralph, P., Nakoinz, I. Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line. 1975. *Nature*, 257:393-4.
- 240 Clark, S. J., Harrison, J., Paul, C. J. and Frommer, M. High sensitivity of methylated cytosines. 1994. *Nucleic Acids Research*, 22, 2990-2997.
- 241 Tost, J. and Gut, I. G. DNA methylation analysis by pyrosequencing. 2007. *Nat Protoc*, 2:2265-2275.
- 242 http://www.biospektrum.de/blatt/d_bs_pdf&_id=959858.
- 243 Aderem, A. and Ulevitch, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. 2000. *Nature*, 406(6797): 782-787.
- 244 Erridge, C., Bennett-Guerrero, E. et al. Structure and function of lipopolysaccharides. 2002. *Microbes Infect*, 4(8): 837-851.
- 245 Gerhold, K., Blumchen, K., Bock, A., Seib, C., Stock, P., Kallinich, T., Lohning, M., Wahn, U. and Hamelmann, E. Endotoxins prevent murine IgE production, T(H)2 immune responses, and development of airway eosinophilia but not airway hyperreactivity. 2002. *J Allergy Clin Immunol*, 110(1):110-116.

- 246 Renz, H. and Herz, U. The bidirectional capacity of bacterial antigens to modulate allergy and asthma. 2002. *Eur Respir J*, 19(1):158-171.
- 247 Lönnroth, I. and Holmgren, J. Subunit Structure of Cholera Toxin. 1973. *J.Gen Microbiol*, 76: 417–427.
- 248 Aman, A.T., Fraser, S., Merritt, E.A., Rodighiero, C., Kenny, M., Ahn, M., Hol, W.G.J., Williams, N.A., Lencer, W.I., Hirst, T.R. A mutant Cholera-Toxin B subunit that binds GM1-ganglioside but lacks immunomodulatory or toxic activity. 2001. *Proc Natl Acad Sci*, 98: 8536-8541.
- 249 Field, M., Rao ,M.C. and Chang, E.B. Intestinal electrolyte transport and diarrheal Disease. 1989. *N Engl J Med*, 321(12): p. 800-6.
- 250 Pschyrembel. 2002. *Klinisches Wörterbuch*, 259. Auflage.
- 251 Lycke, N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. 2012. *Nat Rev Immunol*, 12: 592–605.
- 252 Becker, P.D., et al. The HIV-1 matrix protein p17 can be efficiently delivered by intranasal route in mice using the TLR 2/6 agonist MALP-2 as mucosal adjuvant. 2006. *Vaccine*, 24(25): p. 5269-76.
- 253 Borsutzky, S., et al. Efficient systemic and mucosal responses against the HIV-1 Tat protein by prime/boost vaccination using the lipopeptide MALP-2 as adjuvant. 2006. *Vaccine*, 24(12): p. 2049-56.
- 254 Luhrmann, A., et al. Improved intranasal immunization with live-attenuated measles virus after co-inoculation of the lipopeptide MALP-2. 2005. *Vaccine*, 23(39): p. 4721-6.
- 255 Lavelle, E.C., et al. Effects of cholera toxin on innate and adaptive immunity and its application as an immunomodulatory agent. 2004. *J Leukoc Biol*, 75(5): p. 756-63.
- 256 Zurbriggen, R., et al. Nonclinical safety evaluation of Escherichia coli heat-labile toxin mucosal adjuvant as a component of a nasal influenza vaccine. 2003. *Expert Rev Vaccines*, 2(2): p. 295-304.
- 257 Bregenholt, S., Wang, M., Wolfe, T., Hughes, A., Barentzen, L., Dyrberg, T., von Herrath, M.G., Petersen, J.S. The Cholera-Toxin B subunit is a mucosal adjuvant for oral tolerance induction in Type 1 Diabetes. 2003. *Scand J Immunol*, 57: 432-438.
- 258 Kawai, T. and Akira, S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. 2005. *Curr Opin Immunol*, 17(4): p. 338-44.
- 259 Holmgren, J., Adamsson, J., Anjuère, F., Clemens, J., Czerkinsky, C., Eriksson, K., Flach, C.F., George-Chandy, A., Harandi, A. M., Lebens, M., Lehner, T., Lindblad, M., Nygren, E., Raghavan, S., Sanchez, J., Stanford, M., Sun, J.B., Svennerholm, A.M. and Tengvall, S. Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. 2005. *Immunol Lett*, 97: 181–188.

- 260 Rask, C., Holmgren, J., Fredriksson, M., Lindblad, M., Nordstrom, I., Sun, J.B. and Czerkinsky, C. Prolonged oral treatment with low doses of allergen conjugated to cholera toxin B subunit suppresses immunoglobulin E antibody responses in sensitized mice. 2000. *Clin Exp Allergy* 30, 1024-1032.
- 261 Humbert, M., Menz, G., Ying, S., Corrigan, C.J., Robinson, D.S., Durham, S.R., Kay, A.B. The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences. 1999. *Immunol Today*, 20 (11): 528-533.
- 262 Kotsimbos, A. T. and Hamid, Q. IL-5 and IL-5 receptor in asthma. 1997. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 92 Suppl 2, p. 75-91.
- 263 Mathur, M., Herrmann, K., Li, X., Qin, Y., Weinstock, J., Elliott, D., Monahan, J. and Padrid, P. TRFK-5 reverses established airway eosinophilia but not established hyperresponsiveness in a murine model of chronic asthma. 1999. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 159, no. 2, p. 580-587.
- 264 Bousquet, J., Chanez, P., Lacoste, J.Y., Barneon, G., Ghavanian, N., Enander, I., Venge, P., Ahlstedt, S., Simony Lafontaine, J., Godard, P., et al. Eosinophilic inflammation in asthma. 1990. *N Engl J Med*, 323:1033-1039.
- 265 Foster, P., Ming, Y., Matthei, K., Young, I., Temelkovski, J., Kumar, R. Dissociation of Inflammatory and Epithelial Responses in a Murine Model of Chronic Asthma. 2000. *Laboratory Investigations*, Vol 80 (5) pp. 655-662.
- 266 Hamelmann, E., Gelfand, E.W. IL-5-induced airway eosinophilia – the key to asthma? 2001. *Immunological Reviews*, Vol. 179: 182–191.
- 267 Kumar, R.K., Herbert, C., Yang, M., Koskinen, A., McKenzie, A., Foster, P.S. Role of Interleukin-13 in eosinophil accumulation and airway remodelling in a mouse model of chronic asthma. 2002. *Clin Exp Allergy*, 32: 1104-1111.
- 268 Kuperman, D. A., Huang, X., Koth, L. L., Chang, G. H., Dolganov, G. M., Zhu, Z., Elias, J. A., Sheppard, D. and Erle, D. J. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. 2002. *Nat Med*, v. 8, no. 8, p. 885-889.
- 269 Humbert, M., Durham, S. R., Kimmitt, P., Powell, N., Assoufi, B., Pfister, R., Menz, G., Kay, A. B. and Corrigan, C. J. Elevated expression of messenger ribonucleic acid encoding IL-13 in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic subjects with asthma. 1997. *J Allergy Clin Immunol*, v. 99, no. 5, p. 657-665.
- 270 Delayre-Orthez, C., Becker, J., de Blay, F., Frossard, N. and Pons, F. Exposure to endotoxins during sensitization prevents further endotoxin-induced exacerbation of airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. 2005. *Int Arch Allergy Immunol*, 138(4):298-304.
- 271 Repa, A., Grangette, C., Daniel, C., Hochreiter, R., Hoffmann-Sommergruber, K., Thalhamer, J., Kraft, D., Breiteneder, H., Mercenier, A. and Wiedermann, U. Mucosal coapplication of lactic acid bacteria and allergen induces counter-regulatory immune responses in a murine model of birch pollen allergy. 2003. *Vaccine*, 22(1):87-95.

- 272 Adel-Patient, K., Ah-Leung, S., Creminon, C., Nouaille, S., Chatel, J. M., Langella, P. and Wal, J. M. Oral administration of recombinant *Lactococcus lactis* expressing bovine betalactoglobulin partially prevents mice from sensitization. 2005. *Clin Exp Allergy*, 35(4):539-546.
- 273 Murosaki, S., Yamamoto, Y., Ito, K., Inokuchi, T., Kusaka, H., Ikeda, H. and Yoshikai, Y. Heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 suppresses naturally fed antigen-specific IgE production by stimulation of IL-12 production in mice. 1998. *J Allergy Clin Immunol*, 102(1):57-64.
- 274 Chu, H. W., Honour, J. M., Rawlinson, C. A., Harbeck, R. J. and Martin, R. J. Effects of respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection on allergen-induced bronchial hyperresponsiveness and lung inflammation in mice. 2003. *Infect Immun*, 71(3):1520-1526.
- 275 Mims, C.A. *The Pathogenesis of Infectious Diseases*. 1987. London Academic Press, 3rd Edition, 312pp.
- 276 Delayre-Orthez, C., de Blay, F., Frossard, N. and Pons, F. Dose-dependent effects of endotoxins on allergen sensitization and challenge in the mouse. 2004. *Clin Exp Allergy*, 34(11):1789-1795.
- 277 Kuipers, H., Hijdra, D., De Vries, V. C., Hammad, H., Prins, J. B., Coyle, A. J., Hoogsteden, H. C. and Lambrecht, B. N. Lipopolysaccharide-induced suppression of airway Th2 responses does not require IL-12 production by dendritic cells. 2003. *J Immunol*, 171(7):3645-3654.
- 278 Sharon, N., Lis, H. Legume lectins – a large family of homologous proteins. 1990. *FASEB J*, 4: 3198-3208.
- 279 Timoshenko, A.V., Gorudko, I.V., Andre, S., Gabius, H.J. Cell-type dependence of stability modulation of lectin-initiated contacts by impairment of multivalent carbohydrate binding and intracellular signaling. 2000. *Biosci Rep*, 20: 199-209.
- 280 Sandvig, K., Spilsberg, B., Lauvrak, S.U., Torgersen, M.L., Iversen, T.G., van Deurs, B. Pathways followed by protein toxins into cells. 2004. *Int J Med Microbiol*, 293: 483-490.
- 281 Neumann, J. *Immunbiologie-Eine Einführung*. 2008. Springer Lehrbuch.
- 282 Klinman, D. M., Yi, A. K., et al. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. 1996. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(7): 2879-2883.
- 283 Khair, O.A., Devalia, J.L., Abdelaziz, M.M., Sapsford, R.J., Tarraf, H., Davies, R.J. Effect of *Haemophilus influenzae* endotoxin on the synthesis of IL-6, IL-8, TNF- α and expression of ICAM-1 in cultured human bronchial epithelial cells. 1994. *Eur Respir J*, 7, 2109–2116.
- 284 Akira, S.; Takeda, K. Toll-like receptor signalling. 2004. *Nat Rev Immunol*, 4: 499-511.

- 285 Erb, K.J., Holloway, J.W., Sobeck, A., Moll, H. and Le Gros, G. Infection of mice with *Mycobacterium bovis* Bacillus-Calmette-Guérin (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia. 1998. *J Exp Med*, 187: 561-569.
- 286 Lack, G., Renz, H., Saloga, J., Bradley, K. L., Loader, J., Leung, D. Y., Larsen, G. and Gelfand, E. W. Nebulized but not parenteral IFN-gamma decreases IgE production and normalizes airways function in a murine model of allergen sensitization. 1994. *J Immunol*, 152:2546-2554.
- 287 Fitch, F. W., McKisic, M.D., Lancki, D.W. and Gajewski, T.F. Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. 1993. *Annu Rev Immunol*, v. 11, p. 29-48.
- 288 Repa, A., et al. Mucosal co-application of lactic acid bacteria and allergen induces counter-regulatory immune responses in a murine model of birch pollen allergy. 2003. *Vaccine*, v. 22, no. 1, p. 87-95.
- 289 Ohno, H., Tsunemine, S., Isa, Y., Shimakawa, M. and Yamamura, H. Oral administration of *Bifidobacterium bifidum* G9-1 suppresses total and antigen specific immunoglobulin E production in mice. 2005. *Biol Pharm Bull*, v. 28, no. 8, p. 1462-1466.
- 290 Jirik, F.R., Podor, T.J., Hirano, T., et al. Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. 1989, *J Immunol*, 142(1):144-147.
- 291 Petrovsky, N. and Aguilar, J. C. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. 2004. *Immunology and Cell Biology*, 82(5): 488-496.
- 292 Wiedermann, U., Jahn-Schmid, B., Lindblad, M., et al. Suppressive versus stimulatory effects of allergen/cholera toxoid (CTB) conjugates depending on the nature of the allergen in a murine model of type I allergy. 1999. *Int Immunol*, 11: 1131-1138.
- 293 Eriksson, K., Fredriksson, M., Nordström, I., Holmgren, J. Cholera Toxin and Its B Subunit Promote Dendritic Cell Vaccination with Different Influences on Th1 and Th2 Development. 2003. *Infect Immun*, 71(4): 1740–1747.
- 294 Sun, J.B., Flach, C.F., Czerkinsky, C., Holmgren, J. B Lymphocytes Promote Expansion of Regulatory T Cells in Oral Tolerance: Powerful Induction by Antigen Coupled to Cholera Toxin B Subunit 1. 2008. *J Immunol*, 181: 8278–8287.
- 295 Webster, D.E., Gahan, M.E., Strugnell, R.A., Wesselingh, S.L. Advances in oral vaccine delivery options: what is on the horizon? 2003. *American Journal of Drug Delivery*, 1(4): 227-240.
- 296 Marini, M., Vittori, E., Hollemborg, J. and Mattoli, S. Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8 in bronchial epithelial cells of patients with asthma. 1992. *J Allergy Clin Immunol* 89, 1001-1009.

- 297 Sousa, A.R., Lane, S.J., Nakhosteen, J.A., Yoshimura, T., Lee, T.H., Poston, R.N. Increased expression of the monocyte chemoattractant protein-1 in bronchial tissue from asthmatic subjects. 1994. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 10 (2): 142-147.
- 298 Stellato, C., Beck, L.A., Gorgone, G.A., Proud, D., Schall, T.J., Ono, S.J., Lichtenstein, L.M., Schleimer, R.P. Expression of the chemokine RANTES by a human bronchial epithelial cell line. Modulation by cytokines and glucocorticoids. 1995. *J Immunol*, 155 (1): 410-418.
- 299 Nakamura, T., Lee, R. K., Nam, S. Y., Podack, E. R., Bottomly, K. and Flavell, R. A. Roles of IL-4 and IFN-gamma in stabilizing the T helper cell type 1 and 2 phenotype. 1997. *J Immunol*, 158(6):2648-2653.
- 300 Miner, K. T. and Croft, M. Generation, persistence, and modulation of Th0 effector cells: role of autocrine IL-4 and IFN-gamma. 1998. *J Immunol*, 160(11):5280-5287.
- 301 Brand, S., et al. Epigenetic regulation in murine offspring as a novel mechanism for transmaternal asthma protection induced by microbes. 2011. *J Allergy Clin Immunol*, 128 (3): 618-25.e1-7.
- 302 Stockinger, B., Veldhoen, M. Differentiation and function of Th17 T cells. 2007. *Curr Opin Immunol*, 19 (3), S. 281–286.
- 303 Hawrylowicz, C. M. and O'Garra, A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. 2005. *Nat Rev Immunol*, v. 5, no. 4, p. 271-283.
- 304 Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T. Y., Karp, C. L. and Donaldson, D.D. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. 1998. *Science*, v 282, no. 5397, p. 2258-2261.
- 305 Couper, K. N., Blount, D. G. and Riley, E. M. IL-10 the master regulator of immunity to infection. 2008. *J Immunol*, v. 180, no. 9, p. 5771-5777.
- 306 Jankovic, D. and Trinchieri, G. IL-10 or not IL-10: that is the question. 2007. *Nat Immunol*, v. 8, no. 12, p. 1281-1283.
- 307 Lambrecht, B. N., De Veerman, M., Coyle, A. J., Gutierrez-Ramos, J. C., Thielemans, K. and Pauwels, R. A. Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. 2000. *J Clin Invest*, 106(4):551-559.
- 308 Van Rijt, L. S. and Lambrecht, B. N. Dendritic cells in asthma: a function beyond sensitization. 2005. *Clin Exp Allergy*, 35(9):1125-1134.
- 309 De Jong, E. C., Smits, H. H. and Kapsenberg, M. L. Dendritic cell-mediated T cell polarization. 2005. *Springer Semin Immunopathol*, 26(3):289-307.
- 310 Robbe, P., Spierenburg, E.A., Draijer, C., Brandsma, C.A., Telenga, E., van Oosterhout, A.J., van den Berge, M., Luinge, M., Melgert, B.N., Heederik, D., Timens

- W., Wouters, I.M., Hylkema, M.N. Shifted T-cell polarisation after agricultural dust exposure in mice and men. 2014. *Thorax*, 69(7):630-7.
- 311 Mehra, A., Lee, K. H. and Hatzimanikatis, V. Insights into the relation between mRNA and protein expression patterns I. Theoretical considerations. 2003. *Biotechnol Bioeng*, v. 84, no. 7, p. 822-833.
- 312 Pohlers, D., Siegling, A., Buchner, E., Schmidt-Weber, C. B., Palombo-Kinne, E., Emmrich, F., Brauer, R. and Kinne, R. W. Expression of cytokine mRNA and protein in joints and lymphoid organs during the course of rat antigen-induced arthritis. 2005. *Arthritis Res Ther*, v. 7, no. 3, p. R445-R457.
- 313 Nie, L., Wu, G. and Zhang, W. Correlation of mRNA expression and protein abundance affected by multiple sequence features related to translational efficiency in *Desulfovibrio vulgaris*: a quantitative analysis. 2006. *Genetics*, v. 174, no. 4, p. 2229-2243.

8 LITERATURVERZEICHNIS (Alphabetisch)

Aarvak, T., et al. IL-17 is produced by some proinflammatory Th1/Th0 cells but not by Th2 cells. 1999. *J Immunol*, 162(3): p. 1246-51.

Abbas, A.K., Murphy, K.M., and Sher, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. 1996. *Nature*, 383: 787-793.

Aberg, N. Familial occurrence of atopic disease: genetic versus environmental factors. 1993. *Clin Exp Allergy* 23, 829-834.

Adel-Patient, K., Ah-Leung, S., Creminon, C., Nouaille, S., Chatel, J. M., Langella, P. and Wal, J. M. Oral administration of recombinant *Lactococcus lactis* expressing bovine betalactoglobulin partially prevents mice from sensitization. 2005. *Clin Exp Allergy*, 35(4):539-546.

Aderem, A. and Ulevitch, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. 2000. *Nature*, 406(6797): 782-787.

Adkins, B. Development of neonatal Th1/Th2 function. 2000. *Int Rev Immunol*, 19(2-3):157-171.

Adkins, B., Leclerc, C. and Marshall-Clarke, S. Neonatal adaptive immunity comes of age. 2004. *Nat Rev Immunol*, 4(7):553-564.

Akdis, M., Verhagen, J., Taylor, A., Karamloo, F., Karagiannidis, C., Cramer, R., Thunberg, S., Deniz, G., Valenta, R., Fiebig, H., Kegel, C., Disch, R., Schmidt-Weber, C. B., Blaser, K., and Akdis, C. A. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. 2004. *J Exp Med*, 199(11):1567-1575.

Akira, S., Takeda, K. and Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. 2001. *Nat Immunol*, 2(8):675-680.

Akira, S., Takeda, K. Toll-like receptor signalling. 2004. *Nat Rev Immunol*, 4: 499-511.

Akira, S. Toll-like receptor signaling. 2003. *J Biol Chem* 278, 38105-38108.

Alfven, T., Braun-Fahrlander C., Brunekreef, B., von Mutius, E., Riedler, J., Scheynius, A., van Hage, M., Wickman, M., Benz, M.R. and Budde, J., et al. Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle-the PARSIFAL study. 2006. *Allergy* 61, 414-421.

Al-Ramli, W. et al. TH17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. 2009. *J Allergy Clin Immunol* 123, 1185-1187.

Aman, A.T., Fraser, S., Merritt, E.A., Rodighiero, C., Kenny, M., Ahn, M., Hol, W.G.J., Williams, N.A., Lencer, W.I., Hirst, T.R. A mutant Cholera-Toxin B subunit that binds GM1-ganglioside but lacks immunomodulatory or toxic activity. 2001. *Proc Natl Acad Sci*, 98: 8536-8541.

- Anandan, C., Nurmatov, U., van Schayck, O.C. and Sheikh, A. Is the prevalence of asthma declining? Systematic review of epidemiological studies. 2010. *Allergy* 65, 152-167.
- Anderson, G. P. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. 2008. *Lancet* v. 372, no. 9643, p. 1107-1119.
- Annunziato, F., et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. 2007. *J Exp Med.* 204(8): p. 1849-61.
- Anway, M. D., Cupp, A. S., Uzumcu, M. and Skinner, M. K. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. 2005. *Science*, v. 308, no. 5727, p. 1466-1469.
- Aujla, S.J. and Alcorn, J.F. T(H)17 cells in asthma and inflammation. 2011. *Biochim Biophys Acta* 1810, 1066-79.
- Ball, T. M., Castro-Rodriguez, J. A., Griffith, K. A., Holberg, C. J., Martinez, F. D. and Wright, A. L. Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. 2000. *N Engl J Med*, 343:538-543.
- Barnes, K. C. Gene-environment and gene-gene interaction studies in the molecular genetic analysis of asthma and atopy. 1999. *Clin Exp Allergy* 29 Suppl 4:47-51.
- Barnes, P. J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. 2008. *Nat Rev Immunol*, 8:183-192.
- Barnes, P. J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. 2008. *J Clin Invest* 118, 3546-56.
- Bateman, E. D. et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. 2008. *Eur Respir J*, v. 31, no. 1, p. 143-178.
- Beasley R., Pekkanen J., and Pearce N. Has the role of atopy in the development of asthma been over-emphasized? 2001. *Pediatr Pulmonol Suppl* 23, 149-150.
- Becker, P.D., et al. The HIV-1 matrix protein p17 can be efficiently delivered by intranasal route in mice using the TLR 2/6 agonist MALP-2 as mucosal adjuvant. 2006. *Vaccine*, 24(25): p. 5269-76.
- Bergeron, C. and Boulet, L. P. Structural changes in airway diseases: characteristics, mechanisms, consequences, and pharmacologic modulation. 2006. *Chest*, 129:1068-1087.
- Bernstein, L., et al. NHLBI Summary and recommendations of a workshop on the investigative use of fiberoptic bronchoscopy and bronchoalveolar lavage in asthmatics. 1985. *Am Rev of Respir Dis*, 132: p. 180-2.
- Bettelli, E., Carrier, Y., W. Gao, T. Korn, T.B. Strom, M. Oukka, H.L. Weiner, and V.K. Kuchroo. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. 2006. *Nature*, 441:235-238.

- Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. 2002. *Genes Dev*, v. 16, no. 1, p. 6-21.
- Bird, A. Perceptions of epigenetics. 2007. *Nature*, v. 447, no. 7143, p. 396-398.
- Blümer, N., Herz, U., Wegmann, M. and Renz, H. Prenatal lipopolysaccharide-exposure prevents allergic sensitization and airway inflammation, but not airway responsiveness in a murine model of experimental asthma. 2005. *Clin Exp Allergy*, 35:397-402.
- Blyth, D., et al. Airway subepithelial fibrosis in a murine model of atopic asthma: suppression by dexamethasone or anti-interleukin-5 antibody. 2000. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 23(2): p. 241-6.
- Borsutzky, S., et al. Efficient systemic and mucosal responses against the HIV-1 Tat protein by prime/boost vaccination using the lipopeptide MALP-2 as adjuvant. 2006. *Vaccine*, 24(12): p. 2049-56.
- Bousquet J., Jeffery P.K., Busse W.W., Johnson M., Vignola A.M. Asthma. From bronchoconstriction to airway inflammation and remodeling. 2000. *Am J Respir Crit Care Med*, 161(5): 1720-45.
- Bousquet, J., Chanez, P., Lacoste, J.Y., Barneon, G., Ghavanian, N., Enander, I., Venge, P., Ahlstedt, S., Simony Lafontaine, J., Godard, P., et al. Eosinophilic inflammation in asthma. 1990. *N Engl J Med*, 323:1033-1039.
- Brand, S., et al. Epigenetic regulation in murine offspring as a novel mechanism for transmaternal asthma protection induced by microbes. 2011. *J Allergy Clin Immunol*, 128 (3): 618-25.e1-7.
- Braun-Fahrländer, C, Gassner, M., Grize, L., Neu, U., Sennhauser, F.H., Varonier, H.S., Vuille, J.C. and Wuthrich, B. Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. 1999. *Clin Exp Allergy* 29, 28-34.
- Braun-Fahrländer, C., Riedler, J., Herz, U., Eder, W., Waser, M., Grize, L., Maisch, S., Carr, D., Gerlach, F., Bufe, A., Lauener, R. P., Schierl, R., Renz, H., Nowak, D. and von Mutius, E. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. 2002. *N Engl J Med*, 347:869-877.
- Bregenholt, S., Wang, M., Wolfe, T., Hughes, A., Barentzen, L., Dyrberg, T., von Herrath, M.G., Petersen, J.S. The Cholera-Toxin B subunit is a mucosal adjuvant for oral tolerance induction in Type 1 Diabetes. 2003. *Scand J Immunol*, 57: 432-438.
- Buhl R., Berdel D., Criege C.P., Gillissen A., Kardos P., Kroegel C. et al. Guidelines for diagnosis and treatment of asthma patients. 2006. *Pneumologie*, 60:139-77.
- Burke, W., Fesinmeyer, M., Reed, K., Hampson, L. and Carlsten, C. Family history as a predictor of asthma risk. 2003. *Am J Prev Med*, 24:160-169.

- Busse W.W., and Sedgwick J.B. Eosinophil eicosanoid relations in allergic inflammation of the airways. 1994. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 22, 241-249.
- Buwitt-Beckmann, U., Heine, H., Wiesmuller, K. H., Jung, G., Brock, R. and Ulmer, A. J. Lipopeptide structure determines TLR2 dependent cell activation level. 2005. *FEBS J*, 272(24):6354-6364.
- Celedon, J. C., Litonjua, A. A., Weiss, S. T. and Gold, D. R. Day care attendance in the first year of life and illnesses of the upper and lower respiratory tract in children with a familial history of atopy. 1999. *Pediatrics*, 104:495-500.
- Chu, H. W., Honour, J. M., Rawlinson, C. A., Harbeck, R. J. and Martin, R. J. Effects of respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection on allergen-induced bronchial hyperresponsiveness and lung inflammation in mice. 2003. *Infect Immun*, 71(3):1520-1526.
- Chung, K.F. and P.J. Barnes. Cytokines in asthma. 1999. *Thorax*, 54(9): p. 825-57.
- Clark, S. J., Harrison, J., Paul, C. J. and Frommer, M. High sensitivity of methylated cytosines. 1994. *Nucleic Acids Research*, 22, 2990-2997.
- Cohn, L., Elias, J. and G. Chupp. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. 2004. *Annu Rev Immunol*, 22: p. 789-815.
- Cohn, L., et al. T helper 1 cells and interferon gamma regulate allergic airway inflammation and mucus production. 1999. *J Exp Med*, 190(9): p. 1309-18.
- Conrad, M. L., Ferstl, R., Teich, R., Brand, S., Blumer, N., Yildirim, A. O., Patrascan, C. C., Hanuszkiewicz, A., Akira, S., Wagner, H., Holst, O., von Mutius, E., Pfefferle, P. I., Kirschning, C. J., Garn, H. and Renz, H. Maternal TLR signaling is required for prenatal asthma protection by the nonpathogenic microbe *Acinetobacter lwoffii* F78. 2009. *J Exp Med*, 206:2869-2877.
- Constant, S. L. and Bottomly, K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. 1997. *Annu Rev Immunol*, 15:297-322.
- Cook, D. N., Pisetsky, D. S. and Schwartz, D. A. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. 2004. *Nat Immunol*, 5(10):975-979.
- Cookson, W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. 1999. *Nature*, 402:B5-11.
- Cookson, W. The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. 2004. *Nat Rev Immunol*, 4:978-988.
- Corren, J. Inhibition of interleukin-5 for the treatment of eosinophilic diseases. 2012. *Discov Med*, 13(71):305-12.
- Corren, J., Lemanske, R.F., Hanania, N.A., Korenblat, P.E., Parsey, M.V., Arron, J.R., Harris, J.M., Scheerens, H., Wu, L.C., Su, Z., Mosesova, S., Eisner, M.D., Bohen, S.P. and Matthews, J.G. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. 2011. *N Engl J Med* 365, 1088-98.

- Corry, D. and Kheradmand, F. Induction and regulation of the IgE response. 1999. *Nature*, 402: p. 18-23.
- Couper, K. N., Blount, D. G. and Riley, E. M. IL-10 the master regulator of immunity to infection. 2008. *J Immunol*, v. 180, no. 9, p. 5771-5777.
- Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., Zurawski, S., Wiekowski, M., Lira, S.A., Gorman, D., Kastelein, R.A. and Sedgwick, J.D. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. 2003. *Nature*, 421:744-748.
- D'Amato, G., Liccardi, G., D'Amato, M. Environmental risk factors (outdoor air pollution and climatic changes) and increased trend of respiratory allergy. 2000. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 10(3):123-8.
- Daniels, S.E., Bhattacharya, S., James, A., Leaves, N.I., Young, A., Hill, M.R., Faux, J.A., Ryan, G.F., le Souef, P.N., Lathrop, G.M., Musk, A.W., Cookson, W.O. A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. 1996. *Nature*, 383(6597):247-50.
- Das, J., Ren, G., Zhang, L. et al. Transforming growth factor beta is dispensable for the molecular orchestration of Th17 cell differentiation. 2009. *J Exp Med*, 206:2407-2416.
- De Jong, E. C., Smits, H. H. and Kapsenberg, M. L. Dendritic cell-mediated T cell polarization. 2005. *Springer Semin Immunopathol*, 26(3):289-307.
- Debarry, J., Garn, H., Hanuszkiewicz, A., Dickgreber, N., Blumer, N., von Mutius, E., Bufe, A., Gatermann, S., Renz, H., Holst, O. and Heine, H. *Acinetobacter lwoffii* and *Lactococcus lactis* strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties. 2007. *J Allergy Clin Immunol*, 119:1514-1521.
- Delayre-Orthez, C., Becker, J., de Blay, F., Frossard, N. and Pons, F. Exposure to endotoxins during sensitization prevents further endotoxin-induced exacerbation of airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. 2005. *Int Arch Allergy Immunol*, 138(4):298-304.
- Delayre-Orthez, C., de Blay, F., Frossard, N. and Pons, F. Dose-dependent effects of endotoxins on allergen sensitization and challenge in the mouse. 2004. *Clin Exp Allergy*, 34(11):1789-1795.
- Dighe, A.S., Campbell, D., Hsieh, C.S., Clarke, S., Greaves, D.R., Gordon, S., Murphy, K.M. and Schreiber, R.D. Tissue-Specific Targeting of Cytokine Unresponsiveness in Transgenic Mice. 1995. *Immunity*, 3:657-666.
- Dong, C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. 2008. *Nat Rev Immunol* 8, 337-48.
- Duffy, D.L., Martin, N.G., Battisutta, D., Hoffer, J.L. and Mathews, J.D. Genetics of asthma and hay fever in Australian twins. 1990. *Am Rev Respir Dis*, 141: 1351-1358.

- Duhme, H., Weiland, S.K., Rudolph, P., Wienke, A., Kramer, A. and Keil, U. Asthma and allergies among children in West and East Germany: A comparison between Münster and Greifswald using ISAAC phase I protocol. 1998. *Eur Respir J*, 11: 840-847.
- Ege, M.J., Mayer, M., Normand, A.C., Genuneit, J., Cookson, W.O., Braun-Fahrlander, C., Heederik, D., Piarroux, R. and von Mutius, E. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. 2011. *N Engl J Med* 364, 701-709.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. and Jones, P. A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. 2004. *Nature*, 429(6990): 457-463.
- Elias, J., et al. New insights into the pathogenesis of asthma. 2003. *J Clin Invest*, 111(3): p. 291-7.
- Erb, K.J., Holloway, J.W., Sobek, A., Moll, H. and Le Gros, G. Infection of mice with *Mycobacterium bovis* Bacillus-Calmette-Guérin (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia. 1998. *J Exp Med*, 187: 561-569.
- Eriksson, K., Fredriksson, M., Nordström, I., Holmgren, J. Cholera Toxin and Its B Subunit Promote Dendritic Cell Vaccination with Different Influences on Th1 and Th2 Development. 2003. *Infect Immun*, 71(4): 1740–1747.
- Erridge, C., Bennett-Guerrero, E. et al. Structure and function of lipopolysaccharides. 2002. *Microbes Infect*, 4(8): 837-851.
- Esplugues, E., Huber, S., Gagliani, N., et al. Control of TH17 cells occurs in the small intestine. 2011. *Nature*, 475:514–518.
- Fedulov, A. V., Leme, A., Yang, Z., Dahl, M., Lim, R., Mariani, T. J. and Kobzik, L. Pulmonary exposure to particles during pregnancy causes increased neonatal asthma susceptibility. 2008. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 38:57-67.
- Feinberg, A.P. and Tycko, B. The history of cancer epigenetics. 2004. *Nat Rev Cancer* 4, 143-153.
- Field, M., Rao, M.C. and Chang, E.B. Intestinal electrolyte transport and diarrheal Disease. 1989. *N Engl J Med*, 321(12): p. 800-6.
- Fireman, P. Understanding asthma pathophysiology. 2003. *Allergy Asthma Proc*, 24:79-83.
- Fitch, F. W., McKisic, M.D., Lancki, D.W. and Gajewski, T.F. Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. 1993. *Annu Rev Immunol*, v. 11, p. 29-48.
- Flesch, I.E.A., Hess, J.H., Huang, S., Aguet, M., Rothe, J., Bluethmann, H. and Kaufmann, S.H.E. Early Interleukin-12 Production by Macrophages in Response to Mycobacterial Infection Depends on Interferon-Gamma and Tumor-Necrosis-Factor-Alpha. 1995. *Journal of Experimental Medicine*, 181:1615-1621.
- Foster, P., Ming, Y., Matthei, K., Young, I., Temelkovski, J., Kumar, R. Dissociation of Inflammatory and Epithelial Responses in a Murine Model of Chronic Asthma. 2000. *Laboratory Investigations*, Vol 80 (5) pp. 655-662.

- Fraga, M.F., Ballestar, E., Paz, M.F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M.L., Heine-Suner, D., Cigudosa, J.C., Urioste, M., Benitez, J., Boix-Chornet, M., Sanchez-Aguilera, A., Ling, C., Carlsson, E., Poulsen, P., Vaag, A., Stephan, Z., Spector, T.D., Wu, Y.Z., Plass, C. and Esteller, M. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. 2005. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 10604-10609.
- Freund, R., Fröhlich, W. and Nase, J. So helfen Sie ihrem Kind bei Asthma. 2008. Oberstebring Verlag GmbH. Vol. 1. Auflage.
- Galli, S. J., Tsai, M., and Piliponsky, A. M. The development of allergic inflammation. 2008. *Nature*, 454:445-454.
- Gately, M. K., L. M. Renzetti, et al. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. 1998. *Annu Rev Immunol*, 16: 495-521.
- Geha, R. S., Jabara, H. H. , and Brodeur, S. R. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. 2003. *Nat Rev Immunol*, 3:721-732.
- Gerhold, K., Blumchen, K., Bock, A., Seib, C., Stock, P., Kallinich, T., Lohning, M., Wahn, U. and Hamelmann, E. Endotoxins prevent murine IgE production, T(H)2 immune responses, and development of airway eosinophilia but not airway hyperreactivity. 2002. *J Allergy Clin Immunol*, 110(1):110-116.
- Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.P. et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. 2010. *Nature*, 467:967–971.
- Gillissen, A., Welte, T. Weißbuch Lunge 2000. 2014. Stuttgart-New York, Thieme.
- Grunig, G., et al. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. 1998. *Science*, 282: p. 2261-2263.
- Hamelmann, E., Gelfand, E.W. IL-5-induced airway eosinophilia – the key to asthma? 2001. *Immunological Reviews*, Vol. 179: 182–191.
- Hansen, G. Das Th1/Th2-Paradigma beim allergischen Asthma bronchiale. 2001. Springer-Verlag Vol. 2.
- Hansen, G., et al. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. 1999. *J Clin Invest*, 103(2): p. 175-83.
- Hark, A. T., Schoenherr, C. J., Katz, D. J., Ingram, R. S., Levorse, J. M. and Tilghman, S. M. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. 2000. *Nature*, v. 405, no. 6785, p. 486-489.
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M. and Weaver, C.T. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. 2005. *Nat Immunol* 6, 1123-32.
- Hawrylowicz, C. M. and O'Garra, A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. 2005. *Nat Rev Immunol*, v. 5, no. 4, p. 271-283.

He, R., Oyoshi, M. K., Jin, H. und Geha, R. S. Epicutaneous antigen exposure induces a Th17 response that drives airway inflammation after inhalation challenge. 2007. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 15817-15822.

Heinrich, J., Hoelscher, B., Frye, C., Meyer, I., Wjst, M. and Wichmann, H.E. Trends in prevalence of atopic diseases and allergic sensitization in children in Eastern Germany. 2002. *Eur Respir J* 19, 1040-1046.

Heinzmann, A., Blattmann, S., Forster, J., Kuehr, J., Deichmann, K.A. Common polymorphisms and alternative splicing in the ILT3 gene are not associated with atopy. 2000. *Eur J Immunogenet*, 27(3):121-7.

Hershey, G. K., Friedrich, M. F., Esswein, L. A., Thomas, M. L., and Chatila, T. A. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. 1997. *N Engl J Med*, 337:1720-1725.

Hofstra, C., et al. Differential effects of endogenous and exogenous interferon-gamma on immunoglobulin E, cellular infiltration, and airway responsiveness in a murine model of allergic asthma. 1998. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 19(5): p. 826-35.

Holgate ST, Polosa R. The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults. 2006. *Lancet* Volume 368, No. 9537.

Holgate, S. T. Genetic and environmental interaction in allergy and asthma. 1999. *J Allergy Clin Immunol*, 104:1139-1146.

Holmgren, J., Adamsson, J., Anjuère, F., Clemens, J., Czerkinsky, C., Eriksson, K., Flach, C.F., George-Chandy, A., Harandi, A. M., Lebens, M., Lehner, T., Lindblad, M., Nygren, E., Raghavan, S., Sanchez, J., Stanford, M., Sun, J.B., Svennerholm, A.M. and Tengvall, S. Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. 2005. *Immunol Lett*, 97: 181–188.

Holt, P. G., Macaubas, C., Stumbles, P. A., and Sly, P. D. The role of allergy in the development of asthma. 1999. *Nature*, 402:B12-B17.

Holtzman, M., et al. The one-two of T helper cells: does interferon-gamma knock out the Th2 hypothesis for asthma? 1996. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 14(4): p. 316-8.

Horner, A. A. Toll-like receptor ligands and atopy: a coin with at least two sides. 2006. *J Allergy Clin Immunol*, 117(5):1133-1140.

Horsthemke, B. and Wagstaff, J. Mechanisms of imprinting of the Prader-Willi/Angelman region. 2008. *Am J Med Genet A*, v. 146A, no. 16, p. 2041-2052.

http://www.biospektrum.de/blatt/d_bs_pdf&_id=959858.

Humbert, M., Durham, S. R., Kimmitt, P., Powell, N., Assoufi, B., Pfister, R., Menz, G., Kay, A. B. and Corrigan, C. J. Elevated expression of messenger ribonucleic acid encoding IL-13 in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic subjects with asthma. 1997. *J Allergy Clin Immunol*, v. 99, no. 5, p. 657-665.

- Humbert, M., Menz, G., Ying, S., Corrigan, C.J., Robinson, D.S., Durham, S.R., Kay, A.B. The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences. 1999. *Immunol Today*, 20 (11): 528-533.
- Hunninghake, G. M., Soto-Quiros, M. E., Avila, L., Su, J., Murphy, A., Demeo, D. L., Ly, N. P., Liang, C., Sylvia, J. S., Klanderman, B. J., Lange, C., Raby, B. A., Silverman, E. K. and Celedon, J. C. Polymorphisms in IL13, total IgE, eosinophilia, and asthma exacerbations in childhood. 2007. *J Allergy Clin Immunol*, 120:84-90.
- Iguchi-Ariga, S. M. and Schaffner, W. CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. 1989. *Genes Dev*, 3:612-619.
- Illi, S., von Mutius, E., Lau, S., Bergmann, R., Niggemann, B., Sommerfeld, C., Wahn, U. and Group, M. Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study. 2001. *BMJ* 322, 390-5.
- Illi, S., von Mutius, E., Lau, S., Nickel, R., Niggemann, B., Sommerfeld, C. and Wahn, U. The pattern of atopic sensitization is associated with the development of asthma in childhood. 2001. *J Allergy Clin Immunol*, 108(5):709-714.
- Infante-Duarte, C., et al. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. 2000. *J Immunol*, 165(11): p. 6107-15.
- ISAAC, The International Study of Asthma and Allergies in Childhood, Steering Committee, Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic eczema: ISAAC. 1998. *Lancet*, 351: 1225-1232.
- Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J. and Littman, D.R. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. 2006. *Cell*, 126:1121-1133.
- Iwamoto, I., et al. Interferon gamma regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4+ T cells. 1993. *J Exp Med*, 177(2): p. 573-6.
- Jaenisch, R. and Bird, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. 2003. *Nat Genet* 33 Suppl:245-254.
- Janeway, C. A., Jr. and Medzhitov, R. Innate immune recognition. 2002. *Annu Rev Immunol*, 20:197-216.
- Jankovic, D. and Trinchieri, G. IL-10 or not IL-10: that is the question. 2007. *Nat Immunol*, v. 8, no. 12, p. 1281-1283.
- Jarvis, D., Chinn, S., Luczynska, C. and Burney, P. The association of family size with atopy and atopic disease. 1997. *Clin Exp Allergy*, 27:240-245.

- Jin, M., Opalek, J.M., Marsh, C.B. and Wu, H.M. Proteome comparison of alveolar macrophages with monocytes reveals distinct protein characteristics. 2004. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 322-329.
- Jirik, F.R., Podor, T.J., Hirano, T., et al. Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. 1989, *J Immunol*, 142(1):144-147.
- Jones, B. and Chen, J. Inhibition of IFN-gamma transcription by site-specific methylation during T helper cell development. 2006. *EMBO J*, v. 25, no. 11, p. 2443-2452.
- Juntti, H., Kokkonen, J., Dunder, T., Renko, M., Niinimäki, A., Uhari, M. Association of an early respiratory syncytial virus infection and atopic allergy. 2003. *Allergy*, 58(9):878-84.
- Kaliner, M.A. Pathogenesis of asthma. 1996. *Clinical Immunology*, p. 909-923.
- Kao, C. Y., Huang, F., et al. Up-regulation of CC chemokine ligand 20 expression in human airway epithelium by IL-17 through a JAK-independent but MEK/NF-kappaB-dependent signaling pathway. 2005. *Ibid*, 175(10): 6676-85.
- Kao, C. Y., Y. Chen, et al. IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways. 2004. *J Immunol*, 173(5): 3482-91.
- Kawai, T. and Akira, S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. 2005. *Curr Opin Immunol*, 17(4): p. 338-44.
- Kay, A.B. Allergy and allergic diseases. Second of two parts. 2001. *N Engl J Med* 344, 109-113.
- Khair, O.A., Devalia, J.L., Abdelaziz, M.M., Sapsford, R.J., Tarraf, H., Davies, R.J. Effect of *Haemophilus influenzae* endotoxin on the synthesis of IL-6, IL-8, TNF- α and expression of ICAM-1 in cultured human bronchial epithelial cells. 1994. *Eur Respir J*, 7, 2109–2116.
- Klinman, D. M. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. 2004. *Nat Rev Immunol*, 4:249-258.
- Klinman, D. M., Yi, A. K., et al. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. 1996. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(7): 2879-2883.
- Klose, R. J. and Bird, A. P. Genomic DNA methylation: the mark and its Mediators. 2006. *Trends Biochem Sci*, v. 31, no. 2, p. 89-97.
- Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jäger, A., Strom, T.B., Oukka, M. and Kuchroo, V.K. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. 2007. *Nature*, 448:484-487.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. and Kuchroo, V.K. IL-17 and Th17 Cells. 2009. *Annu Rev Immunol* 27, 485-517.

- Kotsimbos, A. T. and Hamid, Q. IL-5 and IL-5 receptor in asthma. 1997. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 92 Suppl 2, p. 75-91.
- Kramer, U., Heinrich, J., Wjst, M., Wichmann, H.E. Age of entry to day nursery and allergy in later childhood. 1999. Lancet, 353(9151):450-4.
- Kroegel, C. Asthma bronchiale. Thieme Verlag 2002.
- Kuiper, S., Muris, J.W., Dompeling, E., Kester, A.D., Wesseling, G., Knottnerus, J.A. and van Schayck, C.P. Interactive effect of family history and environmental factors on respiratory tract-related morbidity in infancy. 2007. J Allergy Clin Immunol 120, 388-395.
- Kuipers, H., Hijdra, D., De Vries, V. C., Hammad, H., Prins, J. B., Coyle, A. J., Hoogsteden, H. C. and Lambrecht, B. N. Lipopolysaccharide-induced suppression of airway Th2 responses does not require IL-12 production by dendritic cells. 2003. J Immunol, 171(7):3645-3654.
- Kumar, R.K., Herbert, C., Yang, M., Koskinen, A., McKenzie, A., Foster, P.S. Role of Interleukin-13 in eosinophil accumulation and airway remodelling in a mouse model of chronic asthma. 2002. Clin Exp Allergy, 32: 1104-1111.
- Kuperman, D. A., Huang, X., Koth, L. L., Chang, G. H., Dolganov, G. M., Zhu, Z., Elias, J. A., Sheppard, D. and Erle, D. J. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. 2002. Nat Med, v. 8, no. 8, p. 885-889.
- Lack, G., Renz, H., Saloga, J., Bradley, K. L., Loader, J., Leung, D. Y., Larsen, G. and Gelfand, E. W. Nebulized but not parenteral IFN-gamma decreases IgE production and normalizes airways function in a murine model of allergen sensitization. 1994. J Immunol, 152:2546-2554.
- Lambrecht, B. N. and Hammad, H. Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma. 2003. Nat Rev Immunol, 3(12):994-1003.
- Lambrecht, B. N., De Veerman, M., Coyle, A. J., Gutierrez-Ramos, J. C., Thielemans, K. and Pauwels, R. A. Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. 2000. J Clin Invest, 106(4):551-559.
- Larche M., Akdis CA., and Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. 2006. Nat Rev Immunol 6, 761-771.
- Lavelle, E.C., et al. Effects of cholera toxin on innate and adaptive immunity and its application as an immunomodulatory agent. 2004. J Leukoc Biol, 75(5): p. 756-63.
- Lee J.J., Dimina D., et al. Defining a Link with Asthma in Mice Congenitally Deficient in Eosinophils. 2004. Science (9), Vol.305.
- Lee, C., et al. Transgenic overexpression of interleukin (IL)-10 in the lung causes mucus metaplasia, tissue inflammation, and airway remodeling via IL-13-dependent and -independent pathways. 2002. J Biol Chem, 277(38): p. 35466-74.

- Lee, C.G., Homer, R.J., Zhu, Z., Lanone, S., Wang X., Kotliansky, V., Shipley, J.M., Gotwals, P., Noble, P., Chen, Q., Senior, R.M. and Elias, J.A. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta1. 2001. *J Exp Med*, 194:809-821.
- Levy, O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. 2007. *Nat Rev Immunol*, 7(5):379-390.
- Litonjua, A.A., Carey, V.J., Burge, H.A., Weiss, S.T. and Gold, D.R. Parental history and the risk for childhood asthma. Does mother confer more risk than father? 1998. *Am J Respir Crit Care Med* 158, 176-181.
- Lloyd, C.M. and Hessel, E.M. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. 2010. *Nat Rev Immunol*, 10, 838-48.
- Lloyd, C.M. and Saglani, S. T cells in asthma: influences of genetics, environment, and T-cell plasticity. 2013. *J Allergy Clin Immunol* 131, 1267-74; quiz 1275.
- Locksley, R. M. Th2 cells: help for helminths. 1994. *J Exp Med*, 179:1405-1407.
- Lohoff, M. and Mak, T. W. Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation. 2005. *Nat Rev Immunol*, 5:125-135.
- Lönnroth, I. and Holmgren, J. Subunit Structure of Cholera Toxin. 1973. *J.Gen Microbiol*, 76: 417-427.
- Luhrmann, A., et al. Improved intranasal immunization with live-attenuated measles virus after co-inoculation of the lipopeptide MALP-2. 2005. *Vaccine*, 23(39): p. 4721-6.
- Ly, N.P. and Celedon, J.C. Family history, environmental exposures in early life, and childhood asthma. 2007. *J Allergy Clin Immunol* 120, 271-272.
- Lycke, N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. 2012. *Nat Rev Immunol*, 12: 592-605.
- Macatonia, S.E., Hsieh, C.S., Murphy, K.M. and Ogarra, A. Dendritic Cells and Macrophages Are Required for Th1 Development of Cd4+ T-Cells from Alpha-Beta Tcr Transgenic Mice - Il-12 Substitution for Macrophages to Stimulate Ifn-Gamma Production Is Ifn-Gamma-Dependent. 1993. *International Immunology*, 5: 1119-1128.
- Maddur, M.S., et al. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. 2012. *Am J Pathol*, 181(1): p. 8-18.
- Magnusson, L. L., Olesen, A. B., Wennborg, H., and Olsen, J. Wheezing, asthma, hayfever, and atopic eczema in childhood following exposure to tobacco smoke in fetal life. 2005. *Clin Exp Allergy*, 35:1550-1556.
- Marini, M., Vittori, E., Hollemborg, J. and Mattoli, S. Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage-colonystimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8 in bronchial epithelial cells of patients with asthma. 1992. *J Allergy Clin Immunol* 89, 1001-1009.

- Marone, G. Asthma: recent advances. 1998. *Immunol Today*, 19:5-9.
- Marsh, D.G., Hsu S.H., Roebber, M., Erlich, E., Kautzky, Freidhoff, L.R., Meyers, D.A., Pollard, M.K. and Bias, W.B. HLA-Dw2: A genetic marker for humane immune response to short ragweed pollen allergen Ra5. I. Response resulting primarily from natural antigen exposure. 1982. *J Exp Med*, 155: 1439-1451.
- Marsh, D.G., Neely, J.D., Breazeale, D.R., Ghosh, B., Freidhoff, L.R., Ehrlich-Kautzky, E., Schou, C., Krishnaswamy, G., Beaty, T.H. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. 1994. *Science*, 264(5162):1152-6.
- Masoli, M., Fabian, D., Holt, S. and Beasley, R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. 2004. *Allergy* 59, 469-478.
- Mathur, M., Herrmann, K., Li, X., Qin, Y., Weinstock, J., Elliott, D., Monahan, J. and Padrid, P. TRFK-5 reverses established airway eosinophilia but not established hyperresponsiveness in a murine model of chronic asthma. 1999. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 159, no. 2, p. 580-587.
- Mattes, J., et al. Intrinsic defect in T cell production of interleukin (IL)-13 in the absence of both IL-5 and eotaxin precludes the development of eosinophilia and airways hyperreactivity in experimental asthma. 2002. *J Exp Med*, 195(11): p. 1433-44.
- Maziak, W., Behrens, T., Brasky, T.M., Duhme, H., Rzehak, P., Weiland, S.K. and Keil, U. Are asthma and allergies in children and adolescents increasing? Results from ISAAC phase I and phase III surveys in Münster, Germany. 2003. *Allergy*, 58(7): 572-579.
- McKenzie, A. N. Regulation of T helper type 2 cell immunity by interleukin-4 and interleukin-13. 2000. *Pharmacol Ther*, 88:143-151.
- McKinley, L. et al. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. 2008. *J Immunol* 181, 4089-4097.
- Mehra, A., Lee, K. H. and Hatzimanikatis, V. Insights into the relation between mRNA and protein expression patterns I. Theoretical considerations. 2003. *Biotechnol Bioeng*, v. 84, no. 7, p. 822-833.
- Mellman, I. and Steinman, R. M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. 2001. *Cell*, 106:255-258.
- Mims, C.A. *The Pathogenesis of Infectious Diseases*. 1987. London Academic Press, 3rd Edition, 312pp.
- Miner, K. T. and Croft, M. Generation, persistence, and modulation of Th0 effector cells: role of autocrine IL-4 and IFN-gamma. 1998. *J Immunol*, 160(11):5280-5287.
- Moffatt, M.F., Kabesch, M., Liang, L., Dixon, A.L., Strachan, D., Heath, S., Depner, M., von Berg, A., Bufe, A. and Rietschel, E., et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. 2007. *Nature* 448, 470-473.

- Molet, S. et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. 2001. *J Allergy Clin Immunol* 108, 430-438.
- Moser, M. and Murphy, K.M. Dendritic cell regulation of T(H)1-T(H)2 development. 2000. *Nature Immunology*, 1: 199-205.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., and Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *J Immunol*, 136(7):2348-2357.
- Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. 2 Types of Mouse Helper T-Cell Clone Implications for Immune Regulation. 1987. *Immunology Today*, 8:223-227.
- Muller, C. A., Autenrieth, I. B. and Peschel, A. Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. 2005. *Cell Mol Life Sci*, 62(12):1297-1307.
- Murdoch, J.R. and Lloyd, C.M. Resolution of allergic airway inflammation and airway hyperreactivity is mediated by IL-17-producing gamma delta T cells. 2010. *Am J Respir Crit Care Med* 182, 464-76.
- Murosaki, S., Yamamoto, Y., Ito, K., Inokuchi, T., Kusaka, H., Ikeda, H. and Yoshikai, Y. Heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 suppresses naturally fed antigen-specific IgE production by stimulation of IL-12 production in mice. 1998. *J Allergy Clin Immunol*, 102(1):57-64.
- Murphy, K. M. and Reiner, S. L. The lineage decisions of helper T cells. 2002. *Nat Rev Immunol*, 2:933-944.
- Murphy, K., Travers, P. and Walport, M. *Janeway's Immunobiology*. 2007. Garland Science.
- NAEPP, N.A.E.a.P.P., 1999. National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) National Institutes of Health, USA.
- Nakae, S. et al. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. 2002. *Immunity* 17, 375-387.
- Nakajima, H. and Takatsu, K. Role of cytokines in allergic airway inflammation. 2007. *Int Arch Allergy Immunol*, 142:265-273.
- Nakamura, T., Lee, R. K., Nam, S. Y., Podack, E. R., Bottomly, K. and Flavell, R. A. Roles of IL-4 and IFN-gamma in stabilizing the T helper cell type 1 and 2 phenotype. 1997. *J Immunol*, 158(6):2648-2653.
- Neumann, J. *Immunbiologie-Eine Einführung*. 2008. Springer Lehrbuch.
- Newcomb, D.C., Boswell, M.G., Reiss, S., Zhou, W., Goleniewska, K., Toki, S., Harintho, M.T., Lukacs, N.W., Kolls, J.K. and Peebles, R.S. IL-17A inhibits airway reactivity induced by respiratory syncytial virus infection during allergic airway inflammation. 2013. *Thorax* 68, 717-23.

- Nie, L., Wu, G. and Zhang, W. Correlation of mRNA expression and protein abundance affected by multiple sequence features related to translational efficiency in *Desulfovibrio vulgaris*: a quantitative analysis. 2006. *Genetics*, v. 174, no. 4, p. 2229-2243.
- O'Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. 2004. *Natur Medizin*, Vol 10 (8).
- Ober, C. and Hoffjan, S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. 2006. *Genes Immun*, 7:95-100.
- Ober, C., Moffatt, M.F. Contributing factors to the pathobiology. The genetics of asthma. 2000. *Clin Chest Med*, 21(2):245-61.
- Ohno, H., Tsunemine, S., Isa, Y., Shimakawa, M. and Yamamura, H. Oral administration of *Bifidobacterium bifidum* G9-1 suppresses total and antigen specific immunoglobulin E production in mice. 2005. *Biol Pharm Bull*, v. 28, no. 8, p. 1462-1466.
- Oro, A.S., et al. Regulation of disease susceptibility: decreased prevalence of IgE- mediated allergic disease in patients with multiple sclerosis. 1996. *J Allergy Clin Immunol*, 97(6): p. 1402-8.
- Ouyang, W., E. Filvaroff et al. Novel therapeutic targets along the Th17 pathway. 2009. *Eur J Immunol*, 39(3): 670-5.
- Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q. and Dong, C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. 2005. *Nat Immunol*, 6:1133-1141.
- Petrovsky, N. and Aguilar, J. C. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. 2004. *Immunology and Cell Biology*, 82(5): 488-496.
- Pohlers, D., Siegling, A., Buchner, E., Schmidt-Weber, C. B., Palombo-Kinne, E., Emmrich, F., Brauer, R. and Kinne, R. W. Expression of cytokine mRNA and protein in joints and lymphoid organs during the course of rat antigen-induced arthritis. 2005. *Arthritis Res Ther*, v. 7, no. 3, p. R445-R457.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. and Beutler, B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. 1998. *Science*, 282(5396):2085-2088.
- Prescott, S. L., Macaubas, C., Holt, B. J., Smallacombe, T. B., Loh, R., Sly, P.D. and Holt, P. G. Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. 1998. *J Immunol*, 160(10):4730-4737.
- Pschyrembel. 2002. *Klinisches Wörterbuch*, 259. Auflage.
- Racioppi L., Ronchese F., Matis L.A., Germain R.N. Peptide-major histocompatibility complex class II complexes with mixed agonist/antagonist properties provide evidence for

ligand-related differences in T cell receptor-dependent intracellular signaling. 1993. *J Exp Med*, 177:1047-60.

Ralph, P., Nakoinz, I. Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line. 1975. *Nature*, 257:393-4.

Randolph, D.A., et al. Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergenspecific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma. 1999. *J Immunol*, 162(4): p. 2375-83.

Rask, C., Holmgren, J., Fredriksson, M., Lindblad, M., Nordstrom, I., Sun, J.B. and Czerkinsky, C. Prolonged oral treatment with low doses of allergen conjugated to cholera toxin B subunit suppresses immunoglobulin E antibody responses in sensitized mice. 2000. *Clin Exp Allergy* 30, 1024-1032.

Reik, W. and Walter, J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. 2001. *Nature Reviews Genetics*, 2(1): 21-32.

Reik, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian Development. 2007. *Nature*, v. 447, no. 7143, p. 425-432.

Rengarajan, J., Szabo, S. J. and Glimcher, L. H. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. 2000. *Immunol Today*, 21:479-483.

Renz, H. and Herz, U. The bidirectional capacity of bacterial antigens to modulate allergy and asthma. 2002. *Eur Respir J*, 19(1):158-171.

Renz, H., et al. Inhibition of IgE production and normalisation of airways responsiveness by sensitized CD8 T cells in a mouse model of allergen-induced sensitization. 1994. *J Immunol*, 152: p. 351-360.

Repa, A., et al. Mucosal co-application of lactic acid bacteria and allergen induces counter-regulatory immune responses in a murine model of birch pollen allergy. 2003. *Vaccine*, v. 22, no. 1, p. 87-95.

Repa, A., Grangette, C., Daniel, C., Hochreiter, R., Hoffmann-Sommergruber, K., Thalhamer, J., Kraft, D., Breiteneder, H., Mercenier, A. and Wiedermann, U. Mucosal coapplication of lactic acid bacteria and allergen induces counter-regulatory immune responses in a murine model of birch pollen allergy. 2003. *Vaccine*, 22(1):87-95.

Reuter, P. Springer Lexikon Medizin Medizin zum Begreifen nah. 2004. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, Heidelberg.

Riedler, J., Braun-Fahrlander, C., Eder, W., Schreuer, M., Waser, M., Maisch, S., Carr, D., Schierl, R., Nowak, D. and von Mutius, E. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. 2001. *Lancet*, 358:1129-1133.

Riedler, J., Eder, W., Oberfeld, G. and Schreuer, M. Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization. 2000. *Clin Exp Allergy*, 30:194-200.

- Riffo-Vasquez, Y., Pitchford, S. and D. Spina. Cytokines in airway inflammation. 2000. *Int J Biochem Cell Biol*, 32: p. 833-853.
- Robbe, P., Spierenburg, E.A., Draijer, C., Brandsma, C.A., Telenga, E., van Oosterhout, A.J., van den Berge, M., Luinge, M., Melgert, B.N., Heederik, D., Timens W., Wouters, I.M., Hylkema, M.N. Shifted T-cell polarisation after agricultural dust exposure in mice and men. 2014. *Thorax*, 69(7):630-7.
- Robinson, D. S., Hamid, Q., Ying, S., Tsicopoulos, A., Barkans, J., Bentley, A. M., Corrigan, C., Durham, S. R. and Kay, A. B. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. 1992. *N Engl J Med*, 326:298-304.
- Romagnani, S. Regulation of the T cell response. 2006. *Clin Exp Allergy* v. 36, no. 11, p. 1357-1366.
- Romagnani, S. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? 2004. *Immunology*, 112:352-363.
- Romagnani, S. The role of lymphocytes in allergic disease. 2000. *J Allergy Clin Immunol*, 105:399-408.
- Romagnani, S. The Th1/Th2 paradigm. 1997. *Immunol Today*, 18:263-266.
- Ronmark, E., Lundback, B., Jonsson, E., Jonsson, A. C., Lindstrom, M. and Sandstrom, T. Incidence of asthma in adults--report from the Obstructive Lung Disease in Northern Sweden Study. 1997. *Allergy*, 52:1071-1078.
- Rothenberg, M. Eosinophilia. 1998. *N Engl J Med*, 338(22): p. 1592-600.
- Sallusto, F., Zielinski, C.E., Lanzavecchia, A. Human Th17 subsets. 2012. *Eur J Immunol*, 42:2215-2220.
- Sandvig, K., Spilsberg, B., Lauvrak, S.U., Torgersen, M.L., Iversen, T.G., van Deurs, B. Pathways followed by protein toxins into cells. 2004. *Int J Med Microbiol*, 293: 483-490.
- Schaub, B., Liu, J., Hoppler, S., Schleich, I., Huehn, J., Olek, S., Wieczorek, G., Illi, S. and M. E. von. Maternal farm exposure modulates neonatal immune mechanisms through regulatory T cells. 2009. *J Allergy Clin Immunol*, v. 123, no. 4, p. 774-782.
- Schmidt, S.M. Atemwegs-Infektionen, Giemen und Asthma Bronchiale. 2011. *Pädiatrische Allergologie in Klinik und Praxis* 2.
- Schnyder-Candrian, S. et al. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. 2006. *J Exp Med* 203, 2715-2725.
- Schram-Bijkerk, D., Doekes, G., Douwes, J., Boeve, M., Riedler, J., Ublagger, E., von Mutius, E., Benz, M.R., Pesshagen, G., von Hage, M., Scheynius, A., Braun-Fahrlander, C., Waser, M., Brunekreef, B. Bacterial and fungal agents in house dust and wheeze in children: the PARSIFAL study. 2005. *Clin Exp Allergy* 35, 1272-1278.

- Schütt, C. and Bröker, B. Grundwissen Immunologie. 2009. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Vol. 2. Auflage.
- Sharon, N., Lis, H. Legume lectins – a large family of homologous proteins. 1990. FASEB J, 4: 3198-3208.
- Shirakawa, T., et al. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. 1997. Science, 275(5296): p. 77-9.
- Silverman, R.H. Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. 2007. J Virol 81, 12720-9.
- Skadhauge, L.R., Christensen, K., Kyvik, K.O. and Sigsgaard, T. Genetic and environmental influence on asthma: a population-based study of 11,688 Danish twin pairs. 1999. Eur Respir J 13, 8-14.
- Smith, D., Malone D.C., Lawson K.A., Okamoto L.J., Battista C., Saunders W.B. A nationale estimate of economic costs of asthma. 1997. Am J Respir Cirt Care Med, 165: 787-793.
- Smith, K.A. Interleukin -2 - Inception, Impact, and Implications. 1988. Science, 240:1169-1176.
- Sousa, A.R., Lane, S.J., Nakhosteen, J.A., Yoshimura, T., Lee, T.H., Poston, R.N. Increased expression of the monocyte chemoattractant protein-1 in bronchial tissue from asthmatic subjects. 1994. Am J Respir Cell Mol Biol, 10 (2): 142-147.
- Stellato, C., Beck, L.A., Gorgone, G.A., Proud, D., Schall, T.J., Ono, S.J., Lichtenstein, L.M., Schleimer, R.P. Expression of the chemokine RANTES by a human bronchial epithelial cell line. Modulation by cytokines and glucocorticoids. 1995. J Immunol, 155 (1): 410-418.
- Stirling, R. G. and Chung, K. F. New immunological approaches and cytokine targets in asthma and allergy. 2000. Eur.Respir J, 16:1158-1174.
- Stirling, R. G. and Chung, K. F. New immunological approaches and cytokine targets in asthma and allergy. 2000. Eur Respir J, 16:1158-1174.
- Stockinger, B., Veldhoen, M. Differentiation and function of Th17 T cells. 2007. Curr Opin Immunol, 19 (3), S. 281–286.
- Strachan, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. 1989. BMJ, 299:1259-1260.
- Strek M.E. Difficult Asthma. 2006. Proc Am Thorac Soc, 3: 116-123.
- Sun, J.B., Flach, C.F., Czerkinsky, C., Holmgren, J. B Lymphocytes Promote Expansion of Regulatory T Cells in Oral Tolerance: Powerful Induction by Antigen Coupled to Cholera Toxin B Subunit 1. 2008. J Immunol, 181: 8278–8287.
- Sutton, C.E., Lalor, S.J., Sweeney, C.M., Brereton, C.F., Lavelle, E.C. and Mills, K.H. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. 2009. Immunity 31, 331-41.

- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X.K., Fathman, C.G. and Glimcher, L.H. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. 2000. *Cell*, 100:655-669.
- Tesmer, L. A., Lundy, S. K., Sarkar, S., Fox, D. A. Th17 cells in human disease. 2008. *Immunol Rev*, 223: 87–113.
- Timoshenko, A.V., Gorudko, I.V., Andre, S., Gabius, H.J. Cell-type dependence of stability modulation of lectin-initiated contacts by impairment of multivalent carbohydrate binding and intracellular signaling. 2000. *Biosci Rep*, 20: 199-209.
- Tost, J. and Gut, I. G. DNA methylation analysis by pyrosequencing. 2007. *Nat Protoc*, 2:2265-2275.
- Travassos, L. H., Girardin, S. E., Philpott, D. J., Blanot, D., Nahori, M. A., Werts, C. and Boneca, I. G. Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. 2004. *EMBO Rep*, 5(10):1000-1006.
- Ukena, D., Fishman, L. and Niebling, W.B. Asthma bronchiale - Diagnostik und Therapie im Erwachsenenalter. 2008. *Deutsches Ärzteblatt*.
- Vaissiere, T., Sawan, C. and Herceg, Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. 2008. *Mutat Res*, 659:40-48.
- Valenta R., Ball T., Focke M., Linhart B., Mothes N., Niederberger V., Spitzauer S., Swoboda I., Vrtala S., and Westritschnig K. Immunotherapy of allergic disease. 2004. *Adv Immunol* 82, 105-153.
- Van Herwerden, L., Harrap, S.B., Wong, Z.Y.H., et al. Linkage of high-affinity IgE receptor gene with bronchial hyperreactivity, even in absence of atopy. 1995. *Lancet*, 346: 894-900.
- Van Rijt, L. S. and Lambrecht, B. N. Dendritic cells in asthma: a function beyond sensitization. 2005. *Clin Exp Allergy*, 35(9):1125-1134.
- Van Strien R.T., Engel, R., Holst, O., Bufe, A., Eder, W., Waser, M., Braun-Fahrlander, C., Riedler, J., Nowak, D., von Mutius, E., Microbial exposure of rural school children, as assessed by levels of N-Acetyl-muramic acid in mattress dust, and its association with respiratory health. 2004. *J Allergy Clin Immunol* 113, 860-867.
- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J. et al. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. 2006. *Immunity*, 24:179–189.
- Vermaelen, K. and Pauwels, R. Accelerated airway dendritic cell maturation, trafficking, and elimination in a mouse model of asthma. 2003. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 29:405-409.
- Vignola, A. M., Mirabella, F., Costanzo, G., Di Giorgi, R., Gjomarkaj, M., Bellia, V. and Bonsignore, G. Airway remodeling in asthma. 2003. *Chest*, 123:417S-422S.
- von Mutius, E. and le Souef, P. N. Early gene-environment interactions: can they inform primary preventive strategies for asthma? 2007. *Semin Respir Crit Care Med*, 28:255-263.

- von Mutius, E. and Vercelli, D. Farm living: effects on childhood asthma and allergy. 2010. *Nat Rev Immunol* 10, 861-868.
- von Mutius, E., Fritzsche, C., Weiland, S.K., Roll, G., Magnussen, H. Prevalence of asthma and allergic disorders among children in united Germany: a descriptive comparison. 1992. *BMJ*, 305(6866):1395-9.
- von Mutius, E., Martinez, F. D., Fritzsche, C., Nicolai, T., Roell, G. and Thiemann, H. Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. 1994. *Am J Respir Crit Care Med*, 149:358-364.
- von Mutius, E., Weiland, S.K., Fritzsche, C., Duhme, H., Keil, U. Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany. 1998. *Lancet*, 351(9106):862-6.
- Vuillermier, P. J., Ponsonby, A. L., Saffery, R., Tang, M. L., Ellis, J. A., Sly, P. and Holt, P. Microbial exposure, interferon gamma gene demethylation in naive T-cells, and the risk of allergic disease. 2009. *Allergy*, v. 64, no. 3, p. 348-353.
- Waddington, C. The epigenotype. 1942. *Endeavour* 1, 18–20.
- Wahn, U., Lau, S., Bergmann, R., Kulig, M., Forster, J., Bergmann, K., Bauer, C.P., Guggenmoos-Holzmann, I. Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life. 1997. *J Allergy Clin Immunol*, 99(6 Pt 1):763-9.
- Wakashian, H. et al. IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice. 2008. *Am J Respir Crit Care Med* 178, 1023-1032.
- Waser, M., Michels, K.B., Bieli, C., Floistrup, H., Pershagen, G., von Mutius, E., Ege, M., Riedler, J., Schram-Bijkerk, D. and Brunekreef, B. et al. Inverse association of farm milk consumption with asthma and allergy in rural and suburban populations across Europe. 2007. *Clin Exp Allergy* 37, 661-670.
- Waterland, R. A. and Jirtle, R. L. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. 2003. *Mol Cell Biol*, v. 23, no. 15, p. 5293-5300.
- Weaver, C. T. Th17: The ascent of a new effector T-cell subset. Preface. 2009. *Eur J Immunol*, 39(3): 634-6.
- Webster, D.E., Gahan, M.E., Strugnell, R.A., Wesselingh, S.L. Advances in oral vaccine delivery options: what is on the horizon? 2003. *American Journal of Drug Delivery*, 1(4): 227-240.
- Weiss, S. T. Eat dirt-the hygiene hypothesis and allergic diseases. 2002. *N Engl J Med*, 347(12):930-931.
- Whittaker, L., et al. Interleukin-13 mediates a fundamental pathway for airway epithelial mucus induced by CD4 T cells and interleukin-9. 2002. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 27(5): p. 593-602.

- Wiedermann, U., Jahn-Schmid, B., Lindblad, M., et al. Suppressive versus stimulatory effects of allergen/cholera toxoid (CTB) conjugates depending on the nature of the allergen in a murine model of type I allergy. 1999. *Int Immunol*, 11: 1131-1138.
- Wills-Karp, M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. 2004. *Immunol Rev*, 202:175-190.
- Wills-Karp, M., et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. 1998. *Science*, 282(5397): p. 2258-61.
- Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T. Y., Karp, C. L. and Donaldson, D.D. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. 1998. *Science*, v 282, no. 5397, p. 2258-2261.
- Wilson R. H. et al. Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness. 2009. *Am J Respir Crit Care Med* 180, 720-730.
- WONG, G.W. K., VON MUTIUS, E., DOUWES, J., PEARCE, N. Environmental determinants associated with the development of asthma in childhood. 2006. *Int J Tubercul Lung Dis*, 10 (3): 242-251.
- Wu, T., Boezen, H.M., Postma, D.S., Los, H., Postmus, P.E., Snieder, H. and Boomsma, D.I. Genetic and environmental influences on objective intermediate asthma phenotypes in Dutch twins. 2010. *Eur Respir J* 36, 261-268.
- Yoder, J. A., Walsh, C. P. and Bestor, T. H. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. 1997. *Trends Genet*, v. 13, no. 8, p. 335-340.
- Zhao, Y., Yang, J., Gao, Y. D. and Guo, W. Th17 immunity in patients with allergic asthma. 2010. *Int Arch Allergy Immunol* 151, 297-307.
- Zhu, J. Transcriptional regulation of Th2 cell differentiation. 2010. *Immunol Cell Biol*, 88, 244-9.
- Zielinski, C.E., Mele, F., Aschenbrenner, D., et al. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta. 2012. *Nature*, 484:514–518.
- Zurbriggen, R., et al. Nonclinical safety evaluation of Escherichia coli heat-labile toxin mucosal adjuvant as a component of a nasal influenza vaccine. 2003. *Expert Rev Vaccines*, 2(2): p. 295-304.

9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
5Aza	5-Aza-2'-Deoxycytidin
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ac	Acetyliert
AHR	Atemwegshyperreaktivität
AK	Antikörper
<i>A. lwoffii</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i> F78
Al(OH) ₃	Aluminiumhydroxid
ALEX	Allergy and Endotoxin
Alum	Aluminiumhydroxid
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATF	Aktivierender Transkriptionsfaktor
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
C5	5. Kohlenstoff-Atom
C	Cytosin
CCL	Chemokin-Ligand
CCP	Charge-coupled Device
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	copy DNA
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CFU	Koloniebildende Einheit
ChIP	Chromatin-Immuno-Präzipitation
CNS	Conserved Noncoding Sequence
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CREB	cAMP Response Element-Binding Protein
CT	Cholera Toxin Wildtyp-Protein
CTB	Cholera Toxin B-Untereinheit
dATP	Deoxyadenosin Triphosphat
DC	Dendritische Zelle
dCTP	Deoxycytidin Triphosphat
dGTP	Deoxyguanosin Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMTs	DNA-Methyltransferasen
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DOC	Natriumdeoxycholat
dTTP	Deoxythymidinn Triphosphat
ECRHS	European Community Respiratory Health Survey

EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbant Assay
Eotaxin	Eosinophilen-chemotaktisch wirkende Chemokin-Ligand 11
EPR	Expert Panel Report
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Fc	Fragment crystalline
FcεR	IgE-Rezeptor
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoreszein-Isothyocyanat
g	Gramm
G	Guanin
GAPDH	Glyzerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GATA-3	GATA binding protein 3
gDNA	genomische DNA
GINA	Globale Initiative für Asthma
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
H	Histon
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HAT	Histonacetyltrasferasen
hBD-2	humane β-Defensin 2
HDAC	Histondeacetylasen
HE	Hämotoxin-Eosin
i.n.	intranasal
IP	Immunpräzipitation
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN _γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
ISAAC	International Study of Asthma and Allergies in Childhood
K	Lysin
kg	Kilogramm
L	Liter
L. Lactis	<i>Lactococcus lactis</i> G121
λ	Wellenlänge
LBP	Lipopolysaccharid-Bindungsprotein
LCR	Locus Control Region
LGL	Large Granular Leukemia
LiCl	Lithiumchlorid
LK	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
LUMA	Luminometric Methylation Assay

m	Milli
M	Molar
MACS	Magnetic Cell Sorting
MBD	Methyl-CpG-Binde-Domäne
MBP	Major-Basic-Protein
MCh	Methacholin
me	Methyliert
Mg	Magnesium
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex
min	Minuten
MNC	Mononukleäre Zelle
mRNA	messenger RNA
MS	Multiple Sklerose
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natronlauge
nm	nanometer
OVA	Ovalbumin
p	Wahrscheinlichkeit
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAMPs	pathogen associated molecular patterns
PAS	Periodsäure-Schiff
PASTURE	Protection against Allergy: Study in Rural Environments
PARSIFAL	Prevention of Allergy-Risk Factors for Sensitization Related to Farming and Anthroposophic lifestyle
PBS	Phosphate Bufferd Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phycoerythrin
PGN	Peptidoglycan
ph	phosphoryliert
POD	Peroxidase
PPi	Pyrophosphat
PRR	Pattern recognition receptors
qPCR	quantitative PCR
R	Arginin
RANTES	reguliertes, Normal-T-Zell-exprimiertes und sekretiertes Chemokin CCL5
RHS	Rad50 Hypersensitive Site
RNA	Ribonukleinsäure
ROR γ t	retinoic acid-related orphan Rezeptor gamma
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Rosswell Park Memorial Institute
RSS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
S	Serin

s.	siehe
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SCARPOL	Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution, Climate and Pollen
SCID	Severe-Combined-Immunodeficiency
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SFB/TR22	Sonderforschungsbereich Transregio 22
SNP	Single Nukleotid Polymorphismus
sog.	sogenannt
su	sumoyliert
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TARC	thymusaktivitätsreguliertes Chemokin CCL17
TBE	Tris-Borat-EDTA
T-bet,	T-box expression factor
TCR	T-Zell-Rezeptor
tg	Transgen
TGF β	transforming growth factor beta
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptoren
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
Treg	regulatorische T-Zelle
TSA	Trichostatin A
TSC22	TGF- β stimulated clone 22
TSS	Transkriptionsstart
ub	ubiquityliert
UV	Ultraviolett
V	Volt
VE	voll entmineralisiert
vs.	versus
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1	Allergische Sensibilisierung (modifiziert nach Galli SJ et al., 2008) [16]..	13
Abb. 2	Sofortreaktion (modifiziert nach Galli SJ et al., 2008) [16].....	14
Abb. 3	Spätreaktion (modifiziert nach Galli SJ et al., 2008) [16].....	16
Abb. 4	Differenzierungsweg und Charakteristika der relevanten T-Helferzell-Effektorsubpopulationen bei der Entstehung des allergischen Asthma bronchiale (modifiziert nach Barnes, 2008) [56].....	18
Abb. 5	Darstellung einer T _H 17-Zelle (modifiziert nach Ouyang et al. 2009) [101]	21
Abb. 6	Mechanismus der DNA-Methylierung (modifiziert nach Feinberg and Tycko, 2004) [231].....	33
Abb. 7	Mechanismen der Transkriptionshinhibition durch DNA-Methylierung (modifiziert nach Klose et al. 2006) [229]	34
Abb. 8	Protokoll zur akuten Immunmodulation durch <i>Acinetobacter lwoffii</i> F78..	52
Abb. 9	Protokoll zur akuten Immunmodulation durch Cholera Toxin.....	52
Abb. 10	<i>In vitro</i> Zellkulturmodell für die Subkultivierung und Stimulation der CD4 ⁺ /62L ⁺ T-Zellen.....	62
Abb. 11	Chemischer Ablauf der Bisulfitmodifikation von Cytosin zu Uracil (modifiziert nach Clark et al., 1994) [240].....	70
Abb. 12	Prinzip der Pyrosequenzierung [242].....	74
Abb. 13	OVA-spezifische Immunglobulin-Konzentrationen im Serum nach Behandlung mit <i>A. lwoffii</i> im akuten Modell der allergischen Atemwegsentzündung.....	77
Abb. 14	Differenzierung der Leukozyten in der BAL nach Behandlung mit <i>A. lwoffii</i> im akuten Modell der allergischen Atemwegsentzündung.....	79
Abb. 15	Atemwegsreaktivität nach Behandlung mit <i>A. lwoffii</i> im akuten Modell der allergischen Atemwegsentzündung.....	80
Abb. 16	Zytokin-Konzentrationen in der BAL nach Behandlung mit <i>A. lwoffii</i> im akuten Modell der allergischen Atemwegsentzündung.....	81

Abb. 17	Lungenhistologie nach Behandlung mit <i>A. lwoffii</i> im akuten Modell der allergischen Atemwegsentzündung.....	82
Abb. 18	Histologische Darstellung der primären alveolären Makrophagen mit intrazellulären Bakterien.....	85
Abb. 19	Zeitabhängige Zytokinproduktion von J774-Zellen nach Stimulation mit <i>A. lwoffii</i>	87
Abb. 20	Konzentrationsabhängige Zytokinproduktion von J774-Zellen nach Stimulation mit <i>A. lwoffii</i>	88
Abb. 21	Konzentrationsabhängige Zytokinproduktion von primären Peritonealmakrophagen nach Stimulation mit <i>A. lwoffii</i>	89
Abb. 22	Konzentrationsabhängige Zytokinproduktion von J774-Zellen nach Stimulation mit Cholera Toxin.....	91
Abb. 23	Analyse der Aufreinigungseffizienz von CD4 ⁺ /62L ⁺ T-Zellen mittels FACS.....	92
Abb. 24	Zytokinprofil von naiven CD4 ⁺ /CD62L ⁺ T-Zellen nach <i>in vitro</i> Kultivierung mit <i>A. lwoffii</i> -behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen.....	94
Abb. 25	Zytokinprofil von naiven CD4 ⁺ /CD62L ⁺ T-Zellen nach <i>in vitro</i> Kultivierung mit <i>A. lwoffii</i> - behandelten Primärkultur-Überständen.....	96
Abb. 26	Zytokinprofil von naiven CD4 ⁺ /CD62L ⁺ T-Zellen nach <i>in vitro</i> Kultivierung mit Cholera Toxin behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen....	97
Abb. 27	Zytokinprofil von naiven CD4 ⁺ /CD62L ⁺ T-Zellen nach <i>in vitro</i> Kultivierung mit <i>A. lwoffii</i> -behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen ohne αCD3/28 Stimulation.....	98
Abb. 28	Genexpression von IL-17A, IL-13 und IL-10 in naiven CD4 ⁺ /CD62L ⁺ T-Zellen nach <i>in vitro</i> Kultivierung mit <i>A. lwoffii</i> -behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen.....	99
Abb. 29	Genexpression von IL-17A, IL-13 und IL-10 in naiven CD4 ⁺ /CD62L ⁺ T-Zellen nach <i>in vitro</i> Kultivierung mit <i>A. lwoffii</i> -behandelten Primärkultur-Überständen.....	100
Abb. 30	Genexpression von IL-17A, IL-13 und IL-10 in naiven CD4 ⁺ /CD62L ⁺	

	T-Zellen nach <i>in vitro</i> Kultivierung mit Cholera Toxin behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen.....	101
Abb. 31	Zytokinprofil von naiven CD4 ⁺ /CD62L ⁺ T-Zellen nach <i>in vitro</i> Stimulation mit rekombinanten Proteinen.....	102
Abb. 32	Hemmung der IL-17A Zytokinexpression durch αIL-6 und αTGFβ von naiven CD4 ⁺ /CD62L ⁺ T-Zellen nach <i>in vitro</i> Kultivierung mit <i>A. lwoffii</i> -behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen.....	104
Abb. 33	Hemmung der IL-13 Zytokinexpression durch αIL-6 und αTGFβ von naiven CD4 ⁺ /CD62L ⁺ T-Zellen nach <i>in vitro</i> Kultivierung mit <i>A. lwoffii</i> -behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen.....	105
Abb. 34	Hemmung der IL-10 Zytokinexpression durch αIL-6 und αTGFβ von naiven CD4 ⁺ /CD62L ⁺ T-Zellen nach <i>in vitro</i> Kultivierung mit <i>A. lwoffii</i> -behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen.....	106
Abb. 35	Veränderung der Methylierung des IL-17A Promotors von naiven CD4 ⁺ /CD62L ⁺ T-Zellen nach <i>in vitro</i> Kultivierung mit <i>A. lwoffii</i> -behandelten J774 Makrophagen-Kulturüberständen.....	108
Abb. 36	OVA-spezifische Immunglobulin-Konzentrationen im Serum nach Behandlung mit Cholera Toxin im akuten Modell der allergischen Atemwegsentzündung.....	111
Abb. 37	Differenzierung der Leukozyten in der BAL nach Behandlung mit Cholera Toxin im akuten Modell der allergischen Atemwegsentzündung.....	112
Abb. 38	Atemwegsreaktivität nach Behandlung mit Cholera Toxin im akuten Modell der allergischen Atemwegsentzündung.....	113
Abb. 39	Zytokin-Konzentrationen in der BAL und in den Lymphknoten nach Behandlung mit Cholera Toxin im akuten Modell der allergischen Atemwegsentzündung.....	114
Abb. 40	Zytokin-Konzentrationen in der BAL und im Serum nach Kurzzeitstimulation mit Cholera Toxin <i>in vivo</i>	115
Abb. 41	Lungenhistologie nach Behandlung mit Cholera Toxin im akuten Modell der allergischen Atemwegsentzündung.....	117
Abb. 42	Mögliche Mechanismen der Allergieprävention.....	142

11 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1	Stimulationsbedingungen für Kinetikversuche mit der J774-Kulturzelllinie.....	58
Tab. 2	Stimulationsbedingungen für Kinetikversuche mit der Peritonealmakrophagen-Kultur.....	59
Tab. 3	Stimulationsbedingungen für die <i>in vitro</i> Subkultivierung der naiven CD4 ⁺ /62L ⁺ T-Zellen.....	60
Tab. 4	Konzentrationen der eingesetzten Proteine und Antikörper für die <i>in vitro</i> Subkultivierung der naiven CD4 ⁺ /62L ⁺ T-Zellen.....	61
Tab. 5	Antikörper-Konzentrationen für Zytokin-ELISAs.....	65

12 PUBLIKATIONEN

- Stephanie Brand, Dörthe Andrea Kesper, René Teich, **Esma Kilic-Niebergall**, Olaf Pinkenburg, Evita Bothur, Michael Lohoff, Holger Garn, Petra Ina Pfefferle, Harald Renz. DNA methylation of TH1/TH2 cytokine genes affects sensitization and progress of experimental asthma. 2012. J Allergy Clin Immunol, 129(6):1602-10.e6.
- Dörthe Kesper, **Esma Kilic-Niebergall**, Petra Pfefferle. Allergien und Umwelt. 2013. Allergo Journal, 22(7):464-470.
- Dörthe Kesper, **Esma Kilic-Niebergall**, Petra Pfefferle. Die Weichen werden sehr früh gestellt. 2014. HNO Nachrichten, 44(1):32-37.

13 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

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

„Analyse der *Acinetobacter lwoffii* F78-induzierten proinflammatorischen Signale und der epigenetischen Veränderungen in CD4⁺ T-Zellen anhand eines *in vitro* Zellkulturmodells“

im Institut für Laboratoriumsmedizin unter Leitung von Prof. Dr. Harald Renz ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um eine Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt. Ich versichere, dass ich sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe. Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

(Ort/Datum)

(Esma Kılıç-Niebergall)

14 VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

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

Bindereif, Dorresteijn, Hughes, Klug, Martin, Müller, Pingoud, Renkawitz, Schreiner, Spengler, Trenzcek, Van Bel.

15 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Harald Renz für die außerordentlich intensive, geduldige wissenschaftliche Betreuung und die ständige bereitwillige Diskussionsbereitschaft bis zur Fertigstellung der Arbeit.

Für die gute wissenschaftliche Betreuung, sowie für die konstruktive Zusammenarbeit, bedanke ich mich auch bei Holger Garn und bei Petra Pfefferle.

Weiterhin sei auch Dörthe Kesper für die praktische Unterstützung gedankt.

Bei Magdalene Huber möchte ich mich für die wissenschaftlichen Anregungen und die gute Kooperationsbereitschaft bei der Entwicklung des T-Zellsystems bedanken.

Außerdem richte ich einen besonderen Dank an die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe, für die praktische Unterstützung und stete Hilfsbereitschaft: Sophia Bernhardt, Alexandra Fischer, Lydia Lerch, Thomas Ruppertsberg, Nicole Disser, Wilma Hastedt, Marcel Schimmel und unseren Azubis Kevin und Lena.

Ein Dank auch an alle anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe und des Instituts, die mir durch gute Zusammenarbeit, Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, geholfen haben.

Zu guter Letzt ein ganz herzlicher Dank meinen Eltern und meiner Familie, die immer an mich geglaubt haben. Euch möchte ich diese Arbeit widmen.

DANKE